UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE PSICOLOGIA

**ESTUDO COMPARATIVO DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA Fos NOS
NÚCLEOS DA RAPE ENTRE RATOS SUBMETIDOS A EXERCÍCIO
FÍSICO E SEDENTÁRIOS.**

Dissertação apresentada ao Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo, para concorrer ao Título de Mestre, pelo Curso de Pós-graduação em Psicologia – Área de Concentração: Neurociências e Comportamento.

SÃO PAULO

2004

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE PSICOLOGIA

ESTUDO COMPARATIVO DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA Fos NOS
NÚCLEOS DA RAFA ENTRE RATOS SUBMETIDOS A EXERCÍCIO
FÍSICO E SEDENTÁRIOS.

Fábio César Prosdócimi

Dissertação apresentada ao Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo, para concorrer ao Título de Mestre, pelo Curso de Pós-graduação em Psicologia – Área de Concentração: Neurociências e Comportamento.

SÃO PAULO

2004

**Ficha Catalográfica preparada pelo Serviço de Biblioteca
e Documentação do Instituto de Psicologia da USP**

Prosdócimi, F. C.

Estudo comparativo da expressão da proteína Fos nos núcleos da rafe entre ratos submetido a exercício físico e sedentários./ Fábio César Prosdócimi. – São Paulo: s.n., 2004. – 101p.

Dissertação (mestrado) – Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo. Núcleo de Pesquisa em Neurociências e Comportamento.

Orientadora: Maria Inês Nogueira.

1. Fos 2. Ratos 3. Núcleos da rafe 4. Imunohistoquímica
5. Exercício 6. Sedentarismo I. Título.

**ESTUDO COMPARATIVO DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA Fos NOS
NÚCLEOS DA RAPE ENTRE RATOS SUBMETIDOS A EXERCÍCIO
FÍSICO E SEDENTÁRIOS**

Fábio César Prosdócimi

Banca Examinadora

Profa. Dra. Maria Inês Nogueira

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. Luciano de Freitas Felício

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. Luiz Fernando Bicudo Costa Rosa

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dissertação defendida e aprovada em: 05/05/2004

À Deus.

*Aos meus pais, Fábio e Vera, que certamente lá de cima devem estar felizes e
orgulhosos, muitas e eternas saudades;*
*Para a minha esposa Claudia, amiga, colega, incentivadora, uma pessoa presente em
todo este trabalho, a mulher da minha vida e;*
*Para as minhas amadas filhas Giulia e Melissa, razão de minha existência, sorriso
que me faz feliz e luz do meu viver.*

Amo vocês!

AGRADECIMENTOS:

A minha orientadora e amiga Profa. Dra. Maria Inês Nogueira, um exemplo de dedicação à docência, à ciência e a arte de viver. Obrigado pela paciência.

Ao Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo.

Ao Prof. Dr. Luiz Fernando Bicudo Costa Rosa, do Laboratório de Metabolismo. Gegê, muitíssimo obrigado pelo apoio.

Ao. Prof. Dr. Luciano de Freitas Felício, coordenador do NEC e Profa. Dra. Maria Teresa Araújo Silva, vice-coordenadora.

Ao Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

Ao Prof. Dr. Bruno König, professor aposentado do Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

Ao Prof. Dr. Edson Liberti, Professor Titular e Chefe do Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

Aos professores Emílio Geraissati, Luciano Celestino, Airton Knol Júnior, Marcelo Trulha, pelo incentivo.

Aos meus colegas e amigos: Rosana Cristina Boni, Marcelo Betti Mascaro, Lúcio Frigo, Luciane Soares, Andréa Beatriz Boni , Márcio de Alencar Mollo, Regiane Mathias, Dora Uemura, Francisco Cavalcante, Douglas Braga. Obrigado pelo apoio e incentivo!

Aos alunos de pós-graduação do Laboratório de Metabolismo do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Sem vocês esse trabalho não teria sido possível.

Ao Nilson Silva Souza, técnico do laboratório de Neurociências do Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

Ao pessoal da secretaria de Pós-graduação do Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo.

A Idalina de Fátima, secretária do Núcleo de Neurociências e Comportamento do Instituto de Psicologia.

A Rosana Prisco, do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, pela análise estatística e orientação.

Ao pessoal da biblioteca do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

Aos professores que ministraram os cursos para a obtenção dos créditos necessários nesse Programa de Pós-graduação.

A Editora Manole.

A Editora Guanabara Koogan.

A Editora Academic Press.

A todos aqueles que me auxiliaram, direta ou indiretamente, para a conclusão deste estudo.

À equipe do Laboratório de Neurociências do Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas III da Universidade de São Paulo:

Arthur Georg Schmidt, meu melhor amigo e colega, uma grande pessoa! Valeu! Muito obrigado pelo incentivo e amizade,

Cristiano Mendes,

Laura Kiyomi Abe,

Luciana Pinato,

Luis Takase, obrigado mesmo,

Magnus

Mariana Coelho,

Renata Frazão, até que enfim conseguimos...

Sandra Lopes,

Wilma Allemandi.

E principalmente aos meus alunos, motivo maior deste trabalho.

SUMÁRIO

Lista de figuras

Lista de tabelas

Lista de abreviaturas

Resumo

Abstract

1- Introdução.....	01
1.1 - Núcleos da rafe.....	01
1.2 - Formação reticular.....	06
1.3- Exercício e condicionamento físico -.....	08
1.4 -Controle muscular e fadiga.....	13
1.5 – Fos.....	18
2- Proposição.....	21
3 – Material e Métodos.....	22
3.1 – Animais.....	22
3.2 - Condições experimentais – Protocolo de Natação Moderada.....	22
3.3 - Preparação do material biológico.....	26
3.4 – Imuno-histoquímica.....	28
3.5 - Análise dos resultados.....	30
3.6 – Análise estatística.....	31
4 - Resultados.....	32
5 - Discussão.....	64
6 - Conclusões.....	70

7 – Anexos.....	71
8 – Referências bibliográficas.....	79

Lista de Figuras

Fig. 01 corte sagital de encéfalo de rato.....	05
Fig. 02 esquema da indução da proteína Fos.....	20
Fig. 03 sistema de 10 tanques plásticos isolados.....	23
Fig. 04 animais durante o treinamento.....	23
Fig. 05 peso adicionado à cauda do animal.....	26
Fig. 06 critério de contagem de células.....	31
Fig. 07 núcleo DR – distribuição do número médio de neurônios Fos-IR.....	35
Fig. 08 núcleo DR - número total de neurônios nos grupos experimentais.....	35
Fig. 09 núcleo DR – esquema de localização.....	36
Fig. 10 núcleo DR – fotomicrografia, método de Nissl.....	36
Fig. 11 núcleo DR – fotomicrografia mostrando neurônios Fos-IR - grupo S.....	37
Fig. 12 núcleo DR - fotomicrografia mostrando neurônios Fos-IR - grupo T.....	37
Fig. 13 núcleo MnR – distribuição do número médio de neurônios Fos-IR.....	39
Fig. 14 núcleo MnR - número total de neurônios nos grupos experimentais.....	39
Fig. 15 núcleo MnR – esquema de localização.....	40
Fig. 16 núcleo MnR – fotomicrografia, método de Nissl.....	40
Fig. 17 núcleo MnR – fotomicrografia mostrando neurônios Fos-IR - grupo S.....	41
Fig. 18 núcleo MnR - fotomicrografia mostrando neurônios Fos-IR - grupo T.....	41
Fig. 19 núcleo PMnR – distribuição do número médio de neurônios Fos-IR.....	43
Fig. 20 núcleo PMnR - número total de neurônios nos grupos experimentais.....	43
Fig. 21 núcleo PMnR – esquema de localização.....	44
Fig. 22 núcleo PMnR – fotomicrografia, método de Nissl.....	44

Fig. 23 núcleo PMnR – fotomicrografia mostrando neurônios Fos-IR - grupo S.....	45
Fig. 24 núcleo PMnR - fotomicrografia mostrando neurônios Fos-IR - grupo T.....	45
Fig. 25 núcleo PnR – distribuição do número médio de neurônios Fos-IR.....	47
Fig. 26 núcleo PnR - número total de neurônios nos grupos experimentais.....	47
Fig. 27 núcleo PnR – esquema de localização.....	48
Fig. 28 núcleo PnR – fotomicrografia, método de Nissl.....	48
Fig. 29 núcleo PnR – fotomicrografia mostrando neurônios Fos-IR - grupo S.....	49
Fig. 30 núcleo PnR - fotomicrografia mostrando neurônios Fos-IR - grupo T.....	49
Fig. 31 núcleo RMg – distribuição do número médio de neurônios Fos-IR.....	51
Fig. 32 núcleo RMg - número total de neurônios nos grupos experimentais.....	51
Fig. 33 núcleo RMg – esquema de localização.....	52
Fig. 34 núcleo RMg – fotomicrografia, método de Nissl.....	52
Fig. 35 núcleo RMg – fotomicrografia mostrando neurônios Fos-IR - grupo S.....	53
Fig. 36 núcleo RMg - fotomicrografia mostrando neurônios Fos-IR - grupo T.....	53
Fig. 37 núcleo RPa – distribuição do número médio de neurônios Fos-IR.....	55
Fig. 38 núcleo RPa - número total de neurônios nos grupos experimentais.....	55
Fig. 39 núcleo RPa – esquema de localização.....	56
Fig. 40 núcleo RPa – fotomicrografia, método de Nissl.....	56
Fig. 41 núcleo RPa – fotomicrografia mostrando neurônios Fos-IR - grupo S.....	57
Fig. 42 núcleo RPa - fotomicrografia mostrando neurônios Fos-IR - grupo T.....	57
Fig. 43 núcleo ROb – distribuição do número médio de neurônios Fos-IR.....	59
Fig. 44 núcleo ROb - número total de neurônios nos grupos experimentais.....	59
Fig. 45 núcleo ROb – esquema de localização.....	60

Fig. 46 núcleo ROb – fotomicrografia, método de Nissl.....	60
Fig. 47 núcleo ROb – fotomicrografia mostrando neurônios Fos-IR - grupo S.....	61
Fig. 48 núcleo ROb - fotomicrografia mostrando neurônios Fos-IR - grupo T.....	61
Fig. 49 distribuição do número médio de neurônios Fos-IR nos diferentes núcleos da rafe dos grupos experimentais.....	63
Fig. 50 pinçamento da cauda do animal.....	76
Fig. 51 imobilização da cabeça do animal.....	76
Fig. 52 exposição do apêndice xifóide.....	77
Fig. 53 fixação do apêndice xifóide e costelas.....	77
Fig. 54 exposição do coração.....	78
Fig. 55 introdução da cânula da bomba peristáltica até a artéria aorta, passando pela valva da aorta.....	78

Lista de Tabelas

Tabela 01 Protocolo de treinamento moderado de natação.....	25
Tabela 02 Controle de peso de animais.....	32
Tabela 03 núcleo DR – distribuição dos neurônios Fos-IR no eixo ântero-posterior mostrando o número médio, erro padrão e desvio padrão dos grupos S e T.....	34
Tabela 04 núcleo MnR – distribuição dos neurônios Fos-IR no eixo ântero-posterior mostrando o número médio, erro padrão e desvio padrão dos grupos S e T.....	38
Tabela 05 núcleo PMnR – distribuição dos neurônios Fos-IR no eixo ântero-posterior mostrando o número médio, erro padrão e desvio padrão dos grupos S e T.....	42
Tabela 06 núcleo PnR – distribuição dos neurônios Fos-IR no eixo ântero-posterior mostrando o número médio, erro padrão e desvio padrão dos grupos S e T.....	46
Tabela 07 núcleo RMg – distribuição dos neurônios Fos-IR no eixo ântero-posterior mostrando o número médio, erro padrão e desvio padrão dos grupos S e T.....	50
Tabela 08 núcleo RPa – distribuição dos neurônios Fos-IR no eixo ântero-posterior mostrando o número médio, erro padrão e desvio padrão dos grupos S e T.....	54
Tabela 09 núcleo ROb – distribuição dos neurônios Fos-IR no eixo ântero-posterior mostrando o número médio, erro padrão e desvio padrão dos grupos S e T.....	58

Lista de Abreviaturas

Rli - núcleo rostral linear da rafe

Cli - núcleo caudal linear da rafe

DR - núcleo dorsal da rafe

MnR - núcleo mediano da rafe

PMnR - núcleo paramediano da rafe

PnR - núcleo pontino da rafe

RMg - núcleo magno da rafe

RPa - núcleo pálido da rafe

ROb - núcleo obscuro da rafe

IR - imunorreativo

TRP - triptofano

f-TRP - triptofano livre

BCAA - aminoácido de cadeia ramificada

Aq - aqueduto do mesencéfalo

mlf - fascículo longitudinal médio

xscp -decussação superior

GiA - núcleo gigantocelular

py - trato piramidal

ts - trato tectoespinal

3 - núcleo do nervo oculomotor

7 - núcleos do nervo facial

5-HT - serotonina

RESUMO

O presente estudo objetivou analisar o envolvimento diferenciado dos núcleos da rafe nas respostas homeostáticas de ratos machos jovens submetidos a exercício físico. Foram formados os grupos de animais treinados (T) e sedentários (S). Para os animais do grupo T foi adotado o protocolo de natação moderada, por meio do qual os animais foram treinados durante oito semanas consecutivas, apresentando, cada semana, cinco dias de treinamento e dois de descanso. Após o período de treinamento, os animais foram perfundidos transcárdiacamente e o encéfalo removido, pós-fixado, crioprotegido e crioseccionado em cortes coronais de 40µm, para processamento com técnicas de imunoperoxidase pelo método ABC contra a proteína Fos, utilizando-se DAB como cromógeno. A análise da ativação neuronal foi efetuada pela expressão da proteína Fos. Os cortes foram analisados em microscopia de campo claro e uma série adjacente foi montada em lâminas gelatinizadas e coradas com tionina, método de Nissl, para controle citoarquitetônico. Durante o experimento, notou-se a adaptação dos animais ao exercício (grupo T), sendo necessária a adição, em sua cauda, de pesos relativos ao peso corpóreo do animal, proporcionando uma adequada sequência de treinamento. A análise quantitativa evidenciou diferentes densidades de marcação nos diferentes núcleos entre os grupos experimentais. A análise estatística ANOVA e o teste Tuckey evidenciaram diferenças estatísticas entre os grupos, onde os animais do grupo T apresentaram maior ativação de neurônios em relação aos animais do grupo S. O núcleo RPa apresentou o maior número médio de células ativadas, fato evidenciado pela contagem dos neurônios Fos-imunorreativos (Fos-IR), respectivamente, nos grupos T e S: (57,74 e 44,40); seguido pelos núcleos DR (56,67 e 47,15), RMg (42,68 e 36,09), ROb (23,98 e 19,70),

MnR (23,89 e 21,19) e PnR (20,18 e 14,07). No núcleo PMnR foi observada, contrariamente aos demais grupos, um maior número médio de células ativadas no grupo S em relação ao grupo T (5,35 e 4,08, respectivamente). Entretanto, estatisticamente, esse dado não é representativo.

Assim, de forma inédita, verificou-se a participação diferenciada dos núcleos da rafe nos mecanismos homeostáticos relacionados ao exercício físico em animais treinados.

ABSTRACT

The aim of this work was to study the distinguished involvement of the raphe nuclei in homeostatic mechanisms of young male rats submitted to physical exercises. Trained (T) and sedentary (S) animals constituted the experimental groups. For animals of group T, the method applied were the moderate swimming protocol, when the animals were trained consecutively for eight weeks (five days training, two days for rest). After the training, the animals were transcardiacally perfused and their brain were removed, post-fixed, cryoprotected and cryosectioned in coronal sections of 40 μ m, which were processed with ABC-DAB anti-Fos immunoperoxidase techniques. The analysis of the neuronal activation was observed by the expression of Fos protein. The sections were analyzed in light microscopy and an adjacent series was mounted in gelatinous slides and stained with tiron, Nissl method, for cytoarchitectonical control. Animals of group T adaptation to exercise was observed during the experiment when heaviness, equivalent to the animal's body weight, was added in their tails, giving an adequate training sequence. The quantitative analysis highlighted different densities of mark in different nuclei between the experimental groups. The statistic analysis ANOVA and Tuckey test presented different densities between experimental groups, in which the T group of animals showed bigger activation of neurons in relation to the S group of animals. The RPa nucleus showed the higher median number of labeled cells, fact evidenced through the counting of Fos-immunoreactive neurons (Fos-IR), respectively, between T and S groups: (57,74 and 44,40); followed by DR (56,67 and 47,15), RMg (42,68 and 36,09), ROb (23,98 and 19,70), MnR (23,89 e 21,19) and PnR (20,18 and 14,07) nuclei. In the PMnR nucleus was observed, against the other groups, higher

number of median numbers of labeled cells in the S group in relation to T group (5,35 and 4,08, respectively). Thus, the distinguished raphe nuclei's participation in homeostatic mechanisms related with physical exercises in trained animals was evidenced for the first time.

01- INTRODUÇÃO¹

1.1 - Núcleos da rafe

Sabe-se que os núcleos da rafe parecem ser as principais estruturas com neurônios que sintetizam serotonina (5-HT) (JACOBS, 1992; DAHLSTRÖM, 1964; BJÖRKLUND, 1971). A 5-HT está relacionada à regulação de sistemas endócrinos (AGHAJANIAN, 1978), e com ação dependente do receptor neuronal que participa da resposta (AGHAJANIAN, 1986). Desse modo, a 5-HT é um neuromodulador relacionado à atividade motora somática, neurovegetativa, endócrina ou comportamental, dependendo do tipo de via da projeção envolvida (PARENT, 1979).

Esse complexo nuclear consiste de muitos grupos celulares neuronais ímpares que podem ser distinguidos em um número de unidades menores com base em sua citoarquitetura. Formam uma coleção de células bastante estreita que se estende ao longo do plano mediano do tronco encefálico, da porção caudal da medula oblonga até o núcleo interpeduncular do mesencéfalo, sendo denominados, de rostral para caudal: Rostral Linear (RLi), Caudal Linear (CLi), Dorsal (DR), Mediano (MnR), Paramediano (PMnR), Pontino (PnR), Magno (RMg), Pálido (RPa) e Obscuro (ROb) (TABER, BRODAL E WALBERG, 1960) (Fig. 1). Esses grupamentos, além de formarem circuitos locais na formação reticular, têm sido divididos em núcleos rostrais e caudais que se projetam, respectivamente, para estruturas do prosencéfalo e medula espinal.

¹ Citações no texto e notas de rodapé de acordo com: Universidade de São Paulo. Instituto de Psicologia. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Citações no texto e notas de rodapé*. São Paulo, 1997.

O complexo nuclear da rafe mostra muitas similaridades com a própria formação reticular (TABER, 1960). A suposição de que vários núcleos da rafe são unidades distintas é apoiada por estudos anatômicos e funcionais. Entretanto, devido à reduzida dimensão dos mesmos, é quase impossível estudar suas conexões e funções por estimulação, destruição ou injeção de apenas um deles.

Após tentativas, principalmente em ratos, de estudar a importância funcional dos núcleos da rafe (através de lesões nos núcleos e análise das subseqüentes alterações comportamentais), foram verificados distúrbios regulares, tais como insônia, hiperreatividade e agressão, dor e aumento da atividade locomotora, porém os efeitos de lesões de vários núcleos não foram idênticos. Podemos citar algumas funções verificadas e atribuídas aos núcleos da rafe: funções motoras (HOLSTEGE, 1982), endócrinas (SMITH, 1980), viscerais (HOLSTEGE, 1982), relacionadas ao ciclo circadiano, aprendizado e memória sensorial e somática. Estudos imuno-histoquímicos e histofluorescentes demonstraram que tanto fibras noradrenérgicas (MORRISON, 1978) quanto serotonérgicas (LEVITT, 1984) projetam-se difusamente para praticamente todas as regiões do córtex cerebral e que apesar de apresentarem variações nos padrões de arborização cortical, esses sistemas possuem uma densidade uniforme de fibras que não se modifica substancialmente através de regiões neocorticais.

Em um animal adulto, o núcleo rostral linear (RLi) é o grupamento situado mais rostralmente, se estendendo caudalmente 5,20 mm até 6,04 mm, a partir do ponto bregma. Há hipóteses de que esse núcleo atue como quimiossensor para substâncias circulantes no sangue, possivelmente envolvidas no ciclo sono-vigília (BRODAL, 1984).

O núcleo caudal linear (CLi) é um grupamento que se inicia 6,04mm caudalmente a partir do ponto bregma, ventralmente à decussação tegmental ventral, se estendendo caudalmente até 7,64mm a partir do ponto bregma, ventralmente ao núcleo dorsal.

O dorsal (DR) é o maior núcleo da rafe, contendo aproximadamente 40% das células serotoninérgicas do encéfalo (VERTES, 1994), situado na parte rostral da substância cinzenta central (periaquedutal) e dos núcleos do assoalho do quarto ventrículo até o nível 9,30 mm caudalmente ao ponto bregma; envia projeções para outros núcleos da rafe (MnR, PnR, RMg e ROb) estruturas do mesencéfalo e tronco encefálico (formação reticular mesencefálica, núcleos parabraquiais lateral e médio, núcleo pontino oral e *locus coeruleus*) e estruturas da medula espinal, núcleo facial, prepósito do hipoglosso e núcleo do hipoglosso (VERTES, 1994). Apresenta as seguintes regiões: caudal (DRc), dorsal (DRd), ventrolateral (DRvl), ventral (DRv) e os subnúcleos interfasciculares (DRif) (Baker, 1990). Está relacionado com o sono REM, regulação de funções neurovegetativas via projeções para o complexo parabraquial e modulação de funções motossensoriais via projeções para os nervos cranianos (VERTES, 1994). Relaciona-se com a modulação da dor (WANG, 1994).

O núcleo mediano da rafe (MnR), diferentemente dos outros núcleos da rafe, tem seus limites definidos na porção mediana da parte cranial da ponte, estendendo-se desde a decussação do pedúnculo cerebelar superior até o núcleo tegmental ventral. Está relacionado com o aumento da secreção exócrina do pâncreas e da pressão arterial em ratos anestesiados estimulados eletricamente no núcleo MnR (PARK, 1995). Apresenta três grupos celulares distintos: dorsal, mediano e paramediano (BAKER, 1990).

Envia projeções para o núcleo supraquiasmático (TISCHLER, 2003, HAY-SCHIMDT, 2003) e para outros núcleos da rafe (ROb, RPa, RMg e DR), e para a formação hipocampal, núcleo tegmental látero-dorsal, regiões hipotalâmicas e talâmicas (VERTES, 1999). Juntamente com o núcleo DR, o MnR desempenha funções no controle cardiovascular (KAELHER, 2000).

O núcleo paramediano (PMnR) situa-se na região paramediana, lateralmente ao núcleo MnR, se estendendo 7,64 mm até 8,30 mm caudalmente ao ponto bregma.

O núcleo pontino (PnR) é um pequeno grupamento neuronal encontrado na parte rostral da ponte, desde o núcleo reticular tegmental até o início do RMg. Recebe projeções do núcleo dorsal da rafe e troca aferências e eferências com o *locus coeruleus* e cerebelo (BRODAL, 1984).

O magno (RMg) é um núcleo presente na parte mais rostral da medula oblonga. Em cortes coronais, apresenta-se como um grupamento de formato aproximadamente triangular dorsalmente ao lemnisco medial, estendendo-se desde o núcleo do corpo trapezóide e continuando-se com o núcleo obscuro da rafe. Relacionado principalmente com a modulação da analgesia através da inibição de neurônios nociceptivos nas partes caudais do núcleo espinal do nervo trigêmeo e na coluna posterior da medula espinal (BOWKER, 1986; CARPENTER, 1999). Participa na atividade do nervo frênico (SMITH, 1980). Apresenta projeções para os núcleos vestibulares (HALBERSTADT, 2003) e está relacionado com a modulação da dor durante o sono (FOO, 2003).

O núcleo pálido da rafe (RPa) se estende desde o nível 9,56mm caudalmente a partir do ponto bregma até a decussação das pirâmides. É um denso grupamento encontrado entre as pirâmides, próximo à superfície ventral da medula oblonga.

Constitui, juntamente com o núcleo obscuro, a principal aferência serotonérgica para o núcleo motor do trigêmeo, agindo como agente facilitador de motricidade (RIBEIRO DO VALLE, 1997). Projeta-se ainda para os núcleos do facial e do nervo hipoglosso (HOLSTEGE, 1987). Também apresenta projeções para os núcleos vestibulares, porém em menor quantidade se comparado ao núcleo DR (HALBERSTADT, 2003).

O núcleo obscuro (ROb) apresenta células situadas em dois grupamentos paramedianos que se estendem, caudalmente a partir do ponto bregma, 11,16mm até o término da decussação das pirâmides, limitado ventralmente pela oliva inferior e dorsalmente pelo quarto ventrículo, relacionado com a atividade locomotora (JACOBS, 1993). Também apresenta projeções para os núcleos vestibulares (HALBERSTADT, 2003).

Fig. 01 - Corte sagital de encéfalo de rato na lateral -0,10 mm, evidenciando, em amarelo, os núcleos da rafe. (PAXINOS, 1998).

1.2 – Formação reticular

A formação reticular *“é um cerne isodendrítico contínuo que atravessa o tronco encefálico, contínuo, abaixo, com as lâminas cinzentas reticulares intermediárias da medula espinal e fundindo-se, acima no subtálamo e partes do hipotálamo e do tálamo dorsal”*, apresentando:

- 1- coleções de neurônios e fibras mal definidos, profundamente situados, com conexões difusas;
- 2- vias de condução difíceis de serem definidas, porém indicadas por evidências fisiológicas;
- 3- componentes ascendentes e descendentes que são parcialmente cruzados e não cruzados, apresentando respostas bilaterais a estímulos unilaterais e
- 4- componentes somáticos e viscerais (WARWICK, 1995).

A formação reticular do tronco encefálico caracteriza-se estruturalmente por áreas compostas de agregados difusos de células de diferentes tipos e tamanhos, separadas por uma profusão de fibras trafegando em todas as direções. Alguns grupos circulares circunscritos como, por exemplo, núcleo rubro e núcleos de nervos cranianos, não estão incluídos. Assim, o principal critério para considerarmos uma área celular como sendo parte da formação reticular é a sua estrutura. Portanto, o termo “formação reticular” será empregado como um denominador comum para aquelas áreas do tronco encefálico (mesencéfalo, ponte e medula oblonga) que têm uma estrutura reticular, com exceção dos núcleos (núcleo reticular paramediano, núcleo reticular do tegmento da ponte e núcleo reticular lateral) que se projetam para o cerebelo.

Desse modo, a área da formação reticular a ser considerada abrangerá áreas centrais do tronco encefálico; portanto, periféricamente, cada metade da formação

reticular limita-se com longos feixes de fibras ascendentes e descendentes que atravessam o tronco encefálico (fascículo longitudinal medial, lemnisco medial, trato espinotalâmico...), e com núcleos determinados que, em certos lugares, invadem parte de seu território (BRODAL, 1984.).

Existem diferenças citoarquitetônicas na formação reticular entre diferentes espécies, e os limites entre os grupos não são sempre igualmente evidentes. Além disso, os limites entre a formação reticular e alguns núcleos, por exemplo, os núcleos vestibulares e sensitivos do trigêmeo, são bastante indefinidos. O principal ponto é a existência de diferenças arquitetônicas evidentes entre áreas relativamente pequenas da formação reticular. Com isso, supõe-se que existam outras diferenças entre essas áreas da formação reticular, em que se considere as conexões de suas fibras e as funções. Uma característica evidente é que as grandes células da formação reticular estão restritas a sua parte medial, onde se misturam com células pequenas e médias, e no terço lateral existem apenas células pequenas.

Estudos da formação reticular pelo método de Golgi dão informação adicional sobre as células presentes e seus padrões dendríticos e axonais. Todos os axônios parecem projetar-se, a pelo menos alguma distância, rostral e/ou caudalmente (SCHEIBEL, 1958, p.37). Os dendritos das células reticulares são usualmente radiais e longos (RAMÓN-MOLINER, 1966), e é característico que a maioria dos dendritos estejam dispostos num plano perpendicular ao longo eixo do tronco encefálico (BRODAL, 1984).

Há alguns grupos celulares menores, os quais, apesar de sua estrutura reticular, têm sido referidos sob nomes particulares e, em consequência, não incluídos na formação reticular. Porém, uma vez que estes núcleos assemelham-se a outras partes da

formação reticular, no que tange às suas conexões, é muito provável que estejam funcionalmente correlacionados a ela. Esse é o caso dos núcleos da rafe, inclusive relacionados com a motricidade (BRODAL, 1984), motivo desse estudo.

1.3 – Exercício e Condicionamento Físico

Existe atualmente um reconhecimento formal sobre os benefícios determinados pelo exercício e pela atividade física, sobretudo no aspecto do aprimoramento da saúde. Existem evidências de que a atividade física diminui o risco de doenças crônicas e a morte prematura, além de proporcionar melhora da qualidade de vida (DISHMAN, 2003). Com a publicação do *Physical Activity and Health: A Report of the Surgeon General* (US Department of Health and Human Services, 1990), anos de pesquisas sobre o exercício e a atividade física enfim elevaram o conceito da fisiologia do exercício como ciência multidisciplinar (RAVEN, 1989). O exercício promove efeitos benéficos para a função cerebral, incluindo a promoção da plasticidade e o aumento do desempenho da memória e do aprendizado (TONG, 2001). Foram evidenciados a diminuição dos índices de depressão e a melhora da saúde mental em indivíduos praticantes de exercícios físicos quando comparados a indivíduos sedentários (DISHMAN, 2003).

Estudos realizados com a implantação de programa de atividade física em locais de trabalho demonstraram que para cada dólar americano gasto, aproximadamente 3,4 dólares americanos foram economizados, tendo-se como resultado a diminuição dos custos com despesas e internações médicas (GETTMAN, 1996).

O exercício de longa duração e intensidade baixa a moderada apresenta como característica a realização de trabalho na faixa entre 60 a 80% da frequência cardíaca

máxima, tendo-se como fonte energética o metabolismo aeróbico (POLLOCK, 1993). O exercício aeróbico pode auxiliar na perda da gordura corporal e preservação da massa muscular (POLLOCK, 1993).

De fato, o sedentarismo ou inatividade física é fator relacionado a inúmeras patologias, tais como a coronariopatia e o câncer de colo de útero (PATE, 1995, PROCHASKA, 1983). Além disso, o sedentarismo está relacionado ao desenvolvimento de hipertensão, um dos principais fatores determinantes das apoplexias (WELLS, 1996, BLAIR, 1984). A atividade física também está associada à diminuição da incidência de câncer de colo de útero (LEE, 1995), observando-se melhora significativa na redução da mortalidade em indivíduos que apresentam atividade física moderada (WELLS, 1996), além de reduzir em 25% o risco de diabetes tipo 2 devido ao fato de consumir entre 1.500 e 2.000 Kcal por meio de controle adequado de exercícios (HELMRICH, 1991) e ainda estar associada a aumento da saúde mental (DISHMAN, 1998).

Exercícios regulares moderados podem elevar a resposta imunológica frente a agentes infecciosos em atletas e indivíduos que os praticam (MACKINNON, 2000). Este fator de relação entre os efeitos do exercício físico e os benefícios para o sistema imunológico tem sido descrito e pesquisado por diversos autores, que, por exemplo, defendem a hipótese de que tais resultados decorreriam de uma modulação do sistema imunológico (PEDERSEN, 1997).

O exercício também estimula a produção das citocinas pré-inflamatórias e linfócitos, aumentando a chance de uma recuperação em ratos infartados (COSTA ROSA, 2002). Ainda previne muitas das conseqüências comportamentais e fisiológicas derivadas do estresse. O exercício físico foi preconizado visando melhoria geral em

indivíduos com variados problemas de saúde, onde os efeitos benéficos seriam obtidos por meio de complexas interações entre efeitos psicológicos e fisiológicos, tais como alívio de estresse, melhora da função cardiovascular e readequação alimentar, determinando-se assim melhoria geral da qualidade de vida, diminuição da gordura corporal, aumento das atividades oxidantes e modulação hormonal (BRINES, 1996). Foi também descrito que o exercício pode dobrar a resposta a vacinas como, por exemplo, contra a tuberculose (BCG, Bacillus Calmette-Guerin), no que se refere ao anticorpo IgG (MARTINS, 1998).

Com relação à dose de atividade física adequada para cada indivíduo, convém lembrar que os organismos apresentam variações entre si, portanto deve-se levar em consideração alguns fatores.

De acordo com o American College of Sports Medicine, ACSM, (1978), uma base adequada de fatores consiste de:

- a- frequência de treinamento entre 3 a 5 dias por semana;
- b- duração do treinamento entre 15 e 60 minutos;
- c- utilização aeróbica e rítmica de grupos musculares.

De acordo com o ACSM, *“todas as crianças e adultos devem acumular um mínimo de 30 minutos de atividade física moderada na maioria dos dias da semana e, preferencialmente, em todos eles”* (American Heart Association, 1996; NIH Consensus Development Panel on Physical activity and Cardiovascular Health, 1995; PATE, 1995; U.S. Department of Health and Human Services, 1996).

Devemos considerar ainda o fato de que a determinação da frequência e duração do exercício físico são fundamentais para se obter resultados específicos. Duração refere-se à extensão temporal do período de realização de cada sessão de treinamento

(quantidade de minutos ou horas). Frequência refere-se ao número de vezes de realização das sessões (FOX, 1975; GETTMAN, 1976; JACKSON, 1968; KNUTTGEN, 1973; POLLOCK, 1969). Uma seqüência de treinamento recomendada para um programa aeróbico desenvolve-se de três a cinco vezes por semana, pois quanto mais freqüente e mais prolongado for o treinamento maiores serão os resultados, considerando-se a aptidão (FOX, 1973; COHEN, 1970). Levando-se em conta os resultados do ponto de vista fisiológico e do desempenho, não existem evidências científicas de que um aumento de sessões diárias de treinamento possam aumentar os benefícios na aptidão (COSTILL, 1991; MOSTARDI, 1975; WATT, 1973).

Esse modelo foi adotado uma vez que considera fatores como:

- a) modelo de suprimento e depleção de energia,
- b) modelo de potência muscular,
- c) modelo biomecânico e
- d) modelo fisiológico,

fatores não abordados anteriormente por fisiologistas pioneiros, tais como Hill, Bock e Drill (NOAKES, 2000).

Faz-se necessário o comentário de que o organismo trabalha como um sistema integrado, e durante o desempenho de exercícios físicos de treinamento ocorre envolvimento da função neuromuscular e dos músculos esqueléticos e do sistema cardiovascular, determinando rendimento de potência durante períodos mais prolongados. Alguns fatores influenciam e determinam o desempenho, tais como resistência ao movimento, VO_2 durante o exercício, VO_2 máximo, velocidade no limiar do lactato e economia de movimento (COYLE, 1995; PATE, 1992). Uma vez que isoladamente esses fatores indicam performance adequada ou não, eles não serão por

nós abordados. Existem vários treinamentos de resistência (*endurance*), porém abordaremos o treinamento de longa duração e intensidade moderada (PATE, 1992).

O treinamento de longa duração e intensidade moderada consiste em 30 minutos a duas horas de exercício contínuo percorrendo-se longas distâncias, às vezes designado LDL (longa distância, lento) (DANIEL, 1978). O modelo que adotamos para o presente estudo foi o de natação, seguindo-se o protocolo de natação moderada.

Na população em geral, o risco de uma morte súbita é pequeno, cerca de uma em cada 100.000 pessoas, apesar de receber, em geral, destaque nos meios de comunicação, colocando-se em dúvida os benefícios derivados de um programa de condicionamento físico (American Heart Association, 1992 e KOHL, 1992). Esse índice é superior àqueles encontrados durante períodos sem qualquer esforço, indicando claramente um aumento transitório no risco de uma morte súbita. Entretanto ressalta-se que o risco de morte súbita durante exercícios físicos é maior entre indivíduos sedentários que entre indivíduos habitualmente ativos (MITTLEMAN, 1993). Com isso, os benefícios determinados por um programa de atividade física são favoráveis quando desejamos atingir um baixo risco global de situações de morte súbita. Nos Estados Unidos, 10 a 12% da população pratica exercícios físicos regularmente, 15% pratica exercícios de modo a melhorar sua própria saúde, porém sem grande impacto devido a alguma deficiência no programa de atividades físicas, 30% pratica exercícios de maneira irregular e 40% é totalmente sedentária. De maneira geral, aproximadamente 60% da população situa-se em um patamar onde não se realizam atividades físicas com a frequência, duração e intensidade recomendadas para se obter o ideal de qualidade de vida e de saúde. Em indivíduos que fumam pelo menos um maço de cigarros por dia, ou então para aqueles apresentam uma pressão arterial sistólica superior ou igual a 150

mmHg ou ainda apresentam níveis de colesterol superior a 265 mg/dl, esta porcentagem é ainda maior. O índice de desistência de programas de atividade física regular é muito semelhante aos índices de desistência de programas de psicoterapia, perda de peso, abuso de drogas e fumo (DISHMAN, 2003).

1.4- Controle muscular e fadiga

A contração muscular resulta do deslizamento de microfilamentos de actina sobre microfilamentos de miosina, determinando encurtamento do músculo. Este encurtamento é dependente de alguns fatores, tais como:

- a- fracionamento de ATP e, portanto, liberação de energia;
- b- ligação Ca^{++} – troponina, ativando-se os microfilamentos de actina e,
- c- formação da actomiosina (miosina + actina).

O motoneurônio e as fibras por ele inervadas constituem a unidade funcional de um músculo estriado esquelético, conhecida como unidade motora, que trabalha determinando uma contração nula ou máxima.

Dessa maneira, conseguiremos modular o grau de força de contração de um grupamento muscular:

- a- alternando-se a frequência de contração de unidades motoras individuais, fator conhecido como somação por ondas e,
- b- recrutando-se ou somando-se múltiplas unidades motoras, ou seja, variando-se o número de unidades motoras contraídas em determinado momento.

Existem diferentes fibras musculares, genericamente Tipo I (lentas) ou Tipo II (rápidas). Em uma unidade motora não existem fibras de ambos os tipos. As fibras Tipo II podem ser subdivididas em IIA, IIB e IIC. As fibras Tipo I apresentam maior capacidade aeróbica, as Tipo IIA são tanto glicolíticas quanto oxidativas, as Tipo IIB apresentam metabolismo glicolítico anaeróbico e as Tipo IIC não apresentam classificação ou diferenciação (GOLDSPINK, 1985). Existe um consenso que o aumento do volume de um músculo deve-se a uma hipertrofia e não a uma hiperplasia (GOLLNICK, 1981). Comparando-se atletas que realizam levantamento de peso e fundistas, os levantadores de peso apresentam um percentual baixo de fibras I e um percentual alto de fibras IIA e IIB, assim como um número maior de mitocôndrias e um baixo conteúdo lipídico no interior das fibras musculares (STARON, 1984; MILLER, 1995).

Convém esclarecer que o tipo de fibra predominante na gestação é a do Tipo IIC, indiferenciada. A diferenciação das fibras Tipo IIC em Tipo I, IIA e IIB ocorre à medida que acontece a maturação dos sistemas muscular e nervoso, quando os músculos axiais e apendiculares começam a trabalhar. Após o nascimento observa-se um aumento das fibras Tipo I, importantes para locomoção e resistência (*endurance*). Posteriormente, os tipos I e II se equivalem em proporção, onde as maiores variações irão ocorrer na segunda década de vida, no que se refere ao diâmetro das fibras (VOGLER, 1985). Foi demonstrado, por meio de inervação cruzada para os diferentes tipos de fibras (I e II), que o nervo motor é trófico para as fibras musculares, ou seja, para definir as capacidades funcionais do músculo (GORDON, 1993; TALMADGE, 1993; MUNSAT, 1976).

Quando as fibras musculares são repetidamente ativadas, ocorre consumo dos elementos de energia (ATP) e o músculo cansa, produzindo menos força. Quando fadigam, as fibras musculares levam mais tempo para relaxar, uma vez que o relaxamento é um processo ativo que requer energia (ATP). Com isso, o aumento do tempo de relaxamento permite que a força produzida por impulsos nervosos repetidos se some mesmo a baixas frequências (intervalos mais longos entre os potenciais de ação), quando comparadas com o músculo em repouso (KANDEL, 2003).

Esses distúrbios locais, derivados da fadiga contrátil, sinalizam ao encéfalo a necessidade de eferências inibitórias ao sistema motor, determinando uma diminuição do rendimento muscular, portanto, a medida que o músculo se fadiga, impulsos aferentes são conduzidos em direção ao sistema nervoso central.

A fadiga nas áreas motoras do sistema nervoso central influencia a resposta muscular ao exercício e pode ser definida como “*uma redução na força muscular derivada do declínio da atividade de motoneurônios*” (GANDEVIA, 1995) e ainda como uma perda da capacidade geradora de força (NYBO, 2003). Os receptores 5-HT são fatores determinantes para a fadiga nas áreas motoras do sistema nervoso central (DWYER, 2000). Evidências de que a serotonina apresenta papel fundamental nessa fadiga do sistema nervoso central relacionada a exercícios físicos prolongados, estão sendo cada vez mais investigadas. As funções da serotonina relacionadas ao ciclo sono-vigília, letargia, motricidade permitem apontá-la como provável neuromediador da fadiga central (NEWSHOLME, 1987). O exercício físico pode influenciar importantes fatores que controlam a síntese e a recaptação da serotonina no sistema nervoso central, de tal maneira que o aumento dos níveis de serotonina no encéfalo, determinados pelo exercício prolongado, podem levar à fadiga central, prejudicando assim o desempenho

na atividade física (NEWSHOLME, 1996). O aumento de serotonina no encéfalo ocorre como resposta ao aumento da oferta de triptofano (TRP), o aminoácido precursor da serotonina. A maior parte do TRP presente no plasma apresenta-se acoplado à albumina, porém o triptofano livre (f-TRP) é transportado através da barreira hematoencefálica. Esse transporte ocorre por meio de receptores específicos que compartilham o TRP com outros aminoácidos, mais precisamente os aminoácidos de cadeia ramificada (branched-chain amino acids, BCAAs) leucina, isoleucina e valina. Portanto, a síntese de serotonina no encéfalo aumenta quando existe maior oferta da concentração de f-TRP no plasma sangüíneo em relação à concentração total de BCAA no plasma (ou seja, aumento de f-TRP:BCAA). Esse aumento foi observado durante exercícios prolongados devido a dois fatores: inicialmente os BCAAs são recaptados do sangue e oxidados durante a contração dos músculos esqueléticos. Em um segundo momento, os ácidos graxos (fatty acid, FA) têm sua concentração aumentada, determinando um aumento de f-TRP no plasma, uma vez que libera o TRP de seus sítios de ligação com a albumina (MARK DAVIS, 2000).

Se realizarmos uma pausa entre os exercícios, os distúrbios musculares tendem a reduzir. Nesse caso, se realizarmos uma atividade dispersiva em relação ao exercício como, por exemplo, a leitura de um texto, sinais oriundos de diferentes regiões, inclusive do encéfalo, atingirão áreas facilitatórias do encéfalo. Com isso, impulsos facilitatórios são enviados ao aparelho locomotor, determinando uma recuperação acelerada da fadiga (ASMUSSEN, 1978).

Uma rede neural capaz de gerar um padrão rítmico de atividade neural é denominada gerador central de padrão (CPG), que ocorre devido a interação de propriedades celulares e conexões sinápticas (KIEHN, 1997; CALABRESE, 1998),

relacionada a vários padrões locomotores, incluindo a natação. Depende basicamente de três fatores:

- a- características neuronais individuais;
- b- propriedades sinápticas entre neurônios e
- c- inibição ou excitação dos neurônios interconectados.

Essa rede neural é sensível à estimulação farmacológica serotoninérgica, como demonstrado em medula espinal de ratos, região responsável pelo circuito necessário para gerar a CPG na medula espinal (GIMENEZ y RIBOTTA, 2000).

A medula espinal contém circuitos neurais que mediam movimentos reflexos e automáticos, tais como a locomoção. O tronco encefálico apresenta circuitos semelhantes para movimentos reflexos da face e da boca. O córtex motor (assim como o córtex pré-motor) realiza o mais elevado nível do controle motor. O córtex motor se projeta diretamente para a medula espinal (trato corticospinal) e também modula tratos motores originados no tronco encefálico.

O cerebelo e os núcleos da base também participam da regulação, planejamento e execução do movimento através do fornecimento de circuitos de retroalimentação que regulam áreas motoras e pré-motoras corticais e do tronco encefálico, recebendo aferências de áreas corticais e projetando-se para áreas motoras corticais através do tálamo (GRILLNER, 1981; BELANGER, 1988).

Centros supra-segmentares interagem através de vias aferentes e eferentes com cadeias espinais (ROTHWELL, 1987). O exercício muscular intenso pode constituir o estímulo efetivo para ativar a expressão da proteína Fos, pois evidencia áreas sensoriomotoras. Quando se estimula o córtex motor provocam-se efeitos motores específicos e neurovegetativos simpáticos relacionados aos efeitos somáticos e de

adaptação geral à realização do exercício (PAULUS, 1993). As projeções do hipotálamo caudal direcionam-se para as áreas motoras e para o RPa, e as porções mediais do hipotálamo e da região pré-óptica projetam-se para o RMg (HOLSTEGE, 1995).

Os corpos celulares dos neurônios motores que inervam músculos individuais são agrupados em núcleos motores, dispostos em colunas longitudinais que se estendem de um a quatro segmentos espinais, obedecendo a uma regra de organização espacial progressiva no interior da medula espinal, onde os núcleos motores que inervam os músculos mais proximais situam-se mais medialmente que os núcleos motores que inervam os músculos mais distais (KANDEL, 2003).

O aspecto característico dos movimentos voluntários se aperfeiçoa com a prática, podendo estar associado com a reorganização cortical. O mapeamento por imagem por ressonância magnética cortical (MRI) demonstrou que a área cortical ativada durante a execução da sequência do treinamento era maior do que a ativada durante uma sequência não treinada (DE KARNI, 1995).

1.5 - Fos

A proteína Fos (*Finkel-Birkis-Jinkins murine osteosarcoma*) é o produto do gene homólogo (proto-oncogen *c-fos*, um dos genes de expressão precoce) do oncogene *v-fos*, observado no vírus causador de um tipo de osteossarcoma (CURRAN, 1982). É rapidamente induzida nos neurônios após um estímulo eficiente externo (MORGAN, 1989) sendo, portanto, importante técnica para estudo das adaptações neuronais, atingindo sua maior concentração nuclear em aproximadamente 60-90 minutos (MORGAN, 1991; KRUKOFF, 1993; ROWLAND, 1996; DINARDO, 1997), persistindo por 2 a 5 horas (DRAISCI, 1989), tornando-se assim, uma importante marcadora de

atividade fisiológica. Dessa maneira, sendo uma fosfoproteína nuclear que demonstra a atividade do neurônio frente a estímulos específicos, a proteína Fos, tornou-se um eficiente método de mapeamento dos circuitos neuronais.

A seqüência de eventos que culminam com a produção de Fos é a seguinte: estímulos extracelulares eficientes abrem os canais de cálcio fazendo com que estes íons entrem na célula (fig. 2) e ativem a CaM (Ca^{++} /calmodulina) quinase II, que é responsável pela fosforilação do fator de transcrição CREB (“*cAMP - response element binding protein*” i.e., proteína de ligação responsiva ao cAMP). O CREB possui um sítio de ativação pela fosforilação e um motivo responsável pela ligação ao DNA. Portanto, ao ser ativado via cAMP o CREB se liga a uma seqüência reguladora de DNA, o CRE, iniciando a transcrição dos genes de expressão precoce *c-fos* e *jun B*, produzindo as proteínas FOS e JUN. Estas possuem um motivo tipo zíper de leucina, o qual é composto por uma região com aproximadamente 30 aminoácidos caracterizada por repetições de leucina a cada 7 aminoácidos. Os motivos de leucina de duas proteínas formam dímeros com as α -hélices paralelas. Assim, a dimerização da FOS e da JUN formam um heterodímero, o complexo AP-1 de ligação. Essa manobra amplia as chances de combinação de domínios de ativação e repressão (fig. 02).

Assim, várias porções do DNA que contenham o sítio específico para este fator são ativados, regulando a síntese de neurotransmissores. Ressalta-se o fato de ser uma técnica que demonstra apenas os núcleos dos neurônios marcados, a imunohistoquímica mostrou-se uma importante técnica para o mapeamento anátomo-fisiológico do sistema nervoso central.

Fig. 02 - O receptor estimulado abre os canais de Ca^{2+} . Este, uma vez no citoplasma, ativa a enzima Ca/calmodulina (CaM) quinase II, que então fosforila o fator de transcrição CREB, que por sua vez induz a expressão do proto-oncogen c-fos ao se ligar ao sítio CRE do DNA. A proteína Fos produzida se dimeriza com outra proteína (Jun) para compor o complexo heterodímero AP-1, que irá regular a transcrição dos genes cujas estruturas tenham o sítio de ligação para o complexo AP-1 (modificado de GOLOMBEK, 1996 por TAKASE; NOGUEIRA, 1998).

02- PROPOSIÇÃO

Como parte do amplo projeto de estudo sistemático dos núcleos da rafe e sistema serotoninérgico do Laboratório de Neurociências do Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, este estudo visa:

1. Verificar, nos modelos adotados para este experimento, o envolvimento diferenciado de cada núcleo da rafe e suas eventuais alterações anatômicas e funcionais, frente a respostas homeostáticas de animais submetidos a exercícios físicos, comparando-se os resultados com estudos em animais sedentários e,
2. Analisar quantitativamente, pela expressão da proteína Fos, o número de neurônios ativados nos diferentes núcleos da rafe e a sua distribuição ao longo do eixo ântero-posterior de cada animal nos diferentes grupos experimentais.

03- MATERIAL E MÉTODOS

3.1 – Animais

Foram utilizados 15 ratos albinos (*Ratus norvegicus*, linhagem Wistar), machos, 3 meses, 290-320g, criados no biotério do Instituto de Ciências Biomédicas – USP, sob temperatura constante (23° C), ciclo claro/escuro de 12/12 h, início do claro às 07:00 h, ração¹ e água *ad libitum*. Os animais foram divididos em dois grupos: treinados (grupo T, n = 9), que foram submetidos ao protocolo de natação moderada durante 8 semanas, e sedentários (grupo S, n = 6), que não receberam qualquer treinamento físico. Todos os procedimentos obedeceram aos princípios *do International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals* (Society for Neuroscience, 1991), Cobeia (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal, 1991) e foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEAA), em reunião de 22/08/2002.

3.2 - Condições experimentais – Protocolo de Natação Moderada

Os animais do grupo T foram submetidos ao protocolo de natação moderada segundo protocolo desenvolvido por Lancha Júnior (1993) durante oito semanas (tabela 01), das 12:00 às 13:00h, respeitando-se cinco dias de treinamento por dois de descanso.

O treinamento foi realizado em um sistema de 10 tanques plásticos isolados (fig. 03), desenvolvido por Vieira (1988), em que a atividade física de cada animal foi individualizada, evitando-se dessa maneira a competição entre os animais, minimizando o estresse (fig.04).

¹ Nuvilab CR1

Fig. 03 - Sistema de 10 tanques plásticos isolados.

Fig. 04 - Animais durante o treinamento.

O volume de água em cada tanque foi o suficiente para evitar que a cauda do animal atingisse o fundo do reservatório, alterando o treinamento, pois necessitariam exercer um exercício físico menos intenso, invalidando o protocolo. A água foi trocada após cada treinamento e a sua temperatura mensurada antes e depois de cada sessão (temperatura média entre 30 e 32°C). Após o treinamento, os animais foram transportados para uma cuba, onde o excesso de água foi removido antes de serem novamente transportados para o biotério. Durante o treinamento, foram adicionadas sobrecargas aos animais (fig. 05). A sobrecarga se faz necessária, uma vez que o animal, com o treinamento, desenvolve características adaptativas ao exercício, ou seja, passa a realizar a cada sessão um esforço físico menor que aquele dispensado na sessão anterior. Essa situação foi compensada pela adição de pesos baseados no peso corpóreo do animal (medido diariamente antes do início das atividades) e adequadamente posicionados na cauda, obrigando o animal a se exercitar. Os animais do grupo S não receberam nenhum treinamento e foram perfundidos após única sessão de natação moderada, onde observamos o mesmo tempo de exercício diário dos animais do grupo T. Esses animais somente foram previamente submetidos a uma adaptação ao ambiente de realização do experimento. Essa adaptação consistiu da introdução do animal durante 30 minutos no tanque de treinamento com nível de água suficiente apenas para permitir o contato com a água durante uma semana, diminuindo significativamente dessa maneira o estresse no momento da realização do experimento. O horário da realização da sessão foi o mesmo dos animais do grupo T e não foi necessária a adição de sobrecarga, uma vez que os animais não tiveram tempo de adaptação ao exercício como os animais do outro grupo.

Obs: animais T1-T9, animais submetidos ao treinamento,

animais S1-S6, animais sedentários.

T = tempo de treinamento, em minutos.

SC = sobrecarga adicionada à cauda do animal.

Protocolo de Treinamento Moderado de Natação					
	<i>Segunda-feira</i>	<i>Terça-feira</i>	<i>Quarta-feira</i>	<i>Quinta-feira</i>	<i>Sexta-feira</i>
Semana 1	T: 15' SC: 0%	T: 20' SC: 0%	T: 30' SC: 0%	T: 40' SC: 1%	T: 40' SC: 2%
Semana 2	T: 50' SC: 2%	T: 50' SC: 3%	T: 60' SC: 3%	T: 50' SC: 4%	T: 60' SC: 4%
Semana 3	T: 40' SC: 5%	T: 50' SC: 5%	T: 60' SC: 5%	T: 60' SC: 5%	T: 60' SC: 5%
Semana 4	T: 60' SC: 5%	T: 60' SC: 5%	T: 60' SC: 5%	T: 60' SC: 5%	T: 60' SC: 5%
Semana 5	T: 60' SC: 5%	T: 60' SC: 5%	T: 60' SC: 5%	T: 60' SC: 5%	T: 60' SC: 5%
Semana 6	T: 60' SC: 5%	T: 60' SC: 5%	T: 60' SC: 5%	T: 60' SC: 5%	T: 60' SC: 5%
Semana 7	T: 60' SC: 5%	T: 60' SC: 5%	T: 60' SC: 5%	T: 60' SC: 5%	T: 60' SC: 5%
Semana 8	T: 60' SC: 5%	T: 60' SC: 5%	T: 60' SC: 5%	T: 60' SC: 5%	T: 60' SC: 5%

Tabela 01 – Protocolo de treinamento moderado de natação (LANCHA JÚNIOR, 1993).

Fig. 05 – Peso adicionado à cauda do animal.

3.3 – Preparação do material biológico

Os animais foram perfundidos conforme procedimento usual do laboratório (NOGUEIRA, 1997) após 90 min do término do estímulo, tempo necessário para a máxima expressão da proteína Fos. Primeiramente, os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de pentobarbital 3%, e após a comprovação do grau de profundidade da anestesia pelo pinçamento da cauda, cada animal foi posicionado na cuba de perfusão com a cabeça imobilizada. A dissecação iniciou-se com um corte na pele do abdome para a exposição do apêndice xifóide, que foi fixado por uma pinça dente-de-rato e cortado, juntamente com as costelas, em forma de “V”. O apêndice xifóide foi rebatido e preso à mesa de perfusão através de uma pinça hemostática, expondo-se o coração. A artéria aorta, em sua parte descendente, teve seu fluxo interrompido através de uma pinça hemostática curva para que, durante a perfusão, o fixador não atingisse o abdome e membros inferiores, garantindo uma melhor fixação do encéfalo do animal, com menor gasto de solução. Em seguida, o ápice do coração foi

incisado, abrindo-se o ventrículo esquerdo para a introdução da cânula da bomba peristáltica¹ até a artéria aorta, passando pela valva da aorta, utilizando-se como referência anatômica o septo interventricular. A cânula foi fixada com uma pinça hemostática reta e bombeados, durante aproximadamente 2 minutos, 150 ml de solução salina 0,9%, pH 7,4 à temperatura ambiente, com a finalidade de lavar o sistema circulatório do animal, prevenindo a formação de coágulos e possibilitando a penetração do fixador nos tecidos. A fixação foi realizada com a injeção de 500 ml de solução de paraformaldeído e bórax 4%, pH 9, 5, à 4°C, durante 5 minutos em fluxo rápido e mais 15 minutos em fluxo lento.

O fluxo rápido se faz necessário para permitir que o fixador atinja rapidamente os tecidos, diminuindo-se a perda das proteínas e o fluxo lento permite um contato mais íntimo entre o fixador e os tecidos. O bórax, além de tamponar a solução, age como um protetor de proteínas, amenizando sua perda durante o processo de fixação dos tecidos. Observou-se a contração muscular dos membros anteriores e da cabeça, indicando a penetração do fixador nos tecidos. Nesse momento, a cabeça do animal foi recoberta com gelo para diminuir a degradação das substâncias protéicas.

Após o término da passagem do fixador, o encéfalo foi cuidadosamente removido e dissecado, pós-fixado (por imersão) na mesma solução fixadora + sacarose 20% por 4 hs à 4°C, crioprottegido (por imersão) em KPBS + sacarose 20% “overnight” à 4°C e seccionado em criomicrotomo² em cortes coronais de 40 µm de espessura. Os cortes foram coletados em 5 séries e armazenados em solução anti-congelante (fosfato de sódio 0,05M etileno-glicol 30% e glicerol 20%) no congelador à -20°C.

¹ Masterflex Cole-Palmer. Niles, USA.

² SM2000 R. Leika, Germany.

3.4 – Imuno-histoquímica

Uma série foi processada com técnicas de imunoperoxidase pelo método ABC (complexo Avidina-Biotina) e cormógeno DAB (diaminobenzidina), para a proteína Fos montada em lâminas gelatinizadas e contrastada com ósmio. Outra série adjacente foi preparada para coloração com tionina, pelo método de Nissl, para controle citoarquitetônico.

A sequência de procedimentos para reações imuno-histoquímicas (para observação da marcação dos neurônios com expressão da proteína Fos) dos cortes coronais efetuados por criomicrotomia, e conservados em solução anti-congelante é a seguinte:

- lavagem dos cortes em solução salina de tampão fosfato de potássio a 0,02%, pH 7,4 (KPBS),
- imersão dos cortes em solução H_2O_2 30% para a redução da marcação de fundo, neutralizando-se a peroxidase endógena,
- imersão dos cortes em solução tampão KPBS por 10 minutos (3x),
- colocação dos cortes em contato com boridreto de sódio à 1% (50ml de KPBS + 0,5g de boridreto de sódio) para promover a remoção de eventuais grupos de aldeídos livres decorrentes do fixador,
- imersão dos cortes em solução tampão KPBS.

A partir dessas etapas, o material foi adicionado ao anticorpo (produzido em coelhos) policlonal contra a proteína Fos (fragmento sintético N-terminal) (Oncogen), concentração 1:10.000.

O anticorpo foi diluído em uma solução composta por KPBS, Triton-X100 a 0,3% e soro normal de cabra (normal goat serum). O Triton-X100 permite uma maior

penetração da solução através da membrana celular e o soro normal de cabra inativa sítios inespecíficos para a ligação do anticorpo secundário. Após o tempo adequado de incubação de 48 horas a 4°C (HOFFMAN, 2002) em agitador orbital protegido da luz, o material foi novamente lavado em solução tampão e colocado em contato com o anticorpo secundário (biotinilado), diluído em solução tampão e Triton-X 100 a 0,3% por 90 minutos. Após o tempo de espera (em agitador orbital protegido da luz), o material foi novamente lavado em solução tampão. Para que a reação com o complexo avidina-biotina fosse efetiva, o material foi lavado com uma solução tampão acetato de sódio 0,1M com pH 6,0 e em seguida colocado em contato com o complexo avidina-biotina (a avidina apresenta quatro sítios de ligação para biotina, sendo que em um deles liga-se a biotina do anticorpo secundário e os demais são preenchidos por biotinas livres) diluído em solução tampão de KPBS por 90 minutos em um agitador orbital, quando os cortes foram novamente lavados em solução tampão. Utilizamos como cromógeno para a reação de imunoperoxidase o DAB (tetrahidrocloro 3-3'-diaminobenzidina) adicionado a sulfato de níquel e amônio preparado a 5% em solução tampão de acetato de sódio 0,1M com pH 6,0 (ressaltando-se que a reação da peroxidase é mais eficiente quando ocorre em pH 6,0). O peróxido proveio da reação entre a glicose oxidase e a β -D (+) glicose (o catalisador foi o cloreto de amônio 0,04%). A reação foi interrompida colocando-se o material em contato com solução tampão de acetato de sódio 0,1M pH 6,0. Em seguida, o material foi lavado em solução tampão, montado em lâminas gelatinizadas com sulfato crômico de alumínio e colocado para secar por uma noite à temperatura ambiente.

A sequência de procedimentos para a osmicação foi a que se segue: o material montado em lâminas gelatinizadas foi submetido à desidratação em diferentes

concentrações crescentes de álcool etílico e ao xilol, e em seguida submetido a uma reidratação em diferentes concentrações decrescentes de álcool etílico, quando então foi imerso em solução de tetróxido de ósmio 0,005% durante 15 minutos e em seguida imerso em solução de tiocarboidrazida 005% por igual período. O material foi então lavado em água corrente durante 15 minutos e novamente imerso na solução de tetróxido de ósmio 0,005% por mais 30 minutos, quando então foi novamente desidratado em diferentes concentrações crescentes de álcool etílico e imerso em xilol, sendo finalmente coberto com lamínulas e DPX. Para controle e estudo morfológico foi montada uma série adjacente, posteriormente corada com tionina, método de Nissl, para observar detalhes não visíveis de referências topográficas nas séries preparadas com os procedimentos imuno-histoquímicos.

3.5 - Análise dos resultados

As lâminas foram analisadas em microscópio de luz e a contagem (quantificação) das células marcadas (Fos-imunorreativas, Fos-IR) nos núcleos da rafe foi realizada por meio do programa Image Pro-Plus¹, instalado em um microcomputador conectado a uma câmera digital² associada a um microscópio³. Foi estabelecida uma contagem padronizada dos neurônios Fos-IR para cada animal, comparando-se os cortes com secções aproximadas às do atlas (PAXINOS, 1998), onde células cuja marcação mostrou-se evidente foram consideradas para o presente estudo (fig. 06).

¹ Cool SNAP-PRO Media Cybernetics. Silver Spring, MA, USA.

² E- Nikon Melville, NY, USA.

³ Image Pro-Plus Version 4.1 Media Cybernetics. Silver Spring, MA, USA.

3.6 – Análise estatística

Os dados foram tabulados e submetidos aos testes de análise estatística Tuckey e ANOVA).

Fig. 06 - Célula com marcação pouco evidente (seta em curva). Célula com marcação evidente (seta reta). Fotomicrografia do núcleo Cli, aproximadamente 5.96mm caudalmente a partir do ponto bregma.

04-RESULTADOS

Esse estudo foi realizado com o intuito de observar a atividade dos diferentes núcleos da rafe comparando-se animais submetidos a exercício e sedentários, com os resultados que se seguem:

Peso Corpóreo

Notou-se que o peso dos animais submetidos ao protocolo moderado de natação foi menor que aquele observado em animais sedentários, fato que evidencia a diminuição da quantidade de tecido adiposo (tabela 02).

Animal	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	Semana 5	Semana 6
T1	180	195	215	230	250	280
T2	185	200	215	235	245	280
T3	175	190	220	235	250	275
T4	190	205	220	240	255	280
T5	190	205	225	240	250	275
T6	195	210	220	245	255	270
T7	180	200	220	235	250	280
T8	195	205	225	235	255	280
T9	200	215	225	235	245	270
S1	180	200	225	250	275	305
S2	190	210	230	245	275	305
S3	190	215	235	250	280	310
S4	190	210	235	245	290	320
S5	185	210	240	255	285	320
S6	185	215	235	255	285	325

Tabela 02 – Controle de peso de animais. Animais T1 a T9, animais treinados; animais S1 a S6, animais sedentários.

Análise Microscópica

Foi realizada uma análise dos núcleos da rafe em microscópio de luz, a partir da qual foi estabelecida uma contagem padronizada dos neurônios Fos-IR, onde aquelas células cuja marcação mostrou-se evidente foram consideradas para o presente estudo.

Análise Quantitativa

Os resultados observados, ou seja, o número de neurônios que expressam células Fos-imunorreativas (Fos-IR) nos diferentes núcleos da rafe em cada animal de cada grupo, foram tabulados para o cálculo do número médio de células Fos-IR (foram observados os respectivos desvios e erros padrões) em cada região encefálica, tendo-se como referência anatômica o ponto bregma.

A média, desvio e erro padrão do número de neurônios Fos-IR nos núcleos lineares (Rli e CLi) da rafe, em cada grupo experimental e nos diferentes níveis, não evidenciou marcação, fator pelo qual esses núcleos não serão mais abordados no presente estudo.

Nos resultados do núcleo DR, a tabela 03 mostra a distribuição dos neurônios Fos-IR no eixo AP, com suas respectivas média, desvio e erro padrão. Pode-se observar que o grupo T apresentou a maior quantidade de células marcadas, com média de 56,67 neurônios ($DP \pm 1,39$); seguida pelo grupo sedentário, com 47,15 neurônios ($DP \pm 1,17$), ou seja, o grupo T apresentou um número médio de células Fos-IR 29,76% maior que o grupo S. Os dois grupos apresentaram maior número de neurônios marcados na área compreendida entre 7,96 mm e 9,36 mm caudalmente a partir do ponto bregma. Essa distribuição no eixo AP e a média do número total de células por grupo estão representados, respectivamente, nas figuras 07 e 08. Nas figuras 09, 10, 11 e 12 estão representados esquemas do núcleo DR, assim como fotomicrografias de cortes coronais dos grupos experimentais.

DR	Média S	DP S	EP S		Média T	DP T	EP T
7.16	0,00	0,00	0,00		0,00	0,00	0,00
7.36	0,41	0,00	0,00		0,22	0,00	0,00
7.56	0,84	0,00	0,00		0,41	0,00	0,00
7.76	1,32	0,82	0,33		0,84	1,33	0,44
7.96	2,84	0,82	0,33		3,95	2,07	0,69
8.16	5,13	0,55	0,22		7,10	1,67	0,56
8.36	6,13	1,03	0,42		5,12	1,54	0,51
8.56	7,87	1,10	0,45		6,17	1,50	0,50
8.76	6,31	0,84	0,34		7,71	0,60	0,20
8.96	5,10	0,55	0,22		5,10	0,73	0,24
9.16	5,10	1,47	0,60		5,80	1,45	0,48
9.36	3,60	0,82	0,33		7,13	1,87	0,62
9.56	2,50	1,10	0,45		7,12	2,07	0,69

Tabela 03 – núcleo DR – distribuição dos neurônios Fos-IR no eixo ântero-posterior mostrando o número médio, erro padrão e desvio padrão dos grupos S e T.

Fig. 07 – núcleo DR – distribuição do número médio de neurônios Fos-IR no eixo ântero-posterior e erro padrão nos grupos experimentais.

Fig. 08 – núcleo DR - número total de neurônios nos grupos experimentais.

Fig. 11 núcleo DR - Fotomicrografia mostrando neurônios Fos-IR em animais do grupo S (100X).

Fig. 12 núcleo DR - Fotomicrografia mostrando neurônios Fos-IR em animais do grupo T (100X).

O número médio de células marcadas no eixo ântero-posterior do núcleo MnR com suas respectivas média, desvio e erro padrão (tabela 04) mostra que o grupo treinado apresentou a maior quantidade de marcação com 23,89 neurônios Fos-IR ($DP \pm 1,13$), ou seja, o grupo T apresentou um número médio de células Fos-IR 12,74% maior que o grupo S. No grupo sedentário, o número de células marcadas aumentou entre os níveis 7,56 mm até 8,16mm caudalmente a partir do ponto bregma, chegando a um total de 21,19 neurônios ($DP \pm 0,89$). Essa distribuição dos neurônios ativados ao longo do eixo AP e o número total de células Fos-IR nos diferentes grupos foi representada, respectivamente, nas figuras 13 e 14. Nas figuras 15, 16, 17 e 18 estão representados esquemas do núcleo MnR, assim como fotomicrografias de cortes coronais dos grupos experimentais.

MnR	Média S	DP S	EP S		Média T	DP T	EP T
7.36	1,73	0,75	0,31		0,90	0,73	0,24
7.56	4,08	0,75	0,31		3,84	1,12	0,37
7.76	4,88	0,55	0,22		7,71	0,87	0,29
7.96	5,03	0,52	0,21		5,34	0,71	0,24
8.16	5,47	0,98	0,4		6,19	1,17	0,39

Tabela 04 – núcleo MnR – distribuição dos neurônios Fos-IR no eixo ântero-posterior mostrando o número médio, erro padrão e desvio padrão dos grupos S e T.

Fig. 13 – núcleo MnR – distribuição do número médio de neurônios Fos-IR no eixo ântero-posterior e erro padrão nos grupos experimentais.

Fig. 14 – núcleo MnR - número total de neurônios nos grupos experimentais.

Fig. 15 núcleo MnR - Esquema da localização do núcleo MnR (Paxinos, 1998).

Fig. 16 núcleo MnR - Fotomicrografia, coloração em Nissl (100X).

Fig. 17 núcleo MnR - Fotomicrografia mostrando neurônios Fos-IR em animais do grupo S (100X).

Fig 18 núcleo MnR - Fotomicrografia mostrando neurônios Fos-IR em animais do grupo T (100X).

Os resultados da análise quantitativa da distribuição de neurônios ativados no eixo ântero-posterior do núcleo PMnR, com suas respectivas média, desvio e erro padrão (tabela 05), mostram que o menor número de células Fos-IR foi encontrado no grupo treinado, com 4,08 células marcadas ($DP \pm 0,44$); enquanto que o grupo sedentário, com 5,35 neurônios Fos-IR ($DP \pm 0,55$) apresentou maior número de células ativadas, ou seja, o grupo S apresentou um número médio de células Fos-IR 31,12% maior que o grupo T. Esse foi o único núcleo da rafe a apresentar um maior número médio de neurônios Fos-IR dentre todos os estudados. A maior densidade de neurônios Fos-IR concentrou-se entre os níveis 7,76 mm e 7,96 mm caudalmente a partir do ponto bregma. A distribuição no eixo AP e a comparação da média do número total de células estão representadas, respectivamente, nas figuras 19 e 20. Nas figuras 21, 22, 23 e 24 estão representados esquemas do núcleo PMnR, assim como fotomicrografias de cortes coronais dos grupos experimentais.

PMnR	Média S	DP S	EP S		Média T	DP T	EP T
7.56	1,47	0,52	0,21		0,15	0,33	0,11
7.76	1,84	0,63	0,26		1,33	0,67	0,22
7.96	1,33	0,41	0,17		1,66	0,44	0,15
8.16	0,71	0,00	0,00		0,94	0,71	0,24

Tabela 05 – núcleo PMnR – distribuição dos neurônios Fos-IR no eixo ântero-posterior mostrando o número médio, erro padrão e desvio padrão dos grupos S e T.

Fig. 19 - núcleo PMnR – distribuição do número médio de neurônios Fos-IR no eixo ântero-posterior e erro padrão nos grupos experimentais.

Fig. 20 -núcleo PMnR - número total de neurônios nos grupos experimentais.

Fig. 21 núcleo PMnR - Esquema da localização do núcleo PMnR (Paxinos, 1998).

Fig. 22 núcleo PMnR - Fotomicrografia, coloração em Nissl (100X).

Fig. 23 núcleo PMnR - Fotomicrografia mostrando neurônios Fos-IR em animais do grupo S (100X).

Fig. 24 núcleo PMnR - Fotomicrografia mostrando neurônios Fos-IR em animais do grupo T (100X).

Os resultados do núcleo PnR, ilustrando a distribuição dos neurônios Fos-IR no eixo AP, com suas respectivas média, desvio e erro padrão (tabela 06) evidenciam que o grupo treinado apresentou o maior número médio de células marcadas, com 20,18 neurônios ($DP \pm 0,67$), seguidos pelo grupo sedentário com 14,07 ($DP \pm 0,52$) neurônios marcados ou seja, o grupo T apresentou um número médio de células Fos-IR 43,42% maior que o grupo S. A maior densidade de neurônios marcados situou-se entre 8,96 mm e 9,36 mm caudalmente a partir do ponto bregma. Esta distribuição no eixo AP e a média do número total de células por grupo estão ilustradas, respectivamente, nas figuras 25 e 26. Nas figuras 27, 28, 29 e 30 estão representados esquemas do núcleo PnR, assim como fotomicrografias de cortes coronais dos grupos experimentais.

PnR	Média S	DP S	EP S		Média T	DP T	EP T
8.16	0,00	0,00	0,00		0,00	0,00	0,00
8.36	0,44	0,00	0,00		1,12	0,00	0,00
8.56	0,81	0,00	0,00		0,84	0,71	0,24
8.76	1,42	0,82	0,33		1,33	1,00	0,33
8.96	2,84	0,52	0,21		3,21	1,45	0,48
9.16	3,12	0,75	0,31		5,62	1,09	0,36
9.36	3,12	0,75	0,31		5,62	1,64	0,55
9.56	2,32	0,52	0,21		2,44	1,41	0,47

Tabela 06 – núcleo PnR – distribuição dos neurônios Fos-IR no eixo ântero-posterior mostrando o número médio, erro padrão e desvio padrão dos grupos S e T.

Fig. 25 - núcleo PnR – distribuição do número médio de neurônios Fos-IR no eixo ântero-posterior e erro padrão nos grupos experimentais.

Fig. 26 -núcleo PnR - número total de neurônios nos grupos experimentais.

Fig. 29 núcleo PnR - Fotomicrografia mostrando neurônios Fos-IR em animais do grupo S (100X).

Fig. 30 núcleo PnR - Fotomicrografia mostrando neurônios Fos-IR em animais do grupo T (100X).

Os resultados da distribuição de células Fos-IR ao longo do núcleo RMg, com suas respectivas média, desvio e erro padrão (tabela 07), mostram que o grupo treinado apresentou a maior quantificação, com 42,68 neurônios marcados ($DP \pm 0,88$); seguido pelo grupo sedentário com 36,09 ($DP \pm 0,89$), ou seja, o grupo T apresentou um número médio de células Fos-IR 18,25% maior que o grupo S. A maior parte dos neurônios marcados situou-se entre os níveis 10,56 mm e 11,56 mm caudalmente a partir do ponto bregma. Esses resultados estão ilustrados de forma gráfica na figuras 31 e 32, evidenciando, respectivamente, a distribuição das células marcadas e o número total de células por grupo. Nas figuras 33, 34, 35 e 36 estão representados esquemas do núcleo RMg, assim como fotomicrografias de cortes coronais dos grupos experimentais.

RMg	Média S	DP S	EP S		Média T	DP T	EP T
9.16	0,00	0,00	0,00		0,00	0,00	0,00
9.36	0,00	0,00	0,00		0,00	0,00	0,00
9.56	0,31	0,00	0,00		0,40	0,00	0,00
9.76	0,00	0,00	0,00		0,21	0,00	0,00
9.96	0,39	0,41	0,17		0,71	1,33	0,44
10.16	1,51	0,89	0,37		2,81	2,00	0,67
10.36	4,33	0,55	0,22		4,00	2,05	0,68
10.56	5,38	0,98	0,40		5,81	1,87	0,62
10.76	7,97	1,75	0,71		6,21	1,87	0,62
10.96	4,93	1,03	0,42		6,12	1,59	0,53
11.16	3,80	0,00	0,00		7,33	1,54	0,51
11.36	3,91	0,89	0,37		5,41	2,15	0,72
11.56	1,94	0,84	0,34		2,84	2,40	0,80
11.76	1,62	0,63	0,26		0,83	1,13	0,38

Tabela 07 – núcleo RMg – distribuição dos neurônios Fos-IR no eixo ântero-posterior mostrando o número médio, erro padrão e desvio padrão dos grupos S e T.

Fig. 31 - núcleo RMg – distribuição do número médio de neurônios Fos-IR no eixo ântero-posterior e erro padrão nos grupos experimentais.

Fig. 32 -núcleo RMg - número total de neurônios nos grupos experimentais.

Fig. 33 núcleo RMg - Esquema da localização do núcleo RMg (Paxinos, 1998).

Fig. 34 núcleo RMg - Fotomicrografia, coloração em Nissl (100X).

Fig. 35 núcleo RMg - Fotomicrografia mostrando neurônios Fos-IR em animais do grupo S (100X).

Fig. 36 núcleo RMg - Fotomicrografia mostrando neurônios Fos-IR em animais do grupo T (100X).

Na análise da distribuição das células marcadas no eixo AP do núcleo RPa, com suas respectivas média, desvio e erro padrão (tabela 08), foi observado que o grupo treinado apresentou 57,74 células Fos-IR ($DP \pm 1,13$), a maior densidade de marcação dentre os núcleos da rafe. No grupo sedentário foram encontrados 44,40 neurônios ativados ($DP \pm 1,17$), ou seja, o grupo T apresentou um número médio de células Fos-IR 30,04% maior que o grupo S. Em ambos os grupos experimentais, houve maior densidade de neurônios Fos-IR entre os níveis 11,56 mm e 13,56 mm caudalmente a partir do ponto bregma. Esses resultados estão representados, respectivamente, nas figuras 37 e 38, evidenciando a distribuição no eixo AP, o número médio total de células e seus respectivos erros padrão. Nas figuras 39, 40, 41 e 42 estão representados esquemas do núcleo RPa, assim como fotomicrografias de cortes coronais dos grupos experimentais.

RPa	Média S	DP S	EP S		Média T	DP T	EP T
9.76	0,00	0,00	0,00		0,00	0,00	0,00
9.96	0,00	0,00	0,00		0,00	0,00	0,00
10.16	0,00	0,00	0,00		0,00	0,00	0,00
10.36	0,12	0,00	0,00		0,21	0,00	0,00
10.56	0,12	0,00	0,00		0,21	0,00	0,00
10.76	0,12	0,00	0,00		0,21	0,00	0,00
10.96	0,30	0,00	0,00		0,21	0,00	0,00
11.16	0,50	0,52	0,21		0,41	0,67	0,22
11.36	0,81	0,63	0,26		0,21	0,33	0,11
11.56	1,91	0,75	0,31		0,54	0,50	0,17
11.76	2,83	1,05	0,43		0,54	0,50	0,17
11.96	3,12	1,03	0,42		1,89	1,73	0,58
12.16	4,42	0,75	0,31		4,21	1,00	0,33
12.36	4,42	0,82	0,33		5,21	1,48	0,49
12.56	3,20	0,75	0,31		4,54	0,93	0,31
12.76	5,99	0,75	0,31		6,00	1,48	0,49
12.96	2,47	0,52	0,21		7,31	1,58	0,53
13.16	2,47	0,52	0,21		4,94	1,48	0,49
13.36	2,13	0,82	0,33		5,16	0,87	0,29
13.56	2,81	0,55	0,22		5,00	1,22	0,41
13.76	2,47	0,82	0,33		4,47	1,45	0,48
13.96	1,33	0,82	0,33		4,94	2,24	0,75
14.16	1,53	0,98	0,40		1,12	1,30	0,43
14.36	1,33	0,52	0,21		0,41	0,44	0,15

Tabela 08 – núcleo RPa – distribuição dos neurônios Fos-IR no eixo ântero-posterior mostrando o número médio, erro padrão e desvio padrão dos grupos S e T.

Fig. 37- núcleo RPa – distribuição do número médio de neurônios Fos-IR no eixo ântero-posterior e erro padrão nos grupos experimentais.

Fig. 38 -núcleo RPa - número total de neurônios nos grupos experimentais.

Fig. 39 núcleo RPa - Esquema da localização do núcleo RPa (Paxinos, 1998).

Fig. 40 núcleo RPa - Fotomicrografia, coloração em Nissl (100X).

Fig. 41 núcleo RPa - Fotomicrografia mostrando neurônios Fos-IR em animais do grupo S (100X).

Fig. 42 núcleo RPa - Fotomicrografia mostrando neurônios Fos-IR em animais do grupo T (100X).

Os resultados da distribuição de células marcadas ao longo do eixo AP do núcleo RO_b, com suas respectivas média, desvio e erro padrão, (tabela 09), evidenciaram a maior densidade de células marcadas no grupo treinado, com 23,98 neurônios (DP $\pm$ 0,71). No grupo sedentário foi encontrada uma média de 19,70 neurônios (DP $\pm$ 0,82), ou seja, o grupo T apresentou um número médio de células Fos-IR 21,72% maior que o grupo S. A maior densidade de células marcadas ocorreu entre os níveis 12,56 mm e 13,56mm caudalmente a partir do ponto do bregma. Esses resultados estão representados, respectivamente, nas figuras 43 e 44, evidenciando a distribuição no eixo AP. Nas figuras 45, 46, 47 e 48 estão representados esquemas do núcleo RO_b, assim como fotomicrografias de cortes coronais dos grupos experimentais.

RO _b	Média S	DP S	EP S		Média T	DP T	EP T
11.16	0,00	0,00	0,00		0,00	0,00	0,00
11.36	0,00	0,00	0,00		0,00	0,00	0,00
11.56	0,00	0,00	0,00		0,41	0,00	0,00
11.76	0,21	0,00	0,00		0,21	0,00	0,00
11.96	0,21	0,00	0,00		0,21	0,00	0,00
12.16	0,21	0,00	0,00		0,21	0,00	0,00
12.36	0,54	0,52	0,21		1,21	0,73	0,24
12.56	1,18	0,52	0,21		1,44	1,12	0,37
12.76	1,54	0,41	0,17		3,89	0,87	0,29
12.96	2,36	0,84	0,34		4,33	1,41	0,47
13.16	3,84	0,89	0,37		2,83	1,01	0,34
13.36	3,23	0,41	0,17		1,94	0,88	0,29
13.56	1,94	0,52	0,21		1,88	1,05	0,35
13.76	1,83	0,41	0,17		2,83	1,81	0,60
13.96	1,54	0,52	0,21		1,77	1,05	0,35
14.16	0,86	0,52	0,21		0,41	0,44	0,15
14.36	0,21	0,00	0,00		0,41	0,00	0,00

Tabela 09 – núcleo RO_b – distribuição dos neurônios Fos-IR no eixo ântero-posterior mostrando o número médio, erro padrão e desvio padrão dos grupos S e T.

Fig. 43- núcleo ROb – distribuição do número médio de neurônios Fos-IR no eixo ântero-posterior e erro padrão nos grupos experimentais.

Fig. 44 -núcleo ROb - número total de neurônios nos grupos experimentais.

Fig. 45 núcleo ROb - Esquema da localização do núcleo ROb (Paxinos, 1998).

Fig. 46 núcleo ROb - Fotomicrografia, coloração em Nissl (100X).

Fig. 47 núcleo ROb - Fotomicrografia mostrando neurônios Fos-IR em animais do grupo S (100X).

Fig. 48 núcleo ROb - Fotomicrografia mostrando neurônios Fos-IR em animais do grupo T (100X).

O grupo treinado apresentou maior densidade de células Fos-IR nos núcleos da rafe em comparação ao grupo sedentário, apresentando, em média, uma variação entre 12,74% e 43,42% maior, com exceção feita a média observada no núcleo PMnR, onde a maior média foi observada no grupo S (31,12% maior em relação ao grupo T). Apesar desse fato, estatisticamente os dados são considerados praticamente iguais.

O núcleo RPa apresentou o maior número médio de células ativadas, evidenciado através da contagem dos neurônios Fos-IR: (57,74 no grupo T e 44,4 no grupo S); seguido pelo núcleo DR (56,67 no grupo T e 47,15 no grupo S), RMg (42,68 no grupo T e 36,09 no grupo S), ROb (23,98 no grupo T e 19,70 no grupo S), MnR (23,89 no grupo T e 21,19 no grupo S) e PnR (20,18 no grupo T e 14,07 no grupo S).

No núcleo PMnR foi observada, contrariamente aos demais grupos, um maior número médio de células ativadas no grupo S em relação ao grupo T (5,35 e 4,08 respectivamente).

Dentre os grupos experimentais, os núcleos RPa e DR apresentaram os maiores números totais de células Fos-IR e os núcleos PmR e PnR apresentaram os menores números totais de células Fos-IR, excluindo-se os números dos núcleos lineares (Rli e CLi).

Análise estatística

A análise estatística ANOVA e teste Tuckey evidenciaram diferenças entre os diferentes núcleos em relação ao treinamento, considerando-se os grupos de animais treinados e sedentários, sendo que os grupos experimentais não apresentaram diferença significativa quando comparadas as médias entre si.

No núcleo PMnR foi observada a menor expressão de neurônios Fos-IR em relação a todos os outros núcleos, considerando-se ambos os grupos experimentais ($p < 0,005$).

No núcleo RPa foi observada a maior expressão de neurônios Fos-IR em relação a todos os outros núcleos, considerando-se ambos os grupos experimentais ($p < 0,005$).

A figura 49 mostra a média do número total de células em cada núcleo da rafe nos diferentes grupos experimentais e seus respectivos erros padrão. Essa distribuição dos neurônios está representada ao longo do eixo AP, onde no eixo X foram representados os diferentes núcleos da rafe, e no eixo Y o número médio de células marcadas com seus respectivos erros padrões.

05- DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo demonstram que estimulações fisiológicas como, por exemplo, natação moderada, induzem a produção da proteína Fos nos neurônios localizados nos núcleos da rafe. Entretanto, tanto a atividade locomotora quanto o estresse podem estar envolvidos nessa estimulação fisiológica, portanto é difícil distinguirmos completamente os efeitos dos dois fatores.

Alguns experimentos relatam aumento da atividade fisiológica no sistema nervoso central relacionados ao estresse (FREED, 1985; HATTORI, 1994; SABOL, 1990; SPECIALE, 1986), enquanto outros estudos, também relacionados ao estresse, demonstram uma diminuição da atividade fisiológica no sistema nervoso central (SCHARTING, 1987; SZOSTAK, 1986; INOUE, 1994). A expressão da proteína Fos é praticamente ausente ou muito pequena, no que se refere aos núcleos da rafe, quando o estímulo externo é ausente ou pouco eficiente (MORGAM, 1991), fato evidenciado em nosso laboratório (Pinato, 2002), motivo pelo qual não foi utilizado um grupo basal de controle.

Padrões de atividade crônica, assim como treinamento prolongado, podem determinar adaptações evidentes tanto no sistema nervoso quanto no sistema muscular (ENOKA, 1997). A natação tem sido relatada como um tipo moderado de exercício e é muito semelhante aos esforços típicos de ratos quando estes se encontram em condições naturais (OSTMAN-SMITH, 1979). Na maior parte dos estudos, somente ratos machos foram observados pelo fato de serem modelos mais estáveis, tendo em vista não apresentarem alterações endócrinas relacionadas à função reprodutora, fato que

influencia o metabolismo central de serotonina (GOODMAN, 1974; HENINGER, 1987).

Os núcleos da rafe constituem a mais evidente fonte de serotonina no sistema nervoso central. Alguns estudos relatam que o exercício físico provocou aumento do nível de serotonina no sistema nervoso central, especificamente no tronco encefálico (mesencéfalo, ponte e medula oblonga) no que se refere aos núcleos da rafe, principais estruturas serotoninérgicas. Essa mudança pode estar relacionada ao aumento da atividade motora e ao estresse dos animais quando expostos pela primeira vez a este processo de atividade física, descrevendo um aumento de até 13% na quantidade de serotonina no encéfalo (BARCHAS, 1963).

É fato que o exercício constitui fonte de estresse em mecanismos homeostáticos e ainda é fonte de estresse expresso fisiologicamente, por exemplo, na ansiedade, determinando respostas cardiorrespiratórias (WATT, 1993).

O paradigma de que o treinamento físico determina adaptações anatômicas e fisiológicas semelhantes em exercícios diferentes realizados em diferentes grupos de animais, foi observado também em animais submetidos ao exercício na roda de atividade realizado espontaneamente, em que o estresse foi reduzido ao máximo (LAMBERT, 1990).

Ratos treinados de acordo com o protocolo moderado de natação apresentam adaptações evidentes no metabolismo serotoninérgico em ambos os hemisférios cerebrais, assim como no tronco encefálico, sugerindo que o exercício moderado de longa duração ativa não somente o metabolismo como também a síntese de serotonina nesta região. Além disso, essa adaptação facilitatória permanece após 1 semana do término do treinamento (PARNAVELAS, 1989). Efeitos semelhantes foram observados após 8

semanas de treinamento em esteira (BROWN, 1979; DEY, 1992). Os ratos do grupo T adaptaram-se ao exercício na água antes do início do treinamento. Essa adaptação consistiu em posicionar os animais na água, cuja temperatura foi medida previamente, durante uma semana, uma vez ao dia durante 30 minutos, permitindo-se que o animal encostasse no fundo do tanque de treinamento, não necessitando, dessa maneira, exercitar-se. Com essa atitude prévia, houve redução do estresse e adaptação ao treinamento físico.

É fato que o núcleo PnR e o cerebelo apresentam projeções recíprocas (BLANCKS, 1990), sendo que este último está envolvido no controle dos movimentos voluntários e na aprendizagem motora. Também estão relacionados á motricidade os núcleos ROb e DR, sendo que este último envia projeções para o ROb principalmente de sua porção mais rostral (DRr) (RIBEIRO do VALLE, 1997).

A organização somatotópica não é permanente, ou seja, apresenta uma plasticidade ou, nesse caso, uma neuroplasticidade, que pode ser alterada, por exemplo, durante a aprendizagem motora, como observado em estudos com animais em que a realização de tarefas motoras repetitivas mostrou-se fundamental para a reabilitação motora de lesões induzidas nas regiões do córtex motor primário correspondentes à mão e aos dedos. Desse modo, o aspecto característico dos movimentos voluntários se aperfeiçoa com a prática, como demonstram estudos *in vivo* observados através de exames de ressonância magnética (De KARNI, 1995).

Essa neuroplasticidade é potencializada pelo exercício físico, e experimentos demonstram que níveis basais de atividade neuromuscular são fundamentais na manutenção de níveis normais de fatores neurotróficos derivados do encéfalo (brain-derived neurothrophic factor BDNF) (GOMEZ-PINILLA, 2002).

O efeito da perda de peso pela diminuição do tecido adiposo abdominal, notado em indivíduos submetidos a treinamento físico moderados prolongados, evidencia uma diminuição do risco de doenças e de recuperação do peso perdido através de dietas hipocalóricas (MAYO, 2003). O treinamento físico promove também o controle da glicemia e a diminuição da pressão arterial (STEWART, 2002). A hipertrofia muscular, induzida através de treinamento físico de longa duração, promove uma diminuição dos triglicérides presentes na corrente sanguínea de homens infectados com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) tratados com terapia anti-viral (YARASHESKI, 2001).

Atividades locomotoras induzem mudanças na atividade respiratória e cardiovascular proporcionais ao exercício físico realizado. Em ratos hipertensos, uma deficiência do neuromodulador inibitório ácido γ -aminobutírico (GABA) contribui para elevar os níveis de pressão arterial, relacionando uma função GABAérgica no controle da neuroplasticidade relacionada ao exercício (KRAMER, 2002).

Existem efeitos benéficos causados pelo aumento da saúde cardiovascular determinados pelo exercício físico, promovendo alterações nas regiões de controle central da pressão arterial em ratos hipertensos (KRAMER, 2002).

O aumento do fluxo sanguíneo no cérebro observado quando áreas do córtex motor estão envolvidas em um determinado comportamento indica que a perfusão tecidual influencia a atividade neural, fato observado através da injeção de xenônio radioativo (ROLAND, 1980).

Dados imuno-histológicos indicam que o exercício físico induz a um grande aumento de capilares sanguíneos (angiogênese) 30 dias a partir do início do treinamento, mas somente na região específica do córtex motor primário relacionado àquele determinado exercício e não nas demais áreas corticais, indicando mudanças na

perfusão ou nas estruturas capilares somente em áreas específicas do córtex motor. Portanto, conclui-se que o aumento do número de capilares ocorre em áreas motoras do córtex cerebral como uma adaptação à atividade motora prolongada, e essas mudanças são crônicas e observadas mesmo em animais anestesiados e estudados por técnicas não-invasivas (SWAIN, 2003).

O núcleo PnR está intimamente associado a vasos sangüíneos, tornando-o suscetível ao maior aporte de f-TRP e TRP quando de um treinamento físico prolongado (SCHEIDEL, 1975).

Exercícios físicos aumentam a síntese e o metabolismo central de serotonina, uma vez que promovem aumento da taxa de f-TRP e BCAA durante e, principalmente, particularmente depois do exercício físico prolongado (MEEDES, 1995; NYBO, 2003; SOARES, 2003). Esse aumento da oferta do aminoácido precursor da serotonina favorece o transporte de TRP para o encéfalo e conseqüentemente, a síntese e liberação da serotonina (BLOMSTRAND, 2001). Foi relatado um aumento de 14% de serotonina e 44% de 5-HIAA no tronco encefálico de ratos treinados durante 11 semanas (BLOMSTRAND, 1989).

A contagem dos neurônios Fos-IR individualmente realizada em cada núcleo da rafe, utilizando-se as séries processadas com técnicas de imuno-histoquímica, demonstrou resultados de acordo com a literatura, podendo, no entanto, ser revista no futuro.

Os dados obtidos neste estudo permitem, de forma pioneira, distinguir a participação individualizada dos núcleos da rafe nas respostas homeostáticas de ratos machos jovens submetidos a exercício físico prolongado, por técnicas de imuno-histoquímica.

Este estudo abre perspectivas para futuras abordagens dessa questão mediante pesquisas com traçadores a fim de eliciar as conexões aferentes e eferentes dos núcleos da rafe relacionados ao treinamento físico prolongado.

06 – CONCLUSÕES

- 1- Houve adaptação comportamental e fisiológica dos animais treinados frente ao protocolo moderado de natação, fato observado pelo menor esforço realizado a cada sessão, validando assim o modelo para o presente estudo,
- 2- O exercício físico induz expressão diferenciada de proteína Fos nos vários núcleos da rafe relacionados à motricidade em ratos treinados e sedentários,
- 3- Os núcleos Rli e Cli não apresentaram expressão da proteína Fos em ambos os grupos e,
- 4- Este estudo permitiu distinguir, de forma inédita, a participação diferenciada dos vários núcleos da rafe comparando-se animais sedentários e treinados pelo protocolo moderado de natação, abrindo perspectivas para novas abordagens dessa questão.

07. ANEXOS

Seqüência de procedimentos para reações imuno-histoquímicas em microscopia de luz.

Os cortes coronais efetuados por criomicrotomia, e conservados em solução anti-congelante passam pelas seguintes etapas.

1. Lavar os cortes 3x10min. em KPBS
2. Colocar os cortes por 10 min. em solução de 50ml de H₂O₂ 30% ,para a redução da marcação de fundo neutralizando a peroxidase endógena .
3. Lavar os cortes 3x10min. em KPBS
4. Deixar de 6 à 8 min. em boridreto de sódio à 1% (50ml de KPBS + 0,5g de boridreto de sódio), para promover a remoção de eventuais grupos de aldeídos livres decorrentes do fixador .
5. Lavar em KPBS por 5min. e depois em séries de 10 min. até que não se tenha mais bolhas.
6. Preparar o anticorpo primário: 1µl de anti-fos (1:10.000) de coelho em 10 ml de KPBS+TRITON + 200µl de soro de cabra (NGS).

O soro normal de cabra bloqueia sítios falsos para a ligação do anticorpo secundário e o Triton abre espaços na membrana das células facilitando a ação dos anticorpos e reagentes.

7. Incubação dos cortes no anticorpo primário em agitador orbital protegido da luz por 48 hs.
8. Lavar os cortes 3x10min. em KPBS
9. Preparar o anticorpo secundário: 45µl de biotinilado + 10ml de KPBS +TRITON.

10. Incubação dos cortes no anticorpo secundário em agitador orbital protegido da luz por 1h30min.
 11. Lavar os cortes 3x10min. em KPBS
 12. Preparar o ABC : 10ml de KPBS + 45µl da solução B + 45µl da solução A. A avidina (reagente A) possui 4 sítios de ligação para biotina (reagente B). Um deles liga-se a biotina do anticorpo secundário e os demais são preenchidos por biotinas livres.
 13. Incubação dos cortes no ABC em agitador orbital protegido da luz por 1h30min.
 14. lavar em KPBS 2x10min.
 15. lavar em Na Acetato 0,1M pH 6,0 2x10min.
- A reação da peroxidase é mais efetiva em pH 6,0.
16. Preparar a reação com o DAB
 17. Colocar os tecidos no DAB e agitar até que fique com a cor marrom claro/púrpura.
tempo varia de acordo com a velocidade da reação
 18. lavar em Na Acetato 0,1M pH 6,0 2x10min. Para neutralizar a reação do DAB.
 19. lavagem em KPBS 2x10min.
 20. Montar os cortes em lâminas gelatinizadas com sulfato crômico de alumínio e secar em estufa a 37° C por uma noite.

Seqüência para contraste com o ósmio

1. Da DH₂O para o Xilol - 3 minutos cada etapa (de 1 à 10) - deixar 30 minutos no Xilol para a diafanização dos cortes.
2. Do Xilol para a DH₂O - 2 minutos cada etapa (de 10 à 1)
3. Mergulhar as lâminas algumas vezes em BCW (água bidestilada deionizada)
4. Colocar 30 minutos no ósmio – 300 µl de Tetróxido de ósmio 4% + 300 ml de DH₂O
5. Lavar 15 minutos em água corrente
6. Deixar 5 minutos em BCW
7. Deixar 15 minutos em TCH - *****
8. Lavar 15 minutos em água corrente
9. Colocar 30 minutos no ósmio
10. Lavar 15 minutos em água corrente
11. Da DH₂O para o Xilol - 3 minutos cada etapa (de 1 à 10)
12. Montagem da lamínula com DPX.

Seqüência para coloração em Nissl (Tionina)

1. Da DH₂O para o Xilol - 3 minutos cada etapa (de 1 à 10) - deixar 30 minutos no Xilol para a diafanização dos cortes.
2. Do Xilol para a DH₂O - 2 minutos cada etapa (de 10 à 1)
3. Mergulhar as lâminas em Tionina por alguns segundos
4. Da DH₂O para o Xilol - 2 minutos cada etapa (de 1 à 10)
5. Montagem da lamínula com DPX.

Relação das substâncias químicas utilizadas e seus fabricantes

1. β -d glicose –Sigma lot:48H0221
2. ABC KIT -Vectastain
3. Acetato de Sódio Sigma lote :108H0062
4. Acroleína - Sigma lote: 125 H 3636
5. Álcool etílico PA - Merck
6. Anticorpo primário, anti (rabbit) FOS - Pc38, Ab-5 Oncogen
7. Anticorpo secundário biotilado-Anti Rabbit IgG,H&L Ch.- 401313
8. Bórax - Synth lote :35900
9. Borohidreto de Sódio – Sygma lote:83H3437
10. Cloreto de amônio - AMRESCO lot: 3519A41
11. Glucose oxidase - AMRESCO lot: 2639A73
12. Hidrato de cloral – Carlo Erba 334085
13. NGS – “Normal Goat Serum” - Soro normal de cabra - Vector lote:K0302
14. Nickel amonium sulfato - Fisher Scientific lot: 985462
15. Paraformaldeido – Synth lote :35848
16. Sacarose- Synth lote: 35826
17. TCH-Thiocarbohydrazide lote: 58F0202
18. Tetróxido de ósmio - Sigma lote : 17H3453 Osminum tetroxide
19. Xilol-Synth lote:36927

Fig. 50 – pinçamento da cauda do animal.

Fig. 51 – imobilização da cabeça do animal.

Fig. 52 - exposição do apêndice xifóide.

Fig. 53 – fixação do apêndice xifóide e costelas.

Fig. 54 – exposição do coração.

Fig. 55 - introdução da cânula da bomba peristáltica até a artéria aorta, passando pela valva da aorta.

08- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AMERICAN COLLEGE OF SPORTS MEDICINE. The recommended quantity and quality of exercise for developing and maintaining fitness in healthy adults, *Med Sci Sports*. 10(3):vii-x. 1978.
2. AMERICAN HEART ASSOCIATION. Statement on exercise: benefits and recommendations for physical activity programs for all Americans. *Circulation*, 94:857-862. 1996.
3. ASMUSSEN, E.; B. MAZIN. A central nervous component in local muscular fatigue. *Eur J Appl Physiol*. 38:9-15. 1978.
4. BAKER K. G.; HALLIDAY G. M. Ascending noradrenergic and serotonergic systems in the human brainstem. Neurotransmitters in the human brain. Edited by D. J. Tracey *et al*. Plenum Press, New York. 1995.
5. BARCHAS J. D.; FREEDMAN D. Y. Brain amines: response to physiological stress. *Biochem Pharmacol*. 12:1232-5. 1963.
6. BELANGER M.; DREW T.; ROSSIGNOL S. Spinal locomotion: a comparison of the kinematics and the electromyographic activity in the same animal before and after spinalization. *Acta Biol Hung*. 39(2-3):151-4. 1988.
7. BLAIR, S. N.; N. N. GOODYEAR; L. W. GIBBONS AND COOPER. Physical fitness and incidence of hypertension in healthy normotensive men and women. *JAMA*. 252:487-490. 1984.
8. BLANCKS R. H. Afferents to cerebellar flocculus in cat with special reference to pathways conveying vestibular, visual (optokinetic) and oculomotor signals. *J Neurocytol*. 19(5):628-42. 1990.

9. BLOMSTRAND E.; PERRETT D.; PARRY-BILLINGS M.; NEWSHOLME E. A. Effect of sustained exercise on plasma amino acid concentrations and on 5-hydroxytryptamine metabolism in six different brain regions in the rat. *Acta Physiol Scand.* 136(1-2):473-81. 1989.
10. BLOMSTRAND E. Amino acids and central fatigue. *Amino Acids.* 20(1):25-34. 2001.
11. BRADLEY S. R.; WANG W.; RICHERSON G. B. Quantification of the response of rat medullary raphe neurons to independent changes in pH (o) and P (CO₂). *J Physiol.* 540(pt 3):951-70. 2002.
12. BRINES, R.; HOFFMANGOETZ L.; PEDERSEN B. K. Can exercise to make your immune system fitter? *Trends Immunology today.* 17. pp. 252-60. 1996.
13. BRODAL A. A formação reticular e alguns núcleos correlatos. Em *Anatomia neurológica com correlações clínicas.* pp:317-60. 1984.
14. BROWN B. S.; PAYNE T.; KIM C.; MOORE G.; KREBS P.; MARTIN W. Chronic responses of rat brain norepinephrine and serotonin levels to endurance training. *J Appl Physiol.* 46(1):19-23. 1979.
15. CALABRESE R. L. Cellular, synaptic, network, and modulatory mechanisms involved in rhythm generation. *Curr Opin Neurobiol* 8:710-717. 1998.
16. CHEN L.; MARK GLOVER J. N.; HOGAN, P. G.; RAO A.; HARRISON S. C. Structure of the DNA-binding domains from NFAT, Fos and Jun bound specifically to DNA. *Nature.* 392(5):42-8. 1998.
17. CIRELLI C. E.; TONONI G. On the functional significance of c-fos induction during the sleep-waking cycle. *Sleep.* 15;23(4):453-69. 2000.
18. COSTILL, D.L.; LAMBERT, S. BARR; FINK, W. J. Adaptations to swimming training: influence of training volume. *Med Sci Sports Exerc.* 23(3):371-7. 1991.

19. COYLE, E. F. Integration of the physiological factors determining endurance performance ability. *Exercise and sport Sciences Reviews*, vol 23. Baltimore: Williams & Wilkins, pp. 25-63. 1995.
20. CURRAN T.; N. M. TEICH. Candidate product of the FBJ murine osteosarcoma virus oncogene: Characterization of a 55.000 dalton phosphoprotein. *J Virol.* 42:114-22. 1982.
21. DANIELS, J.; R. FITTS; G. SHEEHAN. *Conditioning for Distance Running*. New York: John Wiley. 1978.
22. DEY S.; INGH R. H.; DEY P. K. Exercise training: significance of regional alterations in serotonin metabolism of the rat brain in relation to antidepressant effect of exercise. *Physiol Behav.* 52(6):1095-9. 1992.
23. DISHMAN, R. K. Physical activity and mental health. In: Friedman, H. (ed.) *Encyclopedia of Mental Health*, Orlando, FL: Academic Press. Vol 3:171-188. 1998.
24. DISHMAN, R. K. The impact of behavior on quality life. *Qual Life Res* 12 (Suppl. 1):43-9. 2003.
25. DISHMAN R. K. Compliance/adherence in health related exercise. *Health Psychol.* 1:237-67. 1982.
26. DWYER D.; BROWNING J. Endurance training in Wistar rats decreases receptor sensitivity to a serotonin agonist. *Acta Physiol Scand.* 170(3):211-6. 2000.
27. ENOKA R. M. Neural adaptations with chronic physical activity. *J Biomechanics.* 30(5):447-55. 1997.
28. FOO H.; MASON P. Brainstem modulation of pain during sleep and waking. *Sleep Med Rev.* 7(2):145-54. 2003.

29. FOX, E.; R. BARTELS; C. BILLINGS; D. K. MATHEWS; R. BASON; D. WEBB. Intensity and distance on interval training programs and changes in aerobic power. *Med Sci Sports*. 5(1):18-22. 1973.
30. FOX, E.; R. BARTELS; C. BILLINGS; R. O'BRIEN; R. BASON; D. K. MATHEWS. Frequency and duration of interval training programs and changes in aerobic power. *J Appl Physiol*. 38(3):481-4. 1975.
31. FREED C. R.; YAMAMOTO B. K. Regional brain dopamine metabolism: a marker for the speed, direction and posture of moving animals. *Science*. 229:62-5. 1995.
32. GANDEVIA, S. C.; G. M. ALLEN; D. K. MCKENZIE. Central fatigue. Critical issues, quantitation and practical implications. *Adv Exp Med Biol*. 384:281-94. 1995
33. GETTMAN, L. R. Economic benefits of physical activity. *Physical Activity and Fitness Research Digest*. 2:1-6. 1996.
34. GETTMAN, L. R.; POLLOCK M. L.; DURSTINE J. L.; WARD A.; AYRES J.; LINNERUD A. C. Physiological responses of men to 1, 3 and 5 day per week training programs. *Res Q*. 47(4):638-46. 1976.
35. GIMÉNEZ Y RIBOTTA M.; PROVENCHER J.; FERABOLI-LOHNHERR D; ROSSIGNOL S; PRIVAT A. E; ORSAL D. Activation of locomotion in adult chronic spinal rats is achieved by transplantation of embryonic raphe cells reinnervating a precise lumbar level. *J Neurosci*. 20(12):5144-52. 2000.
36. GOLDSPIK G. Maleability of the motor system: a comparative approach. *J Exp Biol*. 115:375-91. 1985.

37. GOLLNICK, P. D.; TIMSON B. F.; MOORE R. L.; RIEDY M. Muscular enlargement and numbers of fibers in skeletal muscles of rats. *J.Appl Physiol.* 50(5):936-43. 1981.
38. GOMEZ-PINILLA F.; YING Z.; ROY R. R.; MOLTENI R.; EDGERTON V. R. Voluntary exercise induce a BDNF-Mediated mechanism that promotes neuroplasticity. *J Neurophysiol.* 88(5):2187-95. 2002.
39. GOODMAN, H. M. In: Mountcastle V. D. Ed. *Reproduction in Medical Physiology*. Vol 13. St Louis: Mosby, 1741-75. 1974.
40. GORDON, T.; M. C. PATTULLO. Plasticity of muscle fiber and motor unit types. *Exer Sports Sci Rev.* 21:221-362. 1993.
41. GRILLNER S. Control of locomotion in bipeds, tatrapods and fish. *Handbook of Physiology*, pp 1179-1236. Bethesda: Am Physiol Soc. (1981).
42. HALBERSTADT A. L.; BALABAN C. D. Organization of projections from the raphe nuclei to the vestibular nuclei in rats. *Neuroscience.* 120(2):573-94. 2003.
43. HATTORI S.; NAOI M.; NISHINI H. Striatal dopamine turnover during treadmill running in the rat: relation to the speed of running. *Brain Res Bull.* 35:41-9. 1994.
44. HAY-SCHMIDT A.; VRANG N.; LARSEN P. J.; MIKKELSEN J. D. Projections from the raphe nuclei to the suprachiasmatic nucleus of the rat. *J Chem Neuroanat.* 25(4):293-310. 2003.
45. HELMRICH, S. P.; RAGLAND D. R.; LEUNG R. W.; PAFFENBARGER R. S. Jr. Physical activity and reduced occurrence of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *New England J Med.* 325:147-152. 1991.

46. HENINGER G. R.; CHARNEY D. S. Mechanism of action of antidepressant treatments: Implications for the etiology and treatment of depressive disorders. In: Meltzer, H. Y. Ed. *Psychopharmacology: The third generation of progress*. New York: Raven Press, 535-44. 1987.
47. HOFFMAN G. E.; LYO D. Anatomical markers of activity in neuroendocrine systems: are we all 'Fos-ed out'? *Journal of neuroendocrinology*. 14:459-62. 2002.
48. HOLSTEGE J. C.; KYUPERS H. G. Brainstem projections to spinal motoneurons: an update. *Neuroscience*. 23(3):809-21. 1987.
49. HOLSTEGE G. The basic, somatic and emotional components of the motor system in mammals. *The Rat Nervous System*, second edition. Academic Press, Inc. 1995.
50. INOUE T.; TSUCHIYA K.; KOYAMA T. Regional changes in dopamine and serotonin activation with various intensity of physical and psychological stress in the rat brain. *Pharmacol Biochem Behav*. 49:911-20. 1994.
51. JACKSON, J.; SHARKEY B.; JOHNSTON L. Cardiorespiratory adaptations to training and specified frequencies. *Res Q*. 39:295-300. 1968.
52. JACOBS B. L.; FORNAL C. A. 5-HT and motor control: a hypothesis. *Trends in Neuroscience*. 9:346-52. 1993.
53. JACOBS B. L.; AZMITIA E. C. Structure and function of the brain serotonin system. *Physiol. Rev*. 72:165-229. 1992.
54. JONES A. M.; CARTER H. The effect of endurance training on parameters of aerobic fitness. *Sports Med*. 29:373-6. 2000.
55. KALASKA J. F.; CRAMMOND D. J. Cerebral cortical mechanisms of reaching movements. *Science*. 20;255(5051):1517-23. 1992.
56. KANDEL E. R.; SCHWARTZ J. H.; JESSELL T. M. *Princípios da Neurociência*. 4ª edição. Editora Manole Ltda. Barueri, São Paulo, Brasil. 2003.

57. KARNI A., MEYER G.; JEZZARD P.; ADAMS M. M.; TURNER R.; UNGERLIEDER L. G. Functional MRI evidence for adult motor cortex plasticity during motor skill learning. *Nature*. 377:155-8. 1995.
58. KIEHN O.; HOUNSGAARD J.; SILLAR K. T. Basic building blocks of vertebrate spinal central pattern generators. In: *Neurons, Network and Motor Behavior*, edited by Stein P. S. G., Selverston A. e Stuart D. G. Cambridge, MA: MIT Press, pp. 47-59. 1997.
59. KNUTTGEN, H.; NORDESJO L.; OLLANDER B.; SALTIN B. Physical conditioning through interval training with young male adults. *Med Sci Sports*. 5:220-6. 1973.
60. KRAMER J. M.; BEATTY J. A.; PLOWEY E. D.; WALDROP T. G. Exercise and hypertension: a model for central neural plasticity. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 29(1-2):122-6. 2002.
61. LAMBERT M. I.; NOAKES T. D. Spontaneous running increases VO_{2max} and running performance in rats. *J Appl Physiol*. 68:400-3. 1990.
62. LEE, I-M. Physical activity and Cancer. *Physical Activity and Fitness Research Digest*. 2:1-8. 1995.
63. LEVITT P.; RAIC P.; GOLDMAN-RAKIC P. S. Comparative assessment of monoamine afferents in mammalian cerebral cortex. In: L. Descarries, T. Reader and H. H. Jasper, (eds.): *Monoamine innervations of cerebral cortex*. New York: Alan R. Liss, pp. 41-59. 1984.
64. LISTE I.; GUERRA M. J.; CARUNCHIA H. J.; LABANDEIRA-GARCIA J. L. Treadmill running induces striatal Fos expression via NMDA glutamate and dopamine receptors. *Exp Brain Res*. 115:458-69. 1997.
65. MACKINNON L. T. Chronic exercise training effects on immune function. *Med Sci Sports Exerc*. 32(7 Suppl):S539-76. 2000.

66. MARK DAVIS J.; ALDERSON N. L.; WELSH R. S. Serotonin and central nervous system fatigue: nutritional considerations. *Am J Clin Nutrition*. 72(2):573-8. 2000.
67. MARTINS E JR.; FERNANDES L. C.; BARTOL I.; CIPOLLA-NETO J.; COSTA ROSA L. F. Melatonin modulates allergic lung inflammation. *J Pineal Res*. 31(4):363-9. 2001.
68. MAYO M. J.; GRANTHAM J. R.; BALASEKARAN G. Exercise-induced weight loss preferentially reduces abdominal fat. *Med Sci Sports Exerc*. 35(2):207-13. 2003.
69. MEEUSEN R.; DE MEIRLEIR K. Exercise and brain neurotransmission. *Sports Med*. 20(3):160-88. 1995.
70. MILLER, R. G.; J. A. KENT-BRAUN; K. R. SHARMA; M. W. WEINER. Mechanisms of human muscle fatigue. Quantitating the contribution of metabolic factors and activation impairment. *Adv Exp Med Biol*. 384:195-210. 1995.
71. MORGAN J. I.; CURRAN T. Stimulus-induced coupling in neurons: role of a cellular immediate-early genes. *Trends in Neuroscience*. 12:459-62. 1989.
72. MORRISON J. H.; GRZANNA R; MOLLIVER M. E.; COYLE J. T. The distribution and orientation of noradrenergic fibres in neocortex of the rat: an immunofluorescence study. *J Comp Neurol*. 181;17-40. 1978.
73. MOSTARDI, R.; GANDEE R.; CAMPBELL T. Multiple daily training and improvement in aerobic power. *Med Sci Sports*. 7(1):82. 1975.
74. MUNSAT, T. L.; MCNEAL D.; WATERS R. Effects of nerve stimulation on human muscle. *Arch Neurol*. 33:608-617. 1976.

75. NEWSHOLME, E. A.; ACWORTH I. N.; BLOMSTRAND E. Aminoacids brain neurotransmitters and a functional link between muscle and brain that is important in sustained exercise. In: advances in myochemistry. London: John Libbery Eurotext. pp:127-33. 1987.
76. NEWSHOLME, E. A.; BLOMSTRAND E. The plasma level of some amino acids and physical and mental fatigue. *Experientia*. 52(5):413-5. 1996.
77. NIELSEN B.; NYBO L. Cerebral changes during exercise in the heat. *Sports Med*. 33(1):1-11. 2003.
78. NIH Consensus Development Panel on Physical activity and Cardiovascular Health, Physical activity and cardiovascular health. *JAMA*. 276:241-246. 1995.
79. NOAKES T. D. Physiological models to understand exercise fatigue and the adaptations that predict or enhance athletic performance. *Scand J Med Sci Sports*. 10(3):123-45. 2000.
80. NYBO L. CNS fatigue and prolonged exercise: affect of sucrose supplementation. *Med Sci Sports Exerc*. 34(4):589-94. 2003.
81. OSTMAN-SMITH, I. Adaptive changes in the sympathetic nervous system and some effects organs of the rat following long term exercise or cold acclimatisation and the role of cardiac hyperthrophy. *Acta Physiol Scand*. 477:1-118. 1979.
82. PARNAVELAS J. G.; PAPADOPOLULAS G. C. The monoaminergic innervations of the cerebral córtex is not diffuse and non-specific. *Trends Neuroscience*. 12(9):315-9. 1989.
83. PATE, R. R.; BRANCH J. D. Training for endurance sport. *Med Sci Sports Exerc*. 24 (9):S340-3. 1992.
84. PATE, R. R.; PRATT M.; BLAIR S. N. et al., Physical activity and public health. *JAMA*. 273:402-407. 1995.

85. PAUVERT V.; PIERROT-DESEILLIGNY E.; ROTHWELL J. C. Role of spinal premotoneurons in mediating corticospinal input to forearm motoneurons in man. *J Physiol.* 1;508 (Pt 1):301-12. 1998.
86. PEDERSEN B. K. Chronic exercise and the immune system. Chapter 7. In: Exercise immunology, B. K. Pedersen, editor, Chapman and Hall, New York. Pp.113-141. 1997.
87. POLLOCK, M.; CURETON T.; GRENINGER L. Effects of frequency of training on working capacity, cardiovascular function and body composition on adult men. *Med Sci Sports.* 1(2):70-4. 1969.
88. POLLOCK C. M.; SCHADWICK R. E. Allometry of muscle, tendon, and elastic energy storage capacity in mammals. *Am J Physiol.* 266(3 Pt 2):R1022-31. 1993.
89. PROCHASKA, J. O.; C. C. DICLEMENTE. Stages and processes of self-change in smoking: toward an integrative model of change. *J Consult Clin Psych.* 51:390-395. 1983.
90. RAVEN, P. B.; W. G. SQUIRES. What is science? *Med Sci Sports Exerc.* 21:351-352. 1989.
91. RIBEIRO DO VALLE L. E. Serotonergic neurons in the caudal raphe nuclei discharge in association with activity of masticatory muscles. *Braz J Med Biol Res.* 30:79-83. 1997.
92. ROCHE M.; COMMONS K. G.; PEOPLES A.; VALENTINO R. J. Circuitry underlying regulation of the serotonergic system by swim stress. *J Neurosci.* 23(3):970-7. 2003.
93. ROLAND P. E.; LARSEN B.; LASSEN N. A.; SKINHOJ E. Supplementary motor area and other areas in organization of voluntary movements in man. *J Neurophysiol.* 43:118-36. 1980.

94. ROTHWELL J. C. Control of Human voluntary movement. Kent, UK:Croom Helm. 1987.
95. SABOL K. E.; RICHARDS J. B.; FREED C. R. In vivo dialysis measurements of dopamine and DOPAC in rats trained to turn on a circular treadmill. *Pharmacol Biochem Behav.* 36:21-8. 1990.
96. SCHWARTING R.; HUSTON J. P. Dopamine and serotonin metabolism in brain sites ipsi and contralateral to direction of conditioned turning in rats. *J Neurochem.* 48:1473-9. 1987.
97. SMITH K. J.; HALL S. M. Nerve conduction during peripheral demyelination and remyelination. *J Neurol Sci.* 48(2):201-19. 1980.
98. SOARES D. D.; LIMA N. R.; COIMBRA C. C.; MARUBAYASHI U. Evidence that tryptophan reduces mechanical efficiency and running performance in rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 74(2):357-62. 2003.
99. SPECIALE S. G.; MILLER J. D.; MsMILLEN B. A., German D. C. Activation of specific central dopamine pathways: locomotion and footshock. *Brain Res Bull.* 16:33-8. 1986.
100. STARON, R. S.; R. S. HIKIDA; F. C. HAGERMAN; G. A. DUDLEY; T. F. MURRAY. Human skeletal muscle fiber type and adaptability to various workloads. *J Histochem Cytochem.* 32(2):146-152. 1984.
101. STEWART K. J. Exercise training and the cardiovascular consequences of type 2 diabetes and hypertension: plausible mechanisms for improving cardiovascular health. *JAMA.* 288(13):1622-31.
102. SWAIN R. A.; HARRIS A. B.; WIENER S. C.; DUTKA M. V.; MORRIS H. D.; THEIEN B. E.; ENGBERG K; KAUTERBUR P. C.; GREENHOUGH W. T. Prolonged exercise induces angiogenesis and increases cerebral blood volume in primary cortex of the rat. *Neuroscience.* 117(4):1037-46. 2003.

103. SZOSTAK C.; JAKUBOVIC A.; PHILLIPS A. G.; FIBIGER H. C.
Bilateral augmentation of dopaminergic and serotonergic activity in the striatum and nucleus accumbens induced by conditioned circling. *J Neurosci.* 6:2037-44. 1986.
104. TABER E.; BRODAL A.; WALBERG F. The raphe nuclei of the brainstem in the cat normal topography and cytoarchitecture and general discussion. *J Comp Neurol.* 114:161-187. 1977.
105. TALMADGE R. J.; ROY R. R.; V. EDGERTON R. Muscle fiber types and function. *Curr Opin Rheumatol.* 5:695-705. 1993.
106. TISCHLER R. C.; MORIN L. P. Reciprocal serotonergic connections between the hamster median and dorsal raphe nuclei. *Brain Res.* 981(1-2):126-32. 2003.
107. TONG L.; SHEN H.; PERREAU V. M.; BALAZS R.; COTMAN C. W. Effects of exercise on gene-expression profile in the rat hippocampus. *Neurobiol Dis.* 8(6):1046-56. 2001.
108. Tork I. Raphe nuclei and serotonin containing system. Ed Academic Press, Australia, Sydney:43-78. 1985.
109. TORK I.; BAKER K. G.; HALLIDAY G. M. Cytoarchitecture of the human dorsal raphe nucleus. *J Comp Neurol.* 301(2):147-61. 1990.
110. U.S. Department of Health and Human Services, Physical activity and Health: a report of the Surgeon General. Atlanta: National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion. 1996.
111. VERTES R. P.; KOCSIS B. Projections of the dorsal raphe nucleus to the brainstem: PHA-L analysis in the rat. *J Comp Neurol.* 340:11-26. 1994.
112. VRBOVA, G. Influence of activity on some characteristics properties of slow and fast mammalian muscles. *Exercise Sport Sci Rev.* 7:181-213. 1979.

113. WANG Q. P.; NAKAI Y. The dorsal raphe: an important nucleus in pain modulation. *Brain Res Bull.* 34(6):575-85. 1994.
114. WATT, E.; E. BUSKIRK.; B. PLOTNICKI. A comparison of single vs. multiple daily training regimens: some physiological considerations. *Res Q.* 44(1):119-23. 1973.
115. WATT B.; GROOVE R. Percieved exertion: antecedents and applications. *Sports Med.* 15:225-41. 1993.
116. WELLS C. L. Physical activity and women's health. . *Physical Activity and Fitness Research Digest.* 2:1-6. 1996.
117. XIE Y. F.; LIU C. Y.; LIU J. Z. Nucleus raphe obscurus participates in regulation of gallbladder motility through vagus and sympathetic nerves in rabbits. *Chin J Physiol.* 45(3):101-7. 2002.
118. YARASHESKI K. E.; TEBAS P.; STANERSON B.; CLAXTON S.; MARIN D.; BAE K.; KENNEDY M.; TANTISIRIWAT W.; POWDERLY W. G. Resistance exercise training reduces hypertriglyceridemia in HIV-infected men treated with antiviral therapy. *J Appl Physiol.* 90(1):133-8. 2001.