



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

HIVINY DE ATAIDES RAQUEL

**PAPEL DO ÓXIDO NÍTRICO NA MODULAÇÃO DO
BARORREFLEXO PELO NÚCLEO PARAVENTRICULAR DO
HIPOTÁLAMO:
EFEITOS DO TREINAMENTO FÍSICO OU SUPLEMENTAÇÃO
COM L-ARGININA EM RATOS NORMOTENSOS**



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

HIVINY DE ATAIDES RAQUEL

**PAPEL DO ÓXIDO NÍTRICO NA MODULAÇÃO DO
BARORREFLEXO PELO NÚCLEO PARAVENTRICULAR DO
HIPOTÁLAMO: EFEITOS DO TREINAMENTO FÍSICO OU
SUPLEMENTAÇÃO COM L-ARGININA EM RATOS
NORMOTENSOS**

HIVINY DE ATAIDES RAQUEL

**PAPEL DO ÓXIDO NÍTRICO NA MODULAÇÃO DO
BARORREFLEXO PELO NÚCLEO PARAVENTRICULAR DO
HIPOTÁLAMO:
EFEITOS DO TREINAMENTO FÍSICO OU SUPLEMENTAÇÃO
COM L-ARGININA EM RATOS NORMOTENSOS**

Tese apresentada ao Departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Ciências Fisiológicas, pelo Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Marli Cardoso
Martins Pinge

Co-orientadora: Profa. Dra. Lisete Compagno
Michelini

Londrina
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Raquel, Hiviny de Ataides.

Papel do óxido nítrico na modulação do barorreflexo pelo núcleo paraventricular do hipotálamo : efeitos do treinamento físico ou suplementação com L-arginina em ratos normotensos / Hiviny de Ataides Raquel. - Londrina, 2017.
114 f. : il.

Orientador: Marli Cardoso Martins Pinge.

Coorientador: Lisete Compagno Michelini.

Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, 2017.

Inclui bibliografia.

1. Sistema cardiovascular - Tese. 2. Exercícios físicos - Tese. 3. Arginina - Tese. 4. Óxido nítrico - Tese. I. Pinge, Marli Cardoso Martins. II. Michelini, Lisete Compagno. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas. IV. Título.

HIVINY DE ATAIDES RAQUEL

**PAPEL DO ÓXIDO NÍTRICO NA MODULAÇÃO DO BARORREFLEXO
PELO NÚCLEO PARAVENTRICULAR DO HIPOTÁLAMO:
EFEITOS DO TREINAMENTO FÍSICO OU SUPLEMENTAÇÃO COM L-
ARGININA EM RATOS NORMOTENSOS**

Tese apresentada ao Departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Ciências Fisiológicas, pelo Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, da Sociedade Brasileira de Fisiologia

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Marli Cardoso Martins
Pinge
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Carlos Cesar Crestani
Universidade Estadual Paulista – UNESP

Prof. Dr. Ernane Torres Uchôa
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Marcos Doederlein Polito
Universidade Estadual de Londrina . UEL

Prof. Dr. Rafael Deminice
Universidade Estadual de Londrina . UEL

Londrina, 28 de abril de 2017.

AGRADECIMENTOS

Não há no mundo exagero mais belo que a gratidão! Concluir o doutorado sem dúvida foi uma grande satisfação, porém, não conseguiria trilhar esse longo caminho sozinha.

As alegrias, as decepções, as surpresas, as derrotas, o ânimo e até mesmo o desânimo foram ferramentas que Deus utilizou para me mostrar quais passos eu deveria dar na estrada da vida. Agradeço a Deus por me dar paz e ciência nos momentos que mais precisei de paciência, pois, em alguns momentos, somente a fé foi capaz de remover a desordem mental e devolver a paz de espírito.

Várias pessoas acreditaram que meu sonho poderia tornar-se realidade e contribuíram para que meus objetivos fossem alcançados.

Agradeço a minha família pelo amor incondicional recebido. Todo o carinho e apoio foram fundamentais. Hoje entendo que família é como uma árvore, ambas crescem para vários lados, porém, a raiz sempre prevalece a mesma! Aos meus pais, minha irmã, meus tios (as), avós, primos (as), a minha eterna gratidão. Por diversas vezes, a simples mensagem: “Fica calma Hiviny, vai dar tudo certo”, impulsionava-me para frente!

De todas as emoções que vivenciei na USP-SP, conhecer o Angelo foi sem dúvida, o maior presente de todos. Convidá-lo para tomar um café na cantina do ICB I foi o experimento mais assertivo do meu doutorado, que, aliás, me rendeu não somente um noivo, mas, um companheiro e amigo maravilhoso. Dividir fisiologia cardiovascular e sonhos com ele tem sido a grande alegria da minha vida. Meu carinhoso agradecimento ao homem que diariamente me ensina que a medida do amor é amar sem medida.

Em diferentes momentos, as amigadas duplicaram minha felicidade. Sem entender ao menos do que se tratavam meus estudos ou o que eu tanto fazia no laboratório, minhas amigas sempre dividiram meus sofrimentos e incentivaram-me a buscar meu caminho. Muito obrigada amigas!

Também sou grata aos colegas, docentes e funcionários dos departamentos de Ciências Fisiológicas da UEL e Fisiologia e Farmacologia do ICB I da USP-SP.

Meus sinceros agradecimentos a coordenação e aos docentes do Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da UEL, o qual abriu portas significativas na minha vida acadêmica e profissional.

Agradeço também o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de estudos e taxa de bancada fornecidas durante o doutorado. Esse apoio financeiro auxiliou na realização deste trabalho e possibilitou a disseminação dos conhecimentos em diversos eventos científicos.

Agradecimento especial faço a minha co-orientadora Lisete Compagno Micheline, a qual não mediu esforços para tornar este trabalho mais brilhante. Ela me ensinou que para fazer ciência não basta ter boas idéias, mas, é necessário executá-las com critério e perseverança. Uma co-orientadora incrível que exigiu de mim exatamente o que eu podia oferecer. Aconselhou-me que sempre há uma forma de fazer nosso trabalho melhor e que a minha missão era encontrar essa forma. Minha respeitosa gratidão a quem sempre me estimulou a fazer pesquisa com dedicação e disciplina.

Muitos colegas de laboratório passaram em minha vida ao longo dos anos e cada um deles com certeza ensinou-me algo importante. A todos sou grata, porém, agradecimento especial faço aos meus colaboradores: Nathalia Zerbinatti Ferreira, Bruno F.C. Lucchetti, Bárbara Falchetto e Gustavo S. Masson. Trabalhamos muito para a realização do projeto de doutorado. Hoje vejo que nossa união foi fundamental para o resultado final dessa obra.

Agradeço o professor Phileo Pinge Filho por contribuir para execução de algumas técnicas em seu laboratório e é claro, por seus preciosos conselhos de vida. Através de nossas conversas, compreendi que as dificuldades incentivam a luta dos homens e que sempre há um ser divino orientando nossos caminhos.

Geralmente, as grandes idéias surgem da observação dos pequenos detalhes. Por isso, gostaria de agradecer profundamente a pessoa que me olhou devagar e enxergou em mim infinitas possibilidades, minha querida orientadora Marli C. Martins Pinge. Ela abriu as portas da ciência para mim e ensinou que o aprendizado e a experiência estão em todos os caminhos. Entendi que o prazer no trabalho aperfeiçoa a obra e que não importa quantos recursos você tem, mas, que devemos fazer sempre o nosso melhor. Ter uma rotina organizada e uma agenda também pode ajudar e muito no cotidiano agitado de uma mulher pesquisadora.

Com minha orientadora aprendi que na vida, não seremos borboletas se não passarmos por longas metamorfoses. Hoje, após 8 anos sob a orientação da professora Marli, sei que os obstáculos e dificuldades fazem parte da vida mas, se quero progredir, devo superá-los para fazer uma nova história! Minha eterna gratidão a orientadora que iluminou minha vida profissional e pessoal.

Sou muito grata às adversidades que apareceram no meu caminho. Todas elas me ensinaram a tolerância, a empatia, o autocontrole, a perseverança e outras qualidades que, sem essas adversidades, eu jamais conheceria.

Finalmente, concluo que o importante é não parar de questionar, pois, durante todo o tempo de pós-graduação, aprendi muito mais com os meus erros do que com meus acertos. Percebi ainda que a ciência nunca resolve um problema sem criar pelo menos outros dez, mas, que é preciso viver um dia de cada vez. Contudo, agradeço a todos que participaram dessa obra, a qual é uma pequena parte da minha vida que chamo de FELICIDADE!

Hiviny de Ataides Raquel

“Se eu vi mais longe, foi por estar sobre ombros de gigantes”.

Isaac Newton

RAQUEL, Hiviny de Atáides. **Papel do óxido nítrico na modulação do barorreflexo pelo núcleo paraventricular do hipotálamo:** efeitos do treinamento físico ou suplementação com L-arginina em ratos normotensos. 2017. 114 f. Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

RESUMO

O óxido nítrico (NO) no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) é importante neuromodulador de respostas autonômicas e o treinamento físico assim como a suplementação de L-arginina pode induzir diferentes adaptações ao sistema cardiovascular. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da enzima nNOS do PVN na neuromodulação cardiovascular de ratos treinados ou suplementados com L-arginina. Após aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (protocolo: 5185.2014.79), ratos Wistar (220-250g) foram submetidos a sedentarismo ou treinamento de natação, corrida ou suplementação oral com L-arginina (dose: 62,5mg/1ml/rato/dia). Posteriormente foi realizada estereotaxia para implante de cânulas-guia direcionadas ao PVN e cateterismo de artéria e veia femoral para registros cardiovasculares. Outros animais foram destinados à coleta de tecidos para análises de composição corporal, nitrito, expressão gênica e imunohistoquímica. A natação e a corrida proporcionaram menor ganho de peso corporal, diminuição de tecido adiposo perigonadal e retroperitoneal e aumento do peso cardíaco. Apenas animais treinados em esteira apresentaram maior peso de músculos gastrocnêmio e sóleo. Ambos os protocolos de treinamento provocaram: bradicardia em repouso, sem alterações na pressão arterial média (PAM); melhoraram a sensibilidade do barorreflexo espontâneo e modulação da variabilidade da frequência cardíaca (FC), através do aumento do componente parasimpático e diminuição do simpático. A microinjeção bilateral de inibidor seletivo da nNOS (N-Propyl-L-Arginina, 4nmol/100nl) no PVN provocou maior resposta pressórica e taquicárdica em ratos treinados e um déficit no controle autonômico cardiovascular. Ratos treinados apresentaram maior prevalência de neurônios imunoreativos para nNOS no PVN, maior expressão gênica de nNOS e níveis de nitrito no PVN. A suplementação com L-arginina proporcionou efeitos similares ao exercício. Animais suplementados apresentaram bradicardia de repouso sem alterações na PAM e maior resposta pressora e taquicárdica ao N-propyl no PVN. A análise espectral basal de ratos suplementados com L-arginina evidenciou menor modulação simpática para pressão arterial sistólica e FC e melhores índices de barorreflexo espontâneo. A suplementação com L-arginina favoreceu maior ganho máximo de sensibilidade barorreflexa, o qual foi abolido após a inibição da nNOS no PVN. Além disso, a microinjeção bilateral de L-arginina (0,17g/ml/100nL) no PVN de ratos controle melhorou o ganho máximo de sensibilidade barorreflexa. Animais suplementados apresentaram menor peso de tecido adiposo perigonadal e retroperitoneal, maior peso de músculo gastrocnêmio e rins e maiores concentrações de nitrito no PVN, rins e aorta torácica. Em conclusão, o treinamento físico e a suplementação oral de L-arginina modificam o controle autonômico do PVN via nNOS e ambos favorecem a biodisponibilidade de NO que, central e periféricamente pode ser relevante para adaptações cardiovasculares.

Palavras-chave: Exercício físico. Barorreflexo. L-arginina. Óxido nítrico.

RAQUEL, Hiviny de Ataides **Role of nitric oxide in the modulation of baroreflex by the hypothalamic paraventricular nucleus:** effects of physical training or supplementation with L-arginine in normotensive rats. 2017. 114 p. Thesis (Doctorate degree in Physiological Sciences) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

ABSTRACT

Nitric oxide (NO) into the paraventricular nucleus of hypothalamus (PVN) is an important neuromodulator of autonomic responses, and physical training as well as L-arginine supplementation may induce different adaptations to the cardiovascular system. Thus, the objective of this study was to evaluate the effects of nNOS enzyme of PVN on cardiovascular neuromodulation in rats trained or supplemented with L-arginine. After approval by the Animal Ethics Committee of the State University of Londrina (protocol: 5185.2014.79), Wistar rats (220-250g) were submitted to sedentarism or swimming training, running or oral supplementation with L-arginine (dose: 62.5mg/1ml/rat/day). Subsequently, implantation of guide cannulae directed to the PVN by stereotactic surgery and catheterization of the femoral artery and vein were performed for cardiovascular records. Other animals were used to collect tissues for analysis of body composition, nitrite levels, gene expression and immunohistochemistry. Swimming and running training provided decreased body weight and adipose tissue perigonadal and retroperitoneal and increased heart weight. Only treadmill animals presented greater weight of muscles gastrocnemius and soleus. Both training protocols resulted in: resting bradycardia, no changes in mean arterial pressure (MAP); improved sensitivity of the spontaneous baroreflex and modulation of heart rate variability (HR), through an increase of the parasympathetic and reduction of the sympathetic component. The bilateral microinjection of nNOS selective inhibitor (N-Propyl-L-Arginine, 4nmol/100nl) in PVN caused a greater pressure and tachycardic response in trained rats and a deficit in the autonomic cardiovascular control. Trained rats showed higher prevalence of immunoreactive neurons for nNOS in PVN, higher nNOS gene expression, and nitrite levels in PVN. L-arginine supplementation provided similar effects to those observed by exercise. Supplemented animals had resting bradycardia without changes in MAP, as well as a greater pressure and tachycardic response to N-Propyl in PVN. Basal spectral analysis of L-arginine supplemented rats, showed lower sympathetic modulation for systolic blood pressure and HR and better indices of spontaneous baroreflex. L-arginine supplementation favored a greater maximum baroreflex sensitivity gain, which was abolished after nNOS inhibition in PVN. In addition, bilateral microinjection of L-arginine (0.17g/ml/100nL) into the PVN of control rats improved the maximum baroreflex sensitivity gain. In supplemented animals there was also lower adipose tissue weight perigonadal and retroperitoneal, higher weight of gastrocnemius muscle and kidneys; higher nitrite levels in PVN, kidneys and thoracic aorta. In conclusion, physical training as well as oral supplementation with L-arginine modifies the autonomic control of PVN via nNOS and both favor the bioavailability of NO, which, centrally and peripherally, may be relevant for cardiovascular adaptations.

Key words: Physical exercise. Baroreflex. L-arginine. Nitric oxide.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Parâmetros de crescimento corporal em animais sedentários ou treinados por natação.....	40
Figura 2 – Parâmetros de composição corporal de ratos Wistar após 4 semanas de sedentarismo ou treinamento de natação.....	41
Figura 3 – Parâmetros cardiovasculares basais e alterações através da microinjeção bilateral de salina 0,9% ou N-Nw-Propyl-L-arginina (N-Propyl) no PVN de ratos sedentários e treinados por natação	42
Figura 4 – Análise espectral após microinjeção bilateral de salina 0,9% ou N-Propyl no PVN de ratos sedentários e treinados por natação.	44
Figura 5 – Sensibilidade do barorreflexo espontâneo após a microinjeção bilateral de salina 0,9% ou N-Propyl no PVN de ratos sedentários e treinados por natação	45
Figura 6 – Controle barorreflexo antes e após a microinjeção bilateral de salina 0,9% no PVN.	46
Figura 7 – Controle barorreflexo antes e após microinjeção bilateral de N-Propyl no PVN.....	48
Figura 8 – Localização dos sítios de microinjeção bilateral no PVN dos animais do estudo 1	49
Figura 9 – Análises de imunohistoquímica para nNOS e expressão gênica de nNOS no PVN de ratos sedentários e treinados por natação	50
Figura 10 – Efeitos do treinamento físico de natação nos níveis de nitrito em diferentes tecidos	51
Figura 11 – Parâmetros de crescimento corporal em animais sedentários ou treinados em esteira elétrica	52
Figura 12 – Parâmetros de composição corporal de ratos Wistar após 8 semanas de sedentarismo ou treinamento em esteira.....	53
Figura 13 – Alterações em parâmetros de rendimento físico em ratos sedentários ou treinados em esteira	54
Figura 14 – Parâmetros cardiovasculares basais e alterações através da microinjeção bilateral de salina 0,9% ou N-Nw-Propyl-L-arginina (N-Propyl) no PVN de ratos sedentários e treinados em esteira.....	55

Figura 15 – Análise espectral após microinjeção bilateral de salina 0,9% ou N-Propyl no PVN de ratos sedentários e treinados em esteira	57
Figura 16 – Sensibilidade do barorreflexo espontâneo após microinjeção bilateral de salina 0,9% ou N-Propyl no PVN de ratos sedentários e treinados em esteira.	58
Figura 17 – Controle barorreflexo de ratos Wistar submetidos a 8 semanas de sedentarismo ou treinamento físico de corrida.....	59
Figura 18 – Localização dos sítios de microinjeção bilateral no PVN dos animais do estudo 2	60
Figura 19 – Análises de imunohistoquímica para nNOS e expressão gênica de nNOS no PVN de ratos sedentários e treinados por esteira	61
Figura 20 – Efeitos do treinamento físico de esteira nos níveis de nitrito em diferentes tecidos	62
Figura 21 – Efeitos da suplementação oral de L-arginina em parâmetros de crescimento corporal de ratos Wistar controle e tratados com L-arginina	67
Figura 22 – Parâmetros de composição corporal de ratos Wistar após 4 semanas de tratamento (via oral) com água ou L-arginina	68
Figura 23 – Parâmetros cardiovasculares basais e alterações através da microinjeção bilateral de salina 0,9% ou N-Nw-Propyl-L-arginina (N-Propyl) no PVN de ratos controle ou suplementados com L-arginina.	69
Figura 24 – Participação da nNOS no controle barorreflexo pelo PVN após 4 semanas de suplementação oral de L-arginina.....	72
Figura 25 – Efeitos da L-arginina no controle barorreflexo pelo PVN.....	74
Figura 26 – Localização dos sítios de microinjeção bilateral no PVN de animais do estudo 3.	75
Figura 27 – Níveis de nitrito em diferentes tecidos de ratos controle (tratados com água) ou tratados (via oral) durante 4 semanas com L-arginina	76
Figura 28 – Efeitos da suplementação de L-arginina em parâmetros corporais periféricos	77

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Controle barorreflexo da frequência cardíaca e parâmetros das barocurvas de ratos sedentários ou treinados por natação e submetidos à microinjeção bilateral de inibidor de nNOS no PVN.....47
- Tabela 2** – Controle barorreflexo da frequência cardíaca: Parâmetros utilizados para construção das barocurvas durante teste de barorreflexo em ratos sedentários ou submetidos à 8 semanas de treinamento físico de corrida.59
- Tabela 3** – Comparações qualitativas das alterações de composição corporal de animais sedentários e treinados após dois protocolos distintos de exercício físico: natação ou esteira.....63
- Tabela 4** – Comparações qualitativas de parâmetros cardiovasculares basais e efeitos da microinjeção bilateral de salina 0,9% ou inibidor da nNOS no PVN de ratos sedentários ou treinados por dois protocolos distintos: natação ou esteira.....64
- Tabela 5** – Comparações qualitativas de parâmetros autonômicos das análises espectrais após microinjeção de salina 0,9% ou N-Propyl no PVN de ratos sedentários ou treinados por dois protocolos distintos de treinamento físico: natação ou esteira.65
- Tabela 6** – Comparações qualitativas de imunohistoquímica e expressão gênica para nNOS no PVN de ratos treinados por dois protocolos distintos: natação ou esteira.66
- Tabela 7** – Comparações qualitativas dos níveis de nitrito em diferentes tecidos de ratos treinados por dois protocolos distintos: natação ou esteira66
- Tabela 8** – Análise espectral em ratos Wistar controle (tratados com água) ou tratados com L-arginina: Valores de variabilidade da pressão sistólica, variabilidade da frequência cardíaca e sensibilidade do barorreflexo espontâneo antes da microinjeção de N-Propyl no PVN (valores considerados basais) e após microinjeção de N-Propyl no PVN.....71

Tabela 9 – Controle barorreflexo da frequência cardíaca e parâmetros das barocurvas de ratos controle (tratados com água) ou tratados 4 semanas com L-arginina e submetidos à microinjeção bilateral de inibidor de nNOS no PVN.....	73
Tabela 10 – Controle barorreflexo da frequência cardíaca e parâmetros utilizados para construção das barocurvas de ratos Wistar antes e após microinjeção bilateral de L-arginina no PVN.....	74

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANS	atividade nervosa simpática
BH4	tetrahidrobiopterina
cDNA	ácido desoxirribonucleico complementar
CVLM	bulbo ventrolateral caudal
DC	débito cardíaco
DEPC	Dietil Pirocarbonato
eNOS	enzima óxido nítrico sintase endotelial
FAD	flavina adenina dinucleotídeo
FC	frequência cardíaca
FMN	flavina mononucleotídeo
GABA	ácido gama-aminobutírico
GH	hormônio do crescimento
HF	componente de alta frequência da análise espectral
HPRT	hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase
IML	coluna intermediolateral da medula espinhal
iNOS	enzima óxido nítrico sintase induzível
IP	intervalo de pulso
LF	componente de baixa frequência da análise espectral
NADPH	nicotinamida-adenina-dinucleotídeo fosfato
NAR	nervo aferente renal
NMDA	N-metil-D-aspartato
NO	óxido nítrico
NOS	enzima óxido nítrico sintase
nNOS	enzima óxido nítrico sintase neuronal
N-Propyl	N-Propyl-L-Arginina
NTS	núcleo trato solitário
PA	pressão arterial
PBS	tampão fosfato-salino
PFA	paraformaldeído
PAM	pressão arterial média
PAS	pressão arterial sistólica
PVN	núcleo paraventricular do hipotálamo

qPCR	reação em cadeia da polimerase ,método quantitativo
RVLM	bulbo ventrolateral rostral
RVP	resistência vascular periférica
RNA	ácido ribonucléico
SBR	sensibilidade do barorreflexo espontâneo
SNA	sistema nervoso autônomo
SNC	sistema nervoso central

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	EXERCÍCIO E SAÚDE CARDIOVASCULAR.....	14
1.2	REGULAÇÃO NEURAL DO SISTEMA CARDIOVASCULAR	16
1.3	BARORREFLEXO	17
1.4	BARORREFLEXO E EXERCÍCIO FÍSICO	18
1.5	ÓXIDO NÍTRICO	21
1.6	L-ARGININA E EXERCÍCIO FÍSICO	22
1.7	ÓXIDO NÍTRICO E NÚCLEO PARAVENTRICULAR DO HIPOTÁLAMO	23
2	JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	25
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
3	MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1	ANIMAIS.....	27
3.2	GRUPOS EXPERIMENTAIS	27
3.3	DELINEAMENTOS E PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	28
3.3.1	Treinamento Físico: Natação	28
3.3.2	Treinamento Físico: Corrida.....	28
3.3.3	Suplementação Oral Com L-arginina	29
3.3.4	Implante De Cânulas-Guia Direcionadas Ao PVN.....	29
3.3.5	Cateterismo De Artéria E Veia Femoral Para Registro De Parâmetros Cardiovasculares	30
3.3.6	Protocolos Experimentais.....	30
3.3.7	Teste Do Barorreflexo	32
3.3.8	Sítios De Microinjeção E Histologia Do PVN.....	34
3.3.9	Análise Espectral Da Variabilidade Da Frequência Cardíaca E Da Pressão Sistólica	34
3.3.10	Análise Da Sensibilidade Do Barorreflexo Espontâneo.....	35
3.3.11	Coleta E Armazenamento De Tecidos Para Análises De Composição Corporal E Dosagem De Nitrito	36
3.3.12	Níveis De Nitrito Em Tecidos Periféricos E PVN	37

3.3.13	Coleta E Armazenamento Do Pvn Para Análises De Expressão Gênica E Imunohistoquímica.....	37
3.3.14	Análise Da Expressão Gênica De Nnos No PVN.....	38
3.3.15	Análises De Imunohistoquímica No PVN	38
3.4	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	39
4	RESULTADOS	40
4.1	ESTUDO 1: PAPEL MODULATÓRIO DA nNOS DO NÚCLEO PARAVENTRICULAR DO HIPOTÁLAMO SOBRE O CONTROLE BARORREFLEXO DE RATOS TREINADOS POR NATAÇÃO.....	40
4.2	ESTUDO 2: INIBIÇÃO DA nNOS DO NÚCLEO PARAVENTRICULAR DO HIPOTÁLAMO ALTERA O CONTROLE AUTONÔMICO CARDIOVASCULAR DE RATOS SUBMETIDOS AO TREINAMENTO DE CORRIDA.....	52
4.3	ESTUDO 3: EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO ORAL DE L-ARGININA NA MODULAÇÃO CARDIOVASCULAR PELO NÚCLEO PARAVENTRICULAR DO HIPOTÁLAMO.....	67
5	DISCUSSÃO	
5.1	ESTUDO 1: PAPEL MODULATÓRIO DA nNOS DO NÚCLEO PARAVENTRICULAR DO HIPOTÁLAMO SOBRE O CONTROLE BARORREFLEXO DE RATOS TREINADOS POR NATAÇÃO.....	78
5.2	ESTUDO 2: INIBIÇÃO DA nNOS DO NÚCLEO PARAVENTRICULAR DO HIPOTÁLAMO ALTERA O CONTROLE AUTONÔMICO CARDIOVASCULAR DE RATOS SUBMETIDOS AO TREINAMENTO DE CORRIDA.....	82
5.3	ESTUDO 3: EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO ORAL DE L-ARGININA NA MODULAÇÃO CARDIOVASCULAR PELO NÚCLEO PARAVENTRICULAR DO HIPOTÁLAMO.....	85
6	CONCLUSÃO GERAL	92

REFERÊNCIAS	93
ANEXOS	113
ANEXO A: OFÍCIO DO COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA. PROCESSO Nº: 5185.2014.79	113
ANEXO B: PROTOCOLO EXPERIMENTAL DE TREINAMENTO FÍSICO DE CORRIDA EM ESTEIRA ELÉTRICA ADAPTADA PARA RATOS	114

1 INTRODUÇÃO

A prática regular de exercício físico aeróbio promove diversos benefícios ao sistema cardiovascular, e muitas das adaptações induzidas pelo treinamento são acompanhadas de ajustes específicos no sistema nervoso central (SNC) (Michelini e Stern, 2009; Ichiyama et al., 2002, Martins-Pinge, 2011). Áreas bulbares como: O núcleo trato solitário (NTS) (De Souza et al., 2001; Michelini e Stern, 2009), bulbo ventrolateral caudal (CVLM) e rostral (RVLM) (Martins-pinge et al., 2005, Muller, 2007); e do hipotálamo como o Núcleo Paraventricular (PVN) (de Abreu et al., 2009, Mastelari et al., 2011) modulam o controle autonômico cardiovascular e apresentam importante plasticidade neuronal após treinamento físico.

A L-arginina é considerada fundamental substrato para a síntese de óxido nítrico (NO). Dentro do PVN o NO atua como modulador de sinapses envolvidas no controle neural do sistema cardiovascular (Bredt et al., 1990; Horn et al., 1994). Sabe-se que a síntese de NO pode ser facilmente alterada pela biodisponibilidade de co-fatores ou precursores como a L-arginina (Moncada et al., 1991). Além disso, a prática de exercício físico também contribui amplamente para a produção de NO favorecendo a vasodilatação periférica e promovendo alterações positivas ao sistema cardiovascular (Di Francescomarino et al., 2009; Green et al., 2004; McAllister e Laughlin, 2006).

Evidências apontam efeitos similares da suplementação de L-arginina e do exercício físico. Sendo assim, ambos parecem contribuir para a melhora da saúde cardiovascular e prevenir doenças através do aumento da biodisponibilidade de NO (Hambrecht et al., 2000; Siasos et al., 2007; Lucotti et al., 2009).

1.1 EXERCÍCIO E SAÚDE CARDIOVASCULAR

A prática regular de exercício físico promove diversas adaptações fisiológicas ao sistema cardiovascular (Brum et al, 2004). Diferentes abordagens científicas têm sido realizadas para tentar esclarecer os mecanismos pelos quais o treinamento físico altera os sistemas corporais e melhora as condições de sobrevivência e capacidade física dos indivíduos (Afonso et al, 2003; Mendonca et al., 2016; Roh et al., 2016).

Os efeitos fisiológicos do exercício físico ao sistema cardiovascular são classificados em agudos imediatos, agudos tardios ou crônicos e têm sido relacionados com a melhoria da saúde em casos de obesidade (Pinheiro et al., 2007), diabetes (Rodrigues et al., 2012) e hipertensão (Véras-Silva et al., 1997).

Das adaptações fisiológicas agudas imediatas que são acionadas para suprir a nova demanda metabólica durante o exercício, podemos citar: a elevação da frequência cardíaca (FC) (Silverthorn, 2003), o aumento do débito cardíaco (DC) (Negrão et al., 1992) e da atividade nervosa simpática (ANS) (Mitchell e Victor, 1996). Em indivíduos hipertensos, ao longo das primeiras 24 ou 48 horas após a sessão de exercício, normalmente são observados como efeitos agudos tardios a discreta redução dos níveis pressóricos e tensionais, os quais estão associados a melhora da função endotelial (Brum et al., 2004). Já os efeitos crônicos são considerados adaptações resultantes da exposição frequente às sessões de exercícios, diferenciando assim indivíduos fisicamente treinados de sedentários. Algumas alterações em aspectos morfofuncionais como: bradicardia de repouso, hipertrofia ventricular excêntrica (Medeiros et al., 2004) e angiogênese por aumento do fluxo sanguíneo para músculos esqueléticos e cardíaco (Araújo, 2001) são observadas como efeitos crônicos do exercício aeróbio.

Sabe-se ainda que a duração e a intensidade da atividade física podem ser determinantes para induzir ou não as adaptações fisiológicas ao sistema cardiovascular (Forjaz et al., 1998; Forjaz et al., 2000). Exercícios de moderada intensidade e longa duração como natação e corrida têm demonstrado ser terapias não farmacológicas eficientes na promoção da saúde cardiovascular proporcionando o aumento do volume sistólico (Melo et al., 2003), angiogênese capilar (Amaral e Michelini, 2011), bradicardia de repouso (Raquel et al., 2016) e ganho barorreflexo (Brum et al., 2000). Devido aos efeitos positivos da corrida para a reabilitação cardiovascular, protocolos de treinamento físico em esteira têm sido aplicados como aliados no tratamento de hipertensão arterial (Brum et al., 2000; Véras-Silva et al., 1997) e insuficiência cardíaca (Krieger et al., 2001, Ichige et al., 2016).

Por outro lado, a natação também demonstra ser uma intervenção eficiente sobre diferentes parâmetros fisiológicos (Afonso et al., 2003; Brum et al., 2004; Cox et al., 1985) e sua utilização têm proporcionado alterações fisiológicas relevantes, tal como, a hipertrofia cardíaca excêntrica (Medeiros et al., 2004) e a bradicardia de repouso (Raquel et al., 2016). Além disso, a natação induz ainda

algumas adaptações em sítios centrais responsáveis pelo controle autonômico da pressão arterial (PA), favorecendo assim um melhor estado cardiovascular (Martins-Pinge, 2011; de Abreu et al., 2009; Mastelari et al., 2011).

1.2 REGULAÇÃO NEURAL DO SISTEMA CARDIOVASCULAR

A PA é regulada momento-momento para a manutenção da homeostase e envolve aspectos neurais, locais e humorais (Silverthorn, 2003). Determinadas alterações de resistência vascular periférica (RVP) e/ou DC podem influenciar direta ou indiretamente os mecanismos de controle da PA (Silverthorn, 2003). Nesse sentido, o sistema nervoso autônomo (SNA) tem papel fundamental para o controle neural do sistema cardiovascular, pois, participa de forma tônica e reflexa na manutenção dos valores pressóricos (Dampney, 1994).

O centro de controle cardiovascular atua basicamente através de três mecanismos reflexos: o barorreflexo, o quimiorreflexo e o reflexo cardiopulmonar (Dampney, 1994). As terminações das fibras aferentes dos reflexos cardiovasculares estão localizadas principalmente no NTS, cujos neurônios se projetam para CVLM e RVLM (Dampney, 1994). O PVN por sua vez, recebe aferências do NTS e possui conexões neuroanatômicas com a área RVLM, permitindo assim a integração e modulação de respostas durante a regulação reflexa da PA (Blair et al., 1996).

Nesse sentido, a área RVLM e o PVN são sítios cruciais para a origem e manutenção do tônus simpático cardiovascular, pois enviam projeções excitatórias diretas para neurônios pré-ganglionares simpáticos localizados na coluna intermediolateral da medula espinhal (IML) (Chen e Toney, 2003).

Embora a área RVLM seja considerada a principal eferência simpática para o controle cardiovascular (Dampney, 1994; Guyenet, 2006), neurônios do PVN conectam-se indiretamente com a RVLM (Taylor e Weaver, 1992; Blair et al., 1996; Badoer, 2001) e favorecem a modulação da PA através do controle simpato-vagal ao coração e tônus simpático para vasos sanguíneos (Allen, 2002; Coote et al., 1998; Dampney et al., 2005, Kc et al., 2010).

Portanto, as evidências indicam que o PVN é um importante centro integrador de respostas neuroendócrinas e juntamente com a RVLM proporciona a modulação da PA através do controle do tônus vasomotor simpático (Allen, 2002; Coote et al., 1998; Dampney et al., 2005). O controle da PA pela via PVN-RVLM-IML

envolve ainda diferentes populações neuronais e neurotransmissores, como: glutamato (Busnardo et al., 2010; Martins-Pinge et al., 2012), ácido gama-aminobutírico (GABA) (Chen e Toney, 2003; Zhang et al., 1998), vasopressina (Kc et al., 2010; Sanchez et al., 1994), ocitocina (Mack et al., 2007; Braga et al., 2000) e neuromoduladores como o NO (Horn et al., 1994, Zhang et al., 1997).

1.3 BARORREFLEXO

Os barorreceptores arteriais são considerados mecanorreceptores que controlam os valores pressóricos momento-a-momento. Esses receptores são sensíveis a modificações da PA (Filho et al., 2004; Irigoyen et al., 2001) pois estão estrategicamente localizadas no arco aórtico e seio carotídeo (Filho et al., 2004). A ativação dos barorreceptores estimula impulsos nervosos que partem do nervo glossofaríngeo e nervo vago para regiões bulbares específicas que controlam a PA (Filho et al., 2004; Campagnole-Santos e Haibara, 2001; Irigoyen et al., 2001). Nesse sentido, um aumento da PA, pode provocar a deformação mecânica dos vasos sanguíneos e ativar os barorreceptores. Em seguida, diversos circuitos centrais e periféricos são acionados para reestabelecer os valores pressóricos (Michelini et al., 2015).

Inicialmente, os estímulos captados pelos barorreceptores são encaminhados via nervo glossofaríngeo e vago até o NTS no bulbo. Em geral, essa via aferente envolve a atividade de diferentes neurotransmissores, dentre eles, destaca-se neurônios glutamatérgicos e GABAérgicos (Weston et al., 2003). No NTS, sinapses excitatórias estimulam neurônios da área CVLM (Kubo e Kihara, 1991; Ohta e Talman, 1994, Campos et al., 2001), que por sua vez, inibem via GABA a atividade de neurônios da RVLM (Minson et al., 1997), a qual, controla principalmente a saída simpática para o coração, vasos sanguíneos e adrenais (Campos et al., 2001). Desta forma, a área CVLM, que é considerada um centro vasodepressor que tem controle tônico/fásico sobre a RVLM, favorece a redução da contratilidade cardíaca, bradicardia e queda da resistência vascular periférica total (Filho et al., 2004; Campos et al., 2001; Campagnole-Santos e Haibara, 2001; Irigoyen et al., 2001). Simultaneamente, outros neurônios secundários do NTS excitam células pré-ganglionares do parassimpático localizados no núcleo motor dorsal do vago (NMDV) e núcleo ambíguo (NA), e a conexão com neurônios pós-

ganglionares situados no coração, contribui para o aumento da atividade vagal e queda da FC (Irigoyen et al., 2001).

Somado a isso, outras estruturas suprabulbares como o PVN, hipotálamo lateral (HL) e área periaquedutal cinzenta (PAG) podem também fazer conexões com áreas do tronco encefálico e participar da modulação das respostas cardiovasculares durante o barorreflexo (Kc et al., 2010; Murphy et al., 1995; Granata e Kitai, 1992; Bandler e Tork, 1987; Lovick, 1985; Nosaka, 1996).

Sabemos que a ativação da RVLM aumenta a RVP, DC e a secreção de catecolaminas pelas glândulas adrenais (Filho et al., 2004). Além disso, diversos estudos têm apontado que neurônios da porção parvocelular do PVN projetam-se para células da IML e RVLM. Assim, a via PVN-RVLM-IML pode contribuir direta ou indiretamente para o controle da ANS e modulação do barorreflexo (Badoer, 2001; Card et al., 2006; Cruz et al., 2008; Moon et al., 2002; Pyner e Coote, 1999; Yang e Coote, 1998).

Embora o controle barorreflexo pelo PVN envolva a participação de diferentes neurotransmissores como: GABA (Page et al., 2011), glutamato (Crestani et al., 2010; Cui et al., 2008), glicina (Yin et al., 2009), noradrenalina (Wang et al., 2013) e neuropeptídeo Y (Cassaglia et al., 2014), os potenciais efeitos do NO como neuromodulador do barorreflexo pelo PVN, ainda permanecem indefinidos na literatura científica.

Além disso, estudos apontam que a adaptação fisiológica aos novos níveis pressóricos observados em diferentes situações patológicas como diabetes (Dall'ago et al., 2007), obesidade (Huber e Schreihof, 2016; Guimaraes et al., 2014) e hipertensão (Irigoyen et al., 2001), pode comprometer a sensibilidade e prejudicar o controle eficiente do barorreflexo. Nessa perspectiva, o exercício físico têm-se apresentado como bom aliado para a terapia não farmacológica de manutenção de valores pressóricos adequados, pois, de forma eficiente promove uma readaptação dos barorreceptores contribuindo para a melhora do controle cardiovascular (Silva et al., 2012, Rodrigues et al., 2012; Masson et al., 2014).

1.4 BARORREFLEXO E EXERCÍCIO FÍSICO

A bradicardia de repouso é um dos efeitos promovidos pelo exercício físico crônico ao sistema cardiovascular. Apesar disso, dados apontam que fatores

como intensidade, duração e tipo de exercício influenciam diretamente a bradicardia em populações distintas (Medeiros et al., 2004; Brum et al., 2000; Negrão et al. 1992; Azevedo et al., 2014). Em geral, o aumento do tônus vagal ao coração, a diminuição do tônus simpático e a alteração da sensibilidade de células marcapasso a neurotransmissores são aspectos relevantes para a gênese e manutenção da bradicardia após exercício (Hassan, 1991; Gava et al., 1995).

É possível que mecanismos locais (endoteliais, miogênicos e metabólicos) atuem juntamente com os barorreceptores para manter a RVP e PA em níveis regulares (Brody et al., 1983). O treinamento físico é capaz de diminuir a ANS renal de animais (Krieger et al., 1998, 2001; Negrão et al., 1993; Ninomiya et al., 1988) e humanos (Arakawa, 1993), nesse sentido, considerando que esse efeito representa uma possível redução geral do tônus simpático periférico, é intrigante que o treinamento físico não diminua também a PA em ratos normotensos.

Sabemos que a prática sistematizada de exercício físico aeróbio altera positivamente o controle barorreflexo de animais normotensos (Brum et al., 2000; Raquel et al., 2016) e hipertensos (Minami et al., 2006; Silva et al., 1997). Apesar disso, estudos mais antigos são controversos em relação à melhora da sensibilidade do barorreflexo após exercício em humanos (Barney et al., 1988; Kingwell et al., 1992), embora, abordagens mais recentes tenham apontado melhora do barorreflexo após treinamento físico em humanos hipertensos (Lénárd et al., 2005; Raczack et al., 2006; Keller et al., 2004; Raven et al., 2006).

Estudos sobre o barorreflexo e exercício físico utilizando diferentes metodologias já foram conduzidos. Em ratos espontaneamente hipertensos (SHR), por exemplo, os autores encontraram sensibilidade barorreflexa atenuada (Ida et al., 1992) e provavelmente esse efeito foi devido ao prejuízo na sensibilidade aferente dos barorreceptores (Andresen e Yang, 1989). Outros autores observaram a melhora da sensibilidade barorreflexa após uma única sessão de exercício (Silva et al., 1997) e depois de 12 semanas de treinamento em esteira foi detectado: diminuição significativa de PA e FC, incremento na sensibilidade do barorreflexo, diminuição da ANS e aumento da atividade parasimpática. Assim, Minami e colaboradores, (2006) discutem que a taquicardia e a leve hipertensão mantida durante o exercício podem ser fatores importantes para o aumento da sensibilidade barorreflexa pós-exercício.

Somado a isso, como animais SHR sedentários apresentaram aumento do tônus simpático e o treinamento físico normalizou esse componente para níveis semelhantes aos de ratos sedentários normotensos (Véras-Silva et al., 1997), discussões atuais apontam que provavelmente a atenuação do tônus simpático ao coração proporcionada pelo exercício seja importante mecanismo para a redução da PA e melhora do controle barorreflexo em SHR treinados (Masson et al., 2014, Michelini et al., 2015).

Embora os mecanismos neurais influenciem diretamente o controle barorreflexo (Michelini et al., 2015; Michelini e Stern, 2009), não podemos descartar o papel vascular sob o controle da sensibilidade do barorreceptor aórtico após exercício, uma vez que o exercício aumenta a magnitude e a frequência de cisalhamento sobre as células endoteliais favorecendo a liberação de fatores endoteliais que levam ao aumento da atividade do barorreceptor (Cameron e Dart, 1994). O conceito mecanoelástico diz que sob uma mesma pressão de pulso, se houver um aumento da complacência vascular, pode haver um aumento da ativação do barorreceptor (Kirchheim, 1976). Assim, se o treinamento físico aumenta a complacência intrínseca aórtica em ratos (Kingwell, et al., 1997) e em humanos (Cameron e Dart, 1994; Kingwell et al., 1995), parece razoável a hipótese que um aumento na complacência aórtica favoreça um ganho de sensibilidade no barorreceptor aórtico. Entretanto, ainda não há um consenso sobre esses aspectos pois os diversos estudos científicos são controversos.

Aumentos na sensibilidade barorreflexa em humanos treinados já foram demonstradas através de funções logísticas sigmoidais (McDonald et al., 1993; Tatro, et al., 1992), embora, Kingwell e colaboradores, (1992) verificaram que a sensibilidade do controle barorreflexo da FC não foi alterada pelo treinamento em humanos normotensos em condições controle.

Por outro lado, após período de treinamento, foi descrito em ratos, uma atenuação da bradicardia reflexa e um aumento da taquicardia reflexa através da utilização do método de análise por regressão linear (ajustando mudanças na PAM para a FC correspondente) (Krieger et al., 1998). Tal efeito possivelmente foi observado devido a diminuição da responsividade da via eferente ao reflexo. Apesar disso, estudo posterior do mesmo grupo (Farah et al., 1999) demonstrou que a sensibilidade barorreflexa obtida pela função logística sigmoideal em ratos é semelhante ao índice de taquicardia barorreflexa obtido por regressão linear, porém,

aproximadamente duas vezes maior que o índice de bradicardia barorreflexa obtido por regressão linear. Desta forma, os autores evidenciaram que a sensibilidade barorreflexa calculada a partir da função logística sigmoideal pode refletir principalmente as alterações da taquicardia barorreflexa.

Contudo, os dados revisados sobre controle barorreflexo em humanos ou animais ainda parecem ser divergentes e provavelmente a justificativa disso envolva as diferentes metodologias para a análise do barorreflexo; assim como as espécies utilizadas; a presença ou ausência de anestesia e os distintos protocolos de exercício realizados (Farah et al., 1999).

Sendo assim, embora seja grande a quantidade de evidências demonstrando que o exercício físico promove alterações importantes no controle barorreflexo, ainda é necessário outros estudos para conclusões mais precisas sobre os efeitos centrais e periféricos de diferentes treinamentos aeróbios sob o controle cardiocirculatório tanto em animais como em humanos.

1.5 ÓXIDO NÍTRICO

O NO é um radical livre, gasoso, inorgânico e incolor que possui sete elétrons de nitrogênio e oito de oxigênio (Beckman e Koppenol, 1996). Ele é produzido a partir da L-arginina, por uma reação mediada pela enzima NO-sintase (NOS) (Knowles et al., 1990), a qual pode se apresentar através de distintas isoformas. O tipo I da NOS conhecida como nNOS (neuronal) é encontrada em neurônios e células gliais (Bredt et al., 1990; Forstermann et al., 1995). O tipo II também conhecido como iNOS (induzível) está localizada na maioria das células nucleadas, incluindo macrófagos, células de músculo liso e células da glia (Simmons et al., 1994). A NOS endotelial (eNOS) ou tipo III está presente principalmente no endotélio, plaquetas e cardiomiócitos (Forstermann et al., 1995; Szabo e Thiemermann, 1995). Tem sido aceito que enquanto ambas nNOS e eNOS são expressas constitutivamente, a atividade da iNOS é principalmente induzida por macrófagos em resposta a um estímulo inflamatório (MacCmicking et al., 1997).

A importância fisiológica do NO relaciona-se à sua atuação como segundo-mensageiro, podendo ativar ou inibir diferentes moléculas-alvo envolvidas em processos orgânicos (Bagasra et al., 1995; Beckman e Koppenol, 1996). No SNC, o NO pode atuar como neurotransmissor e facilitar a liberação de outros neurotransmissores e hormônios (Green e Goldman, 1981), sendo amplamente

conhecido como um neuromodulador atuante em sinapses envolvidas no controle neural do sistema cardiovascular (Horn et al., 1994; Zhang et al., 1997).

Neurônios que expressam NOS foram encontrados na área RVLM (Dun et al., 1994) e no PVN (Bredt et al., 1990; Sanchez et al., 1994; Vincent e Kimura, 1992) e foi confirmada a participação do NO dessas áreas na modulação cardiovascular e tônus simpático (Martins-Pinge et al., 2007; Zhang, et al., 1997).

Periféricamente, o NO atua como potente vasodilatador (Mombouli e Vanhoutte, 1999). O aumento do fluxo sanguíneo durante o exercício (efeito este denominado “estresse de cisalhamento”) favorece a síntese e biodisponibilidade de NO pelo endotélio vascular e contribui para maior vasodilatação e alterações positivas ao sistema cardiovascular (Di Francescomarino et al., 2009; Green et al., 2004; McAllister e Laughlin, 2006). Porém, os efeitos centrais do NO sob o controle neural da circulação após exercício, ainda não estão totalmente estabelecidos.

1.6 L-ARGININA E EXERCÍCIO FÍSICO

A L-arginina (ácido 2-amino-5-guanidino-pentanóico) é um aminoácido condicionalmente essencial e extremamente versátil. Apresenta diversas funções metabólicas no organismo de mamíferos, participando de processos como transporte e excreção do nitrogênio, ciclo da uréia, síntese de agmatina, poliaminas, bases pirimidinas, creatina, proteínas e ainda é importante substrato para a síntese de NO (Novaes e Lima, 1999; McConell e Kingwell, 2006; Nicastro et al., 2008).

Para ocorrer a síntese de NO, a enzima NOS é ativada e converte a L-arginina em L-citrulina e NO, porém, é necessário a presença de alguns co-fatores para exercer suas funções, incluindo a tetrahydrobiopterina (BH₄), a nicotinamida-adenina-dinucleotídeo fosfato (NADPH), a flavina adenina dinucleotídeo (FAD) e a flavina mononucleotídeo (FMN) (Furchgott e Zawadzki, 1980; Gross, 1997; Lane e Gross, 1999; Mendes-Ribeiro et al., 2001).

Sabe-se ainda que a captação e disponibilidade de L-arginina são fatores limitantes para a produção de NO. Apesar de os níveis intracelulares de L-arginina serem maiores do que nos fluídos extracelulares ou plasma, no meio extracelular ela pode ser captada rapidamente por células endoteliais através de transportadores específicos (Boger, 2007) e favorecer assim a síntese de NO.

As fontes de L-arginina podem ser tanto endógenas como exógenas, porém, a maior parte da arginina circulante é proveniente do *turnover* proteico

(Coman et al., 2008). Sabendo disso, diversos estudos têm investigado os efeitos da suplementação desse aminoácido. Já foi demonstrado que a suplementação de L-arginina parece ter efeitos similares ao exercício físico na prevenção de doenças cardiovasculares, devido ao aumento na produção periférica de NO, que promove alterações positivas no sistema cardiovascular através da vasodilatação (Hambrecht et al., 2000; Siasos et al., 2007; Lucotti et al., 2009).

Somado a isso, foi observado que a associação de exercício e suplementação de L-arginina melhora a tolerância ao exercício em pacientes com insuficiência cardíaca crônica (Doutreleau et al., 2005; 2006), em indivíduos saudáveis e atletas (Schaefer et al., 2002) assim como em animais normotensos (Valgas da Silva et al., 2015). Logo, as evidências indicam que a suplementação de L-arginina associada a prática de exercício físico melhora o desempenho físico e contribui para saúde cardiovascular principalmente através do aumento da biodisponibilidade de NO, síntese de proteínas e redução do estresse oxidativo (Valgas da Silva et al., 2015).

1.7 ÓXIDO NÍTRICO E NÚCLEO PARAVENTRICULAR DO HIPOTÁLAMO

O PVN é composto por diferentes populações neuronais e a alta densidade da enzima NOS encontrada neste núcleo sugere que o NO realiza um importante papel na regulação de respostas cardiovasculares (Bredt et al., 1990; Sanchez et al., 1994; Vincent e Kimura, 1992). Estudos com doadores de NO no PVN observaram a redução da PA, FC e ANS (Horn et al., 1994; Zhang et al., 1997) enquanto inibidores da NOS provocaram aumento da PA, FC e ANS (Zhang e Patel, 1998; Martins-Pinge et al., 2012).

Dados de neuroanatomia descrevem que neurônios da porção parvocelular localizados na região dorsal, ventral e lateral do PVN se projetam para células da IML e RVLM, contribuindo assim para a modulação autonômica do controle cardiovascular (Kc et al., 2010). Sabe-se que aproximadamente 30% dos neurônios do PVN têm fibras colaterais que se conectam a RVLM, assim eles podem influenciar direta ou indiretamente o controle da ANS através da via PVN-RVLM-IML (Badoer, 2001; Card et al., 2006; Cruz et al., 2008; Moon et al., 2002; Pyner e Coote, 1999; Yang e Coote, 1998).

O PVN contribui para a modulação da PA através do controle simpato-vagal ao coração e tônus vasomotor simpático ao leito arterial e venoso

(Coote et al., 1998; Allen, 2002; Dampney et al., 2005, Kc et al., 2010), porém, os efeitos do NO dentro do PVN parecem envolver uma interação complexa entre os neurotransmissores glutamato e GABA. A liberação de glutamato na fenda sináptica favorece a ligação deste neurotransmissor aos receptores do tipo NMDA (N-metil-D-aspartato) no terminal pós-sináptico. A ativação desses receptores permite o influxo de íon Ca^{2+} que se associa a calmodulina no interior do terminal pós-sináptico favorecendo a ativação da enzima NOS e formação de NO. Respostas depressoras e simpatoinibitórias a doadores de NO no PVN são bloqueadas pelo antagonista do receptor GABA_A . Isto é consistente com o conceito de que o NO pode atenuar as respostas ao NMDA por aumento da transmissão de GABA (Zhang e Patel, 1998). Assim, o NO parece ser um relevante neuromodulador no PVN que atua principalmente no controle cardio-circulatório através da simpatoinibição (Martins-Pinge et al., 2012). Somado a isso, sabe-se que o exercício físico altera a via nitrérgica de sinalização cardiovascular do PVN, melhorando a modulação autonômica através da diminuição do tônus simpático e aumento do parassimpático (Mastelari et al., 2011). No entanto, informações mais específicas relacionadas à isoforma neuronal da NO sintase (nNOS) no PVN de ratos treinados e em protocolos funcionais sem o uso da anestesia, não foram ainda descritas.

2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Diversas evidências apontam que o treinamento aeróbio é capaz de proporcionar benefícios a saúde cardiovascular através de modificações no controle neural cardio-circulatório e aumento da biodisponibilidade de NO ao SNC. Sabe-se ainda que o PVN é um dos principais alvos na modulação autonômica após exercício físico. Entretanto, até o momento, ainda não está bem elucidado o papel da nNOS sob o controle cardiovascular pelo PVN em protocolos de treinamento diferentes, como a natação e a esteira, assim como seu envolvimento no barorreflexo.

Considerando que o PVN participa do controle reflexo da PA principalmente através da modulação do tônus simpatoexcitatório e que o treinamento físico aumenta a biodisponibilidade de NO e este por sua vez é potente neuromodulador de sinapses que controlam as respostas autonômicas cardiovasculares, o objetivo desse estudo foi investigar o papel da nNOS na modulação autonômica do barorreflexo em animais treinados por dois protocolos distintos: natação e esteira. Em paralelo, foram avaliados os efeitos da suplementação oral de L-arginina na modulação cardiovascular pelo PVN em ratos normotensos.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar parâmetros de crescimento e composição corporal em ratos submetidos a dois protocolos distintos de treinamento físico: natação ou esteira;
- Avaliar respostas cardiovasculares e modulação autonômica após microinjeção de salina 0,9% ou inibidor seletivo da nNOS no PVN de ratos sedentários e treinados por natação ou esteira;
- Avaliar o ganho barorreflexo antes e após microinjeção de salina 0,9% ou inibidor da nNOS no PVN de ratos sedentários e treinados por natação;
- Analisar a imunoreatividade e expressão gênica para nNOS em PVN de ratos sedentários e treinados por natação ou esteira;
- Dosar as concentrações de nitrito no PVN, coração e rins de ratos sedentários e treinados por natação ou esteira;
- Avaliar parâmetros de crescimento e composição corporal em ratos controles (tratados com água) ou submetidos a 4 semanas de suplementação oral com L-arginina;

- Avaliar respostas cardiovasculares e a modulação autonômica após microinjeção de inibidor seletivo da nNOS no PVN de ratos normotensos controles (tratados com água) ou suplementados por 4 semanas com L-arginina;
- Avaliar o ganho barorreflexo antes e após microinjeção de inibidor da nNOS no PVN de ratos normotensos controles ou tratados com L-arginina;
- Avaliar o ganho barorreflexo antes e após microinjeção bilateral de L-arginina no PVN de ratos controles;
- Dosar as concentrações de nitrito no PVN, plasma, aorta torácica, coração e rins de ratos controles ou suplementados com L-arginina;

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

O trabalho foi realizado na Universidade Estadual de Londrina (UEL) no Departamento de Ciências Fisiológicas e no Departamento de Ciências Patológicas do Centro de Ciências Biológicas (CCB) em colaboração com o departamento de Fisiologia e Biofísica do ICB I da Universidade de São Paulo (USP). Todos os experimentos passaram pela aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal desta Universidade. Processo nº: 5185.2014.79 (Anexo A). Foram utilizados um total de 239 ratos, da linhagem Wistar, provenientes do biotério central da Universidade Estadual de Londrina. O peso dos animais foi padronizado entre 200 a 250 g no início do treinamento ou suplementação de L-arginina. Os ratos foram mantidos em gaiolas coletivas (máximo de 5 animais) à temperatura de 21°C com ciclo claro/escuro de 12 horas, sendo fornecidas água e ração “*ad libitum*”.

3.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS

O presente trabalho foi subdividido em 3 estudos e os animais organizados aleatoriamente em grupos experimentais de acordo com o delineamento proposto para cada estudo.

ESTUDO 1: Papel modulatório da nNOS do núcleo paraventricular do hipotálamo sobre o controle barorreflexo de ratos treinados por natação;

Grupos experimentais: Sedentários (S) ou treinados (T) (natação).

ESTUDO 2: Inibição da nNOS do núcleo paraventricular do hipotálamo no controle autonômico cardiovascular de ratos submetidos ao treinamento de corrida;

Grupos experimentais: Sedentários (S) ou treinados (T) (em esteira).

ESTUDO 3: Efeitos da suplementação oral de L-arginina na modulação cardiovascular pelo núcleo paraventricular do hipotálamo.

Grupos experimentais: Controle (C) (tratados com água) ou L-arginina (LA) (suplementados com L-arginina).

3.3 DELINEAMENTOS E PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

3.3.1 Treinamento Físico: Natação

No estudo 1, os animais treinados foram submetidos ao protocolo de treinamento de natação, o qual foi realizado de acordo com Martins-Pinge, (2005) porém, todos os animais (sedentários ou treinados) tiveram o peso corporal avaliado diariamente antes do início de cada sessão de natação para acompanhamento de crescimento e desenvolvimento físico. O protocolo de treinamento teve duração total de 4 semanas e consistiu em 20 sessões de exercício que foi realizado uma hora por dia e 5 dias por semana. A primeira semana de treinamento foi destinada a adaptação dos animais ao meio líquido e houve um aumento gradual do tempo de natação até alcançar o tempo de uma hora, iniciando com 15 minutos no primeiro dia, seguido de 30 minutos no segundo dia, 45 minutos no terceiro e uma hora no quarto dia em diante. Os animais realizaram o treinamento em um tanque de vidro (100X60X50 cm) contendo água aquecida a $31\pm 1^{\circ}\text{C}$ e profundidade de 40 cm (de água). Após cada sessão de natação diária os animais foram colocados em uma caixa aquecida para secagem e depois de secos, retornavam ao biotério.

3.3.2 Treinamento Físico: Corrida

No estudo 2, a adaptação dos ratos para a corrida em esteira elétrica ocorreu durante 2 semanas. Neste período, os animais foram submetidos diariamente (5 vezes por semana) a sessões de corrida que tinham duração total de 10 minutos, sob velocidade de 0,4 - 0,7Km/h e 0% de inclinação. Após esse período de adaptação ao treinamento, os ratos foram selecionados segundo a habilidade em andar/correr na esteira ergométrica e foram excluídos dos protocolos os animais inaptos para andar/correr. Um teste de esforço máximo foi realizado durante o exercício físico na esteira ergométrica (Inbramed, Millenium, adaptada para ratos) para determinar a intensidade do esforço físico, avaliada indiretamente pela distância máxima percorrida. O teste era iniciado com a velocidade de 0,3 km/h, com incrementos de 0,3 km/h a cada 3 minutos até a exaustão do animal. A carga máxima considerada foi aquela em que o animal não conseguia mais correr espontaneamente. O teste de esforço máximo foi realizado no início, ao meio e ao final do protocolo de treinamento ou sedentarismo e utilizados respectivamente para aferir a intensidade do treinamento e do ganho de desempenho nos grupos T e S ao final dos protocolos experimentais.

O treinamento aeróbio em esteira já padronizado (Dufloth et al, 1997; Braga et al., 2000; Amaral et al, 2000) é considerado de baixa a moderada intensidade pois é realizado em 50-60% da velocidade atingida no teste de esforço, durante 5 dias/semana, 1h/dia, sem inclinação e com duração total de 8 semanas (Anexo B). Após a realização do teste de esforço, a intensidade do exercício era aumentada gradativamente pela combinação da velocidade e duração até atingir a velocidade estabelecida no teste de esforço. Os ratos alocados nos grupos S foram mantidos em sedentarismo por igual período de tempo (8 semanas) e, apenas 1 vez/semana eram colocados na esteira (5-10 minutos com velocidade de 0,3-0,6 Km/h) para habituação à manipulação experimental e realização dos testes de esforço.

3.3.3 Suplementação Oral Com L-Arginina

No estudo 3, não foi realizado protocolo de treinamento físico. A suplementação oral com L-arginina (Sigma-Aldrich CO®, Saint Louis MO, USA) foi realizada em animais do grupo LA, durante 4 semanas, pelo tubo gástrico do animal (gavagem) sendo preparada diariamente na dose de 62,5mg/ml/rato/dia, e administrada 1ml/rato/dia (Yang et al., 1998; Valgas da Silva et al., 2015). Em animais do grupo C, foi administrado via gavagem o mesmo volume de água de torneira.

3.3.4 Implante De Cânulas-Guia Direcionadas Ao PVN

Um dia após a última sessão de natação, esteira ou suplementação oral com L-arginina, os animais foram anestesiados com 100mg/kg de Cloridrato de Cetamina e 6,68mg/Kg de Cloridrato de Xylasina (via intraperitoneal, *i.p.*) e submetidos a cirurgia estereotáxica para implante bilateral de cânulas guia direcionadas ao PVN. Os ratos foram colocados no aparelho estereotáxico com a barra incisiva 5 milímetros abaixo da linha interaural e foram produzidos dois forames bilaterais e equidistantes da linha média, para o implante das cânulas-guia, cujas coordenadas estereotáxicas de referência foram: sutura bregma (antero posterior = -1.4mm, lateral = 0.5mm; dorso-ventral = 6.5mm). As cânulas-guia foram fixadas no crânio com resina acrílica e um oclisor introduzido nelas com objetivo de não obstruí-las até a realização dos experimentos. Como medida profilática, após a cirurgia cerebral, foi administrada uma dose de penicilina (30.000 U) por via

intramuscular na pata posterior direita. Em seguida, os animais retornavam para o biotério onde permaneciam três dias para recuperação cirúrgica.

3.3.5 Cateterismo De Artéria E Veia Femoral Para Registro De Parâmetros Cardiovasculares

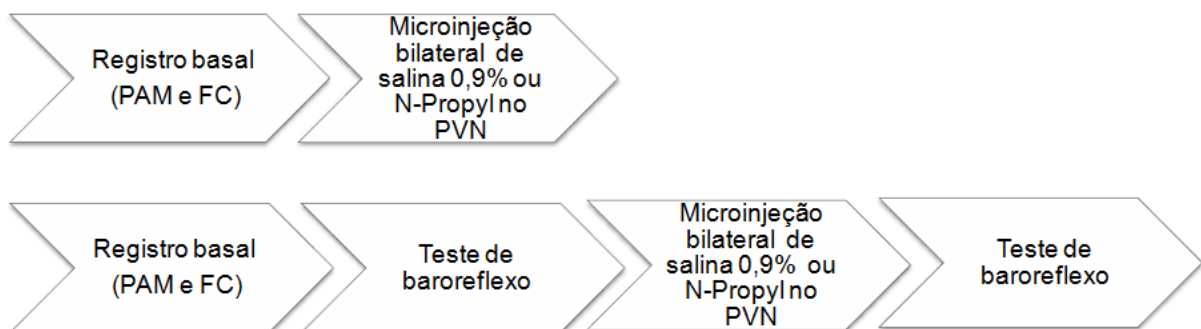
Após 3 dias de recuperação, os animais dos estudos 1, 2 e 3 foram submetidos à nova anestesia (100mg/kg de Cloridrato de Cetamina e 6,68mg/Kg de Cloridrato de Xylasina, *i.p.*) para o cateterismo de artéria e veia femorais, com objetivo de monitorização da PA e administração de drogas, respectivamente. Após 24 horas dessa cirurgia, a cânula arterial de cada animal foi acoplada a um transdutor de pressão (Powerlab modelo MLT0380) e conectada ao sistema de registro computadorizado (Powerlab/ ADInstruments).

3.3.6 Protocolos Experimentais

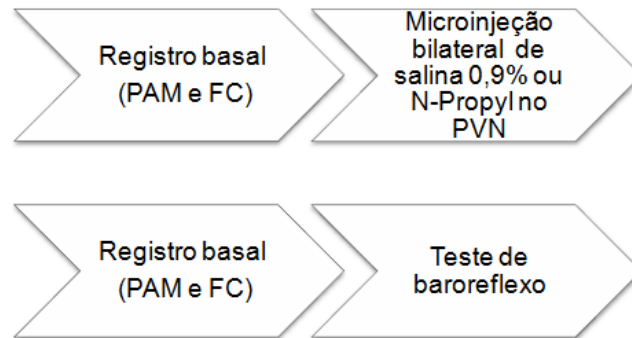
Os registros dos parâmetros cardiovasculares foram conduzidos em uma sala silenciosa, em animais não-anestesiados e livres para movimentação. Inicialmente, cada animal era alocado em uma caixa individualizada e submetido ao registro basal da PA média (PAM) e FC (aproximadamente 30 minutos), e em seguida, os protocolos experimentais foram realizados.

No PVN, as microinjeções bilaterais de salina 0,9% (100nl) (Martins-Pinge et al., 2012), N-Propyl-L-Arginina (N-Propyl) (inibidor seletivo de nNOS, 4nmol/100nL) (Busnardo et al., 2010) ou L-arginina (0,17 g/ml, 100nL, *adaptado* de Zheng et al., 2005) foram realizadas com o auxílio de uma cânula de polietileno (P10) acoplada a uma seringa Hamilton (10 μ l) e agulha gengival (30G, curta).

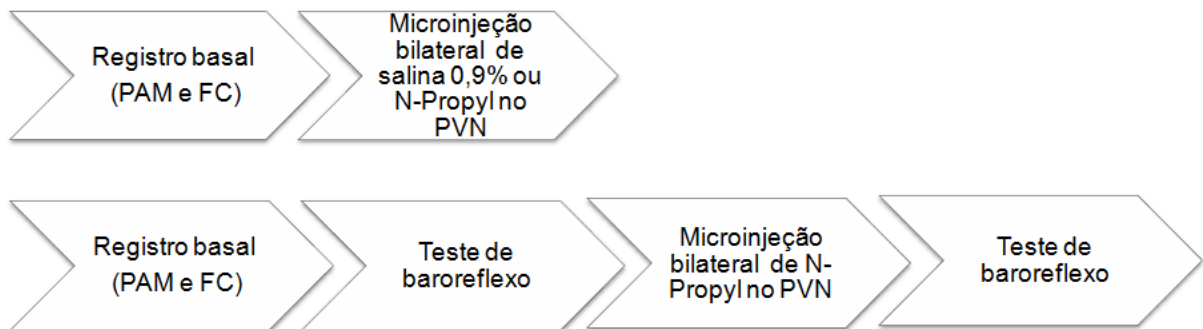
Animais S e T (natação) foram submetidos aos seguintes protocolos experimentais:



Animais S e T (corrida) foram submetidos aos seguintes protocolos experimentais:



Animais C e LA foram submetidos aos seguintes protocolos experimentais:



Animais C foram submetidos aos seguintes protocolos experimentais:



Observamos que as alterações cardiovasculares em resposta ao N-Propyl e L-arginina no PVN tinham duração de 6 a 8 minutos. Sendo assim, padronizou-se a observação dos parâmetros cardiovasculares por no mínimo 10 minutos após a microinjeção das drogas no PVN. Após esse período, os valores cardiovasculares basais eram reestabelecidos e então o teste de barorreflexo podia ser repetido.

Todos os protocolos experimentais foram conduzidos em animais não-anestesiados e não foram observados sinais externos de desconforto ou respostas de agressividade após a microinjeção de salina 0,9%, N-Propyl ou L-arginina no PVN. Além disso, todos os sítios de microinjeção no PVN foram confirmados por histologia (Figura 8A; Figura 18A; Figura 26).

Inicialmente, a intenção era realizar os mesmos protocolos experimentais nos animais dos estudos 1, 2 e 3, entretanto, houve um imprevisto na logística e o equipamento emprestado para a realização do treinamento de corrida (esteira ergométrica) precisou ser realocado para o laboratório de seus proprietários (nossos colaboradores) na Universidade de São Paulo. Sendo assim, alguns protocolos experimentais, principalmente dos estudos 2 e 3 tiveram que ser reajustados para a conclusão deste trabalho.

No estudo 3, após a realização do protocolo de microinjeção bilateral de N-Propyl no PVN, ao final do experimento, a tíbia posterior direita foi coletada, dissecada e medida (cm) para corrigir os pesos dos tecidos cardíacos (g) em relação ao tamanho dos animais (Voltera et al., 2008). Tal procedimento foi realizado na tentativa de inferir ausência de hipertrofia cardíaca nos animais LA e justificar que os resultados obtidos no estudo 3 foram principalmente devido a alterações autonômicas e não morfofuncionais ao sistema cardiovascular.

3.3.7 Teste Do Barorreflexo

Nos estudos 1 e 3, a função do barorreflexo foi avaliada através do disparo dos barorreceptores por injeção intravenosa (*i.v*) em bolus (100 μ L) de fenilefrina (12,8 μ g/kg) e nitroprussiato de sódio (25,6 μ g/kg). Houve infusão de salina 0,9% (*i.v*) entre as drogas e, até o retorno dos valores basais de PAM e FC, não eram realizadas injeções subsequentes (Higa et al., 2002). O teste do barorreflexo foi realizado em animais S e T (natação) antes e após a microinjeção de salina 0,9% ou N-Propyl no PVN, em animais C e LA antes e após a microinjeção de N-Propyl no PVN e em animais C antes e após a microinjeção de L-arginina no PVN. Para estimar o controle barorreflexo de cada animal, foram construídas barocurvas considerando o tempo de ação de cada droga. De acordo com as doses utilizadas, a resposta máxima para fenilefrina aconteceu em 5 segundos e 15 segundos para o nitroprussiato de sódio. Sendo assim, para a construção das barocurvas, foram considerados os valores de PAM e FC registrados imediatamente antes da infusão das drogas e durante as respostas, até alcançar a resposta máxima (Adaptado de Ceroni et al., 2009). As análises estatísticas dos parâmetros cardiovasculares usados para a construção das barocurvas foram realizadas separadamente e apresentadas nas Tabelas 1, 9 e 10.

Animais S e T em esteira (sem implantes de cânulas-guia no PVN) foram submetidos a um registro cardiovascular basal de 30 minutos, e em seguida, foi avaliada a função do barorreflexo através do disparo dos barorreceptores por injeção intravenosa (*i.v*) em bolus (100 μ L) de doses crescentes de fenilefrina e nitroprussiato de sódio (0,2 até 25,6 μ g/kg). Houve infusão de salina 0.9% (*i.v*) entre as drogas e não eram realizadas injeções subseqüentes até o retorno dos valores basais de PAM e FC (Higa et al., 2002). O controle barorreflexo de cada animal foi estimado através de equação logística sigmoidal e foram considerados os valores de PAM e FC para a construção das barocurvas, de acordo com descrições prévias (Raquel et al., 2016, Higa et al., 2002; Head e McCarty, 1987). As análises estatísticas dos parâmetros cardiovasculares usados para a construção das barocurvas foram realizadas separadamente e apresentadas na Tabela 2. Ao final desses experimentos, os animais foram eutanasiados com uma dose (*i.v*) de anestésico (Tiopental Sódio, 0,3 ml) e tiveram alguns tecidos centrais e periféricos coletados e reutilizados para padronização de outras técnicas no laboratório.

Em geral, para facilitar o entendimento dos parâmetros cardiovasculares utilizados para a construção das barocurvas, podemos considerar as seguintes características e/ou definições:

Platô inferior: Representa a diminuição da FC induzida pela infusão (*i.v*) de fenilefrina. Também é considerado como o resultado da maior saída vagal para o coração e menor atividade nervosa simpática (ANS) para a periferia.

Platô superior: Representa o aumento da FC induzido pela infusão (*i.v*) de nitroprussiato de sódio.

Range da FC: É a diferença entre o platô inferior e superior, ou seja, o quanto a FC diminuiu ou aumentou frente as doses de fenilefrina ou nitroprussiato de sódio, respectivamente.

BP50: É considerado o valor médio da PA no meio da barocurva, ou seja, 50 % do aumento máximo da PA.

Ganho máximo de sensibilidade: Representa o ganho máximo de sensibilidade durante o teste de barorreflexo. Nessa análise, a curva é construída à partir dos valores de platô inferior, range de FC, curvatura e BP50 alcançados durante o teste de barorreflexo de cada animal.

3.3.8 Sítios De Microinjeção E Histologia Do PVN

Ao final dos protocolos experimentais de microinjeções, todos os animais foram eutanasiados com uma dose (*i.v.*) de anestésico (Tiopental Sódio, 0.3 ml). Em seguida, os sítios de microinjeção no PVN foram marcados com 100 nL de corante Azul de Evans 2%. Logo após, os cérebros dos animais foram removidos e armazenados em formaldeído 10% para posterior corte histológico e análise das lâminas. Todos os cérebros foram seccionados na região do PVN, em cortes de 40 μ m, utilizando-se um criostato Leica-CM1520, sob temperatura de -20°C. Os cortes obtidos foram posicionados em lâminas de vidro e corados pela técnica de vermelho neutro 1%. Um atlas digital de cérebro para ratos (Paxinos e Watson, 1997) foi utilizado como referencial anatômico e somente animais com os sítios marcados no PVN foram considerados como animal experimental.

3.3.9 Análise Espectral Da Variabilidade Da Frequência Cardíaca E Da Pressão Sistólica

As análises da variabilidade do intervalo de pulso (IP), que correspondem à variabilidade da FC e da variabilidade da pressão arterial sistólica (PAS) foram realizadas no domínio do tempo e da frequência através do software CardioSeries® v2.4, conforme descrito por Silva et al.,(2015).

Para a análise espectral dos animais dos estudos 1 e 2 foram considerados os dados cardiovasculares adquiridos 10 minutos após a microinjeção de salina ou N-Propyl no PVN. Nos animais do estudo 3, foram considerados os parâmetros cardiovasculares adquiridos durante os 10 últimos minutos de registro basal de ratos C ou LA submetidos a microinjeção bilateral de N-Propyl no PVN (período esse que antecedia as microinjeções no PVN) e os 10 minutos subsequentes à esta microinjeção.

Os dados foram processados por um programa computacional específico (LabChart 7 Pro®, ADInstruments, Bella Vista, Austrália) que é capaz de detectar pontos de inflexão na pressão de pulso gerando séries batimento-a-batimento do IP e da PAS para cada ciclo cardíaco. No software CardioSeries®, as séries batimento-a-batimento destes parâmetros foram reamostradas em 10 Hz (1 valor a cada 100 ms) por interpolação cúbica e em seguida, as séries de IP e PAS interpoladas foram divididas em 50% pela sobreposição dos segmentos. Todos os segmentos foram inspecionados visualmente e aqueles com artefatos ou dados não-

estacionários foram excluídos das análises. O espectro foi calculado para os segmentos utilizando um algoritmo de transformada rápida de Fourier para séries temporais discretas e foi integrado em bandas de baixa frequência (LF, 0.2-0.75 Hz) e alta frequência (HF, 0.75-3.0 Hz). Os resultados foram expressos em unidades absolutas (ms^2 ou mmHg^2) e o cálculo da potência relativa de LF e HF, levando em consideração a potência total de espectro menos a potência da banda de muito baixa frequência (VLF: $< 0,20$ Hz), permitiu também a expressão dos dados em unidades normalizadas (nu). O cálculo da razão entre as potências das bandas de LF e HF (LF/HF) do espectro do IP permitiu avaliar o balanço simpato-vagal cardíaco.

A análise estatística dos dados gerados pelo CardioSeries®, foram realizadas em um programa denominado "INSTAT" (GraphPad, San Diego, CA) e os resultados foram expressos como média \pm erro padrão (Silva et al., 2015).

3.3.10 Análise Da Sensibilidade Do Barorreflexo Espontâneo

Os mesmos trechos de séries temporais batimento-a-batimento do IP e da PAS utilizados para as análises de variabilidade da PAS e FC dos animais dos estudos 1, 2 e 3 foram processados no programa CardioSeries® v2.4 para as análises de barorreflexo espontâneo pelo método da sequência. As séries temporais analisadas apresentaram quatro ou mais batimentos onde aumentos progressivos na PAS eram acompanhados de aumentos progressivos no IP, ou reduções progressivas na PAS eram acompanhadas por reduções progressivas no IP. Os limites de detecção para as mudanças na PAS e IP foram 0 mmHg e 0 ms, respectivamente. Após a detecção de uma rampa de PAS (sequência de 4 ou mais batimentos em que aumentos ou reduções progressivas na PAS foram seguidas ou não por aumentos ou reduções no IP) o programa buscava a mudança imediata no IP, sem intervalos. Assim, uma sequência barorreflexa foi usada apenas quando o coeficiente de correlação (r) entre a PAS e o IP foi $\geq 0,8$, e a sensibilidade do barorreflexo espontâneo determinada a partir da regressão linear entre a PAS e o IP de cada sequência barorreflexa (Silva et al., 2015).

3.3.11 Coleta E Armazenamento De Tecidos Para Análises De Composição Corporal E Dosagem De Nitrito

Animais S e T (natação e corrida) e C e LA não submetidos ao implante de cânulas-guia no PVN e cateterismo de artéria/veia femorais foram destinados à coleta e armazenamento de tecidos periféricos e PVN para análises de composição corporal e dosagens de nitrito.

Um dia após a última sessão de natação, corrida ou suplementação oral com L-arginina, os animais foram anestesiados (100mg/kg de Cloridrato de Cetamina e 6,68mg/Kg de Cloridrato de Xylasina, *i.p.*) e submetidos a mensuração da distância naso-anal (cm) e peso corporal (g) para a estimativa de crescimento e desenvolvimento físico. Em seguida, para a remoção do sangue dos tecidos, foi realizada uma perfusão (via ventrículo esquerdo) com salina 0,9% (~30 mL/min, por 5 minutos) (*adaptado* Cavalleri et al., 2011). Logo após, os cérebros foram rapidamente removidos e congelados em gelo seco. Punchs bilaterais do PVN foram obtidos à partir de cortes congelados de hipotálamo (1000-1200 µm de espessura) e imediatamente estocados em -80°C em tubos individualizados para posteriores dosagens de nitrito. O coração e rim direito de cada animal foi coletado, pesado e armazenado individualmente em -80°C até a realização das dosagens de nitrito. Outros tecidos periféricos como tecido adiposo retroperitoneal, tecido adiposo perigonadal, músculo sóleo, músculo gastrocnêmio e glândulas adrenais foram coletados e pesados individualmente para análises de composição corporal.

Animais do estudo 3 foram submetidos à coleta de aproximadamente 2ml de sangue, por punção cardíaca. O sangue foi centrifugado (3000 rpm, 10 minutos, 4°C) e o plasma coletado foi armazenado a -80°C para as dosagens de nitrito. No estudo 3, houve ainda a remoção e dissecação da aorta torácica dos animais para dosagens de nitrito.

Os experimentos dos estudos 1, 2 e 3 aconteceram concomitantemente, porém, devido a real necessidade de devolução da esteira ergométrica para os seus proprietários e colaboradores da Universidade de São Paulo, alguns protocolos experimentais tiveram que ser reajustados e por isso nota-se por exemplo, a ausência das dosagens de nitrito no plasma e na aorta torácica de animais dos estudos 1 e 2.

3.3.12 Níveis De Nitrito Em Tecidos Periféricos E PVN

Nos estudos 1, 2 e 3, os níveis de NO do coração, rins, PVN, plasma e aorta torácica foram estimados através da análise de nitrito por método de Griess, seguindo algumas adaptações de estudos prévios (Navarro-González et al., 1998; Panis et al., 2011). O método consistiu na adição de grânulos de Cádmio para converter todo o nitrato em nitrito, permitindo assim uma estimativa da quantidade total de NO nas amostras. A leitura da absorbância das amostras foi realizada em um leitor de microplacas padronizado (Multiskan EX, LabSystems®, Minnesota USA). Os reagentes para as dosagens de nitrito foram obtidos da Sigma Chemical Co® (St. Louis, MO, USA) e os resultados expressos em μM de nitrito.

3.3.13 Coleta E Armazenamento Do PVN Para Análises De Expressão Gênica E Imunohistoquímica

Um dia após a última sessão de natação ou corrida, ratos S ou T não submetidos ao implante de cânulas-guia no PVN e cateterismo de artéria/veia femorais foram anestesiados (100mg/kg de Cloridrato de Cetamina e 6,68mg/Kg de Cloridrato de Xylasina, *i.p.*) e os cérebros perfundidos com salina tamponada com fosfato (PBS 0.1 M, pH 7.4, ~30 mL/min por 5 minutos, via ventrículo esquerdo) (Cavalleri et al., 2011). Após tal procedimento, 6-10 ratos tiveram os cérebros rapidamente removidos e congelados em gelo seco. Punchs bilaterais do PVN foram obtidos à partir de cortes congelados de hipotálamo (1000-1200 μm de espessura) e imediatamente estocados em -80°C com 1 mL de Trizol® para posteriores análises de expressão gênica.

Para as análises de imunohistoquímica, 6 ratos S ou T (natação ou corrida) foram submetidos aos mesmos procedimentos de anestesia e perfusão de salina tamponada com fosfato citados acima (Cavalleri et al., 2011), porém, em seguida, tiveram os cérebros perfundidos com paraformaldeído 4% (PFA, 30 mL/min por 20-30 minutos, via ventrículo esquerdo). Logo após, os cérebros foram removidos e pós fixados em PFA 4% por 24-48 horas. Cortes coronais sequenciais do hipotálamo (40 μm) foram realizados utilizando um criostato (Leica-CM3050) e estocados em solução crioprotetora (20% glicerol + 30% etileno glicol em 50 mM PBS, pH 7.4, -20°C) por um período aproximado de 2 semanas, até a realização dos procedimentos de imunohistoquímica (Schreihofer e Guyenet., 1997).

3.3.14 Análise Da Expressão Gênica De Nnos No PVN

A expressão gênica de nNOS no PVN foi estimada em ratos S e T (natação ou corrida). Foi utilizado Trizol® para extração do RNA total que foi dissolvido em 10 µL de água DEPC e estocado em -80°C. As amostras foram tratadas com DNase I para a síntese de cDNA por transcrição reversa (Revert Aid TMM-MuLV Reverse Transcriptase) e o cDNA obtido foi então estocado em -20°C. Foi utilizado o Platinum SYBRGreen qPCR Supermix-UDG para amplificação das amostras (Cavalleri et al., 2011) com primers específicos para nNOS: Gene Bank: NM_0522799.1/Fragment Size: 118pb, senseprimer: CGCTACGCGGGCTACAAGCA, antisenseprimer: GCACGTCTGAAGCGGCCTCTT). A expressão do RNA foi estimada por medida semi-quantitativa através de PCR em tempo real (7500 Real-Time PCR System). O gene endógeno utilizado foi a hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase (HPRT) (Gene bank: NM_012583.2/Fragment Size: 125pb) a qual é continuamente expressa em células do corpo do rato e não é alterada pelo exercício físico (Cavalleri et al., 2011). O software geNorm VBA para Microsoft Excel foi utilizado para as análises da expressão gênica das reações e os valores de threshold cycle (Ct) foram considerados para o método de análise por $\Delta\Delta C_t$ (Cavalleri et al., 2011). Os resultados foram expressos como fold increased. Todos os reagentes e primers utilizados foram adquiridos da Invitrogen (San Diego, CA, USA).

3.3.15 Análises De Imunohistoquímica No PVN

A imunoreatividade para nNOS foi detectada através de imunoperoxidase em cortes sequenciais do hipotálamo usando um anticorpo primário, anti-nNOS (1:200, BD Transduction Laboratories) e um anticorpo secundário, denominado Biotin-SP-conjugated AffiniPure Donkey Anti-mouse IgG (H+L) (1:500, Jackson Immuno Research Laboratories) de acordo com Llewellyn-Smith et al., (2005) e Barna et al., (2012). Os cortes de hipotálamo foram sequenciados em ordem rostrocaudal e fixados em lâmina de vidro com Krystalon (EMD Chemicals Inc, NJ). Para a localização e análise dos neurônios do PVN nos cortes de hipotálamo, utilizou-se um microscópio Zeiss Axioskop 2 (Oberkochen, Germany). A identificação e quantificação dos neurônios imunoreativos para nNOS no PVN foi realizada por único investigador.

3.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

A análise estatística dos resultados dos estudos 1, 2 e 3 foi realizada no programa estatístico Prisma® versão 5 (GraphPad®, San Diego, CA). Os dados foram previamente submetidos ao teste de normalidade (Kolmogorov Smirnov) e homogeneidade de variâncias (Bartlett's). As variáveis apresentaram distribuição normal e homogeneidade de variâncias, portanto, foram analisadas através dos seguintes testes paramétricos:

Student T teste, não pareado: Usado para comparar dois grupos diferentes e/ou duas amostras independentes.

Student T teste, pareado: Utilizado para comparar dados de um mesmo grupo e/ou para amostras emparelhadas.

Análise de variância Anova Two Way (para medidas repetidas), seguido por Bonferroni *post hoc*: Usado para comparar variáveis de dois grupos emparelhados (Sedentários vs. Treinados; ou Controle vs. L-arginina) em função do tempo: antes e após a microinjeção de salina ou N-Propyl no PVN; peso corporal dos animais ao longo dos protocolos de treinamento ou suplementação; velocidade e tempo máximo alcançado pelos animais em testes de esforço.

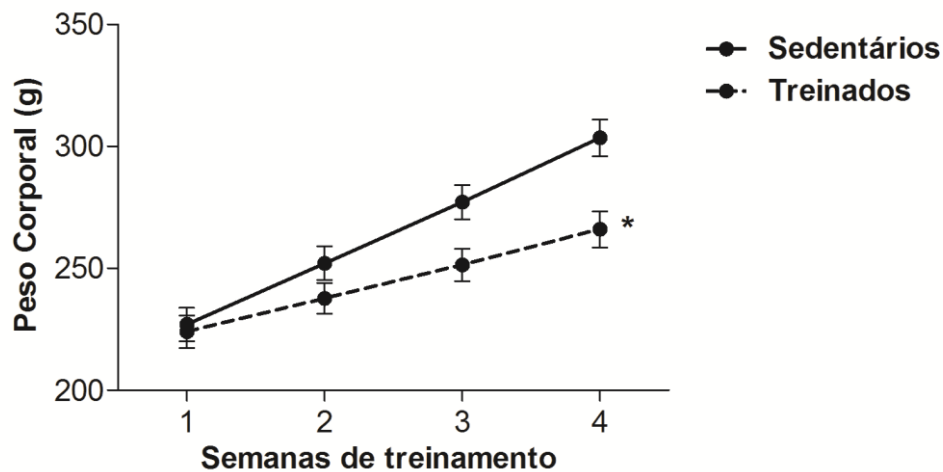
Todos os resultados foram expressos como média \pm erro padrão e adotou-se como nível de significância $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 ESTUDO 1: PAPEL MODULATÓRIO DA nNOS DO NÚCLEO PARAVENTRICULAR DO HIPOTÁLAMO SOBRE O CONTROLE BARORREFLEXO DE RATOS TREINADOS POR NATAÇÃO.

Ao final do protocolo de 4 semanas de treinamento de natação, foi observado em ratos T menor peso corporal (S: 303 ± 7 vs. T: 266 ± 7 g, $*P < 0,05$, **Figura 1A**), sem mudanças significativas na distância naso-anal (S: $23 \pm 0,1$ vs. T: $23 \pm 0,1$ cm, $P > 0,05$ **Figura 1B**).

A



B

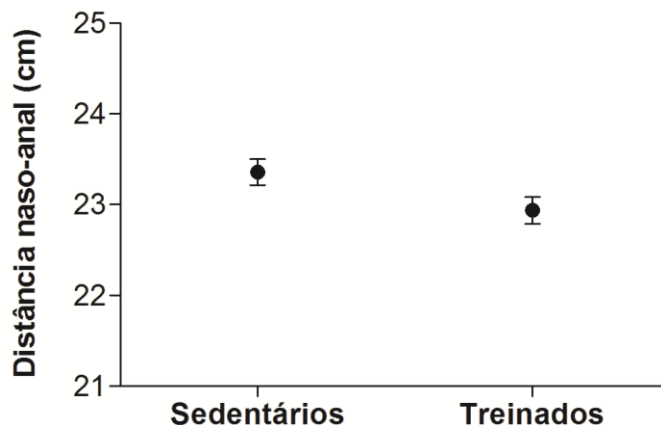


Figura 1: Parâmetros de crescimento corporal em animais sedentários (n=10) ou treinados por natação (n=10). Em **(A)**: Variações de peso corporal (g) ao longo de 4 semanas de treinamento físico ou sedentarismo. Valores analisados por Anova Two Way, *post hoc* Bonferroni e representados por média \pm erro padrão. Significância: * $P < 0,05$ vs. Sedentários (semana 4). Em **(B)**: Valores da distância naso-anal (cm) de ratos após 4 semanas de treinamento ou sedentarismo. Dados analisados por Student T Teste, não pareado e representados por média \pm erro padrão. Sem significância estatística entre os grupos avaliados.

Animais T por natação apresentaram diminuição do peso relativo de tecido adiposo (perigonadal: S: $1\pm 0,1$ vs. T: $0,7\pm 0,06\%$, $*P<0,05$, **Figura 2A** e retroperitoneal: S: $1\pm 0,1$ vs. T: $0,7\pm 0,06\%$, $*P<0,05$, **Figura 2B**) e aumento do peso relativo do coração (S: $0,3\pm 0,01$ vs. T: $0,4\pm 0,01\%$, $*P<0,05$, **Figura 2C**). Os pesos relativos de rins, adrenais, músculos sóleo e gastrocnêmio, não apresentaram diferenças entre os grupos avaliados ($P>0,05$).

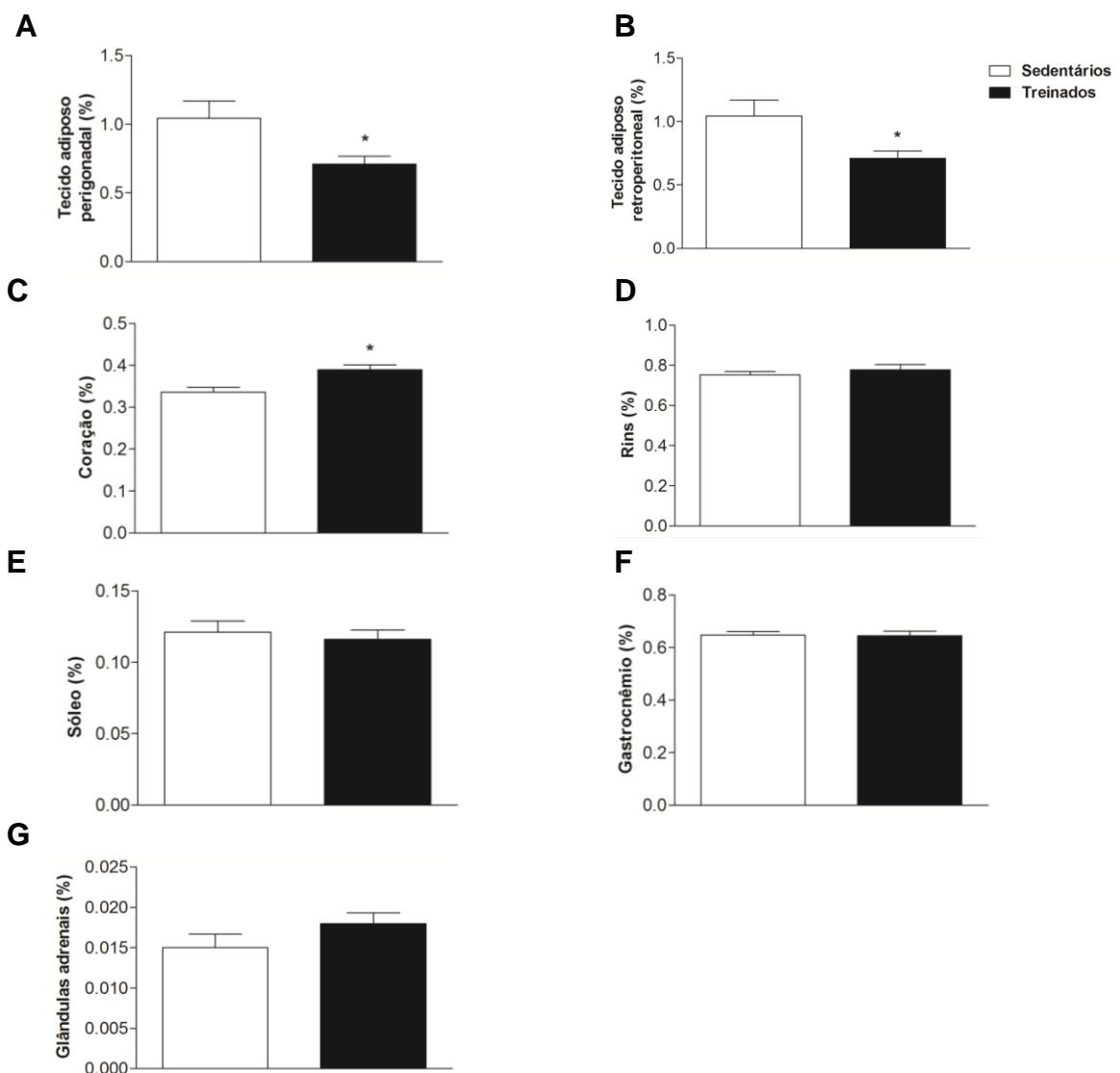


Figura 2: Parâmetros de composição corporal de ratos Wistar após 4 semanas de sedentarismo (barras brancas, $n=10$) ou treinamento de natação (barras pretas, $n=10$). Em **(A)**: Peso relativo de tecido adiposo perigonadal (%), **(B)**: Peso relativo de tecido adiposo retroperitoneal (%), **(C)**: Peso relativo de coração (%), **(D)**: Peso relativo de rins (%), **(E)**: Peso relativo de músculo sóleo (%), **(F)**: Peso relativo de músculo gastrocnêmio (%), **(G)**: Peso relativo de glândulas adrenais (%). Peso Relativo = (peso absoluto do tecido, órgão ou músculo / peso corporal $\times 100$). Valores analisados por Student T test, não pareado e representados por média \pm erro padrão. Significância adotada: $* P<0,05$ vs. Sedentários.

Os resultados do estudo 1 confirmam dados prévios que sugerem efeito benéfico do treinamento de natação ao sistema cardiovascular de ratos normotensos (Martins-Pinge 2005; de Abreu et al., 2009; Raquel et al., 2016). Em repouso, não houve diferença na PAM de animais que receberam salina (PAM: S: 115 ± 1 vs. T: $112 \pm 0,5$ mmHg, $P > 0,05$, **Figura 3A**) ou N-Propyl no PVN (PAM: S: 110 ± 1 vs. T: 109 ± 3 mmHg, $P > 0,05$, **Figura 3A**), porém, foi evidenciada presença de bradicardia em repouso para ratos T por natação que receberam salina (FC basal: S: 382 ± 6 vs. T: 342 ± 3 b/min, $*P < 0,05$, **Figura 3B**) ou N-Propyl no PVN (FC basal: S: 362 ± 12 vs. T: 330 ± 5 b/min, $^{\Delta}P < 0,05$, **Figura 3B**). A microinjeção bilateral de salina dentro do PVN não alterou significativamente os valores de PAM (Δ PAM: S: 5 ± 1 vs. T: 4 ± 1 mmHg, $P > 0,05$, **Figura 3C**) e FC (Δ FC: S: 26 ± 3 vs. T: 26 ± 2 b/min, $P > 0,05$, **Figura 3D**), entretanto, a microinjeção de N-Propyl causou maior resposta pressórica (Δ PAM: S: 25 ± 4 vs. T: 38 ± 2 mmHg, $^{\Delta}P < 0,05$, **Figura 3C**) e taquicárdica (Δ FC: S: 111 ± 32 vs. T: 185 ± 7 b/min, $^{\Delta}P < 0,05$, **Figura 3D**) em ratos T por natação comparados com S.

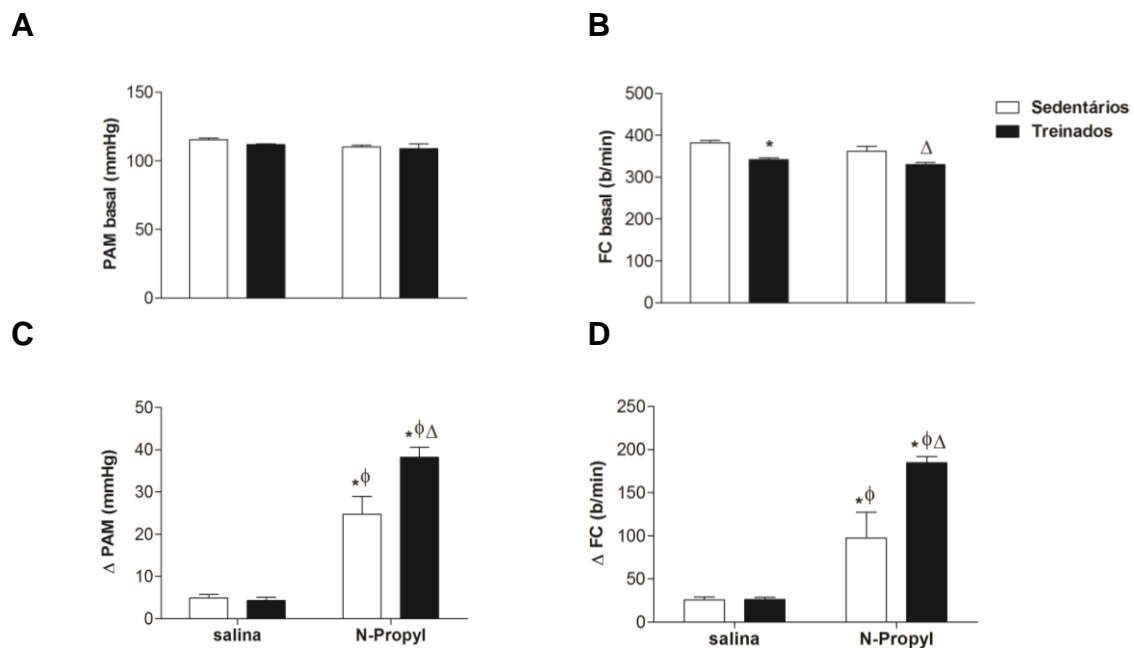
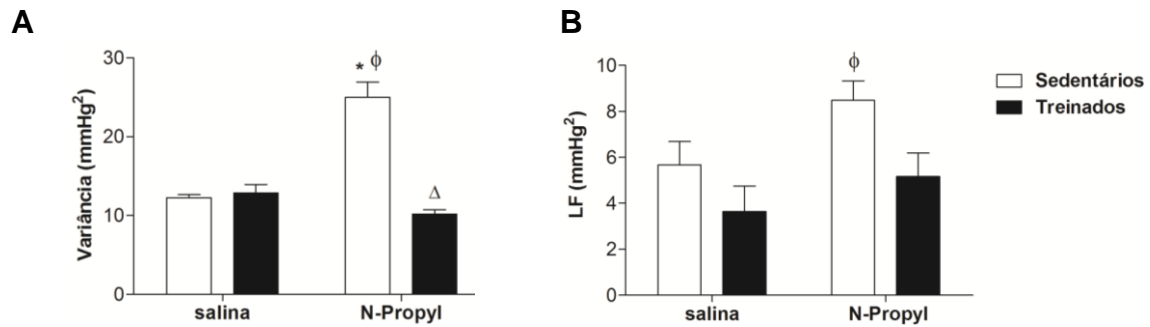


Figura 3: Parâmetros cardiovasculares basais e alterações através da microinjeção bilateral de salina 0,9% ou N-Nw-Propyl-L-arginina (N-Propyl) no PVN de ratos sedentários (barras brancas, n=6) e treinados por natação (barras pretas, n=6). Em **(A)**: Pressão arterial média (PAM) basal (mmHg) e em **(B)**: Frequência cardíaca (FC) basal (b/min). Em **(C)** e **(D)**: Variações de PAM e FC, respectivamente, durante a microinjeção bilateral de salina 0,9% ou N-Propyl no PVN de ratos sedentários ou treinados. Valores analisados por Anova Two Way, Bonferroni *post hoc* e representados por médias \pm erro padrão. Significâncias adotadas: * $P < 0,05$ vs. Sedentários salina; $^{\phi} P < 0,05$ vs. Treinados salina; $^{\Delta} P < 0,05$ vs. Sedentários N-Propyl.

A análise espectral da PAS mostrou que ratos T que receberam N-Propyl no PVN tiveram menor variância (S: 25 ± 2 vs. T: $10 \pm 0,5$ mmHg², $\Delta P < 0,05$, **Figura 4A**) sem diferença estatística na modulação do componente simpático (LF: S: 8 ± 1 vs. T: 5 ± 1 mmHg², $P > 0,05$, **Figura 4B**).

A variabilidade da FC no IP em ratos com PVN tratados com salina revelou que o treinamento físico de natação diminuiu o componente simpático absoluto (LF: S: 8 ± 1 vs. T: $4 \pm 0,3$ ms², $*P < 0,05$, **Figura 4C**) e normalizado (LFnu: S: 46 ± 5 vs. T: 18 ± 1 , $*P < 0,05$, **Figura 4D**) e aumentou o componente parassimpático absoluto (HF: S: 10 ± 2 vs. T: 19 ± 2 ms², $*P < 0,05$, **Figura 4E**) e normalizado (HFnu: S: 58 ± 6 vs. T: 82 ± 1 , $*P < 0,05$, **Figura 4F**). Além disso, a microinjeção de inibidor da nNOS no PVN de ratos T aumentou o componente simpático absoluto comparado com o T salina (LF: T N-Propyl: 9 ± 1 ms², $\phi P < 0,05$, **Figura 4C**) e comparado aos ratos S N-Propyl (LF: $4 \pm 0,9$ ms², $\Delta P < 0,05$, **Figura 4C**). O grupo T que recebeu N-Propyl no PVN mostrou maior valor de componente simpático normalizado comparado com o T salina (LFnu: T N-Propyl: 34 ± 1 , $\phi P < 0,05$, **Figura 4D**) e menor valor quando comparado ao S N-Propyl (LFnu: S: 47 ± 1 , $\Delta P < 0,05$, **Figura 4D**). Foi observado maior valor absoluto de HF para o grupo T N-Propyl comparado ao S N-Propyl (HF: T: 20 ± 1 vs. S: 6 ± 1 ms², $\Delta P < 0,05$, **Figura 4E**) e apesar disso, a inibição da nNOS no PVN não alterou os valores de HF absoluto entre os animais T e o valor normalizado do componente parassimpático do T N-Propyl (HFnu: T: 64 ± 2 , $\phi P < 0,05$, **Figura 4F**) foi diminuído comparado ao T salina. Contudo, na variabilidade da FC no IP foi observado maior valor de variância para o grupo T salina (T: 24 ± 1 vs. S: 12 ± 1 ms², $*P < 0,05$, **Figura 4G**) que foi abolida com a microinjeção de N-Propyl no PVN (T: 19 ± 1 vs. S: 17 ± 2 ms², $\phi P < 0,05$, **Figura 4G**). Então, somente entre os grupos salina foi encontrada diferença estatística para a relação simpato-vagal (LF/HF: S: $1 \pm 0,2$ vs. T: $0,3 \pm 0,1$, $*P < 0,05$, **Figura 4H**).

Pressão Arterial Sistólica



Intervalo de Pulso

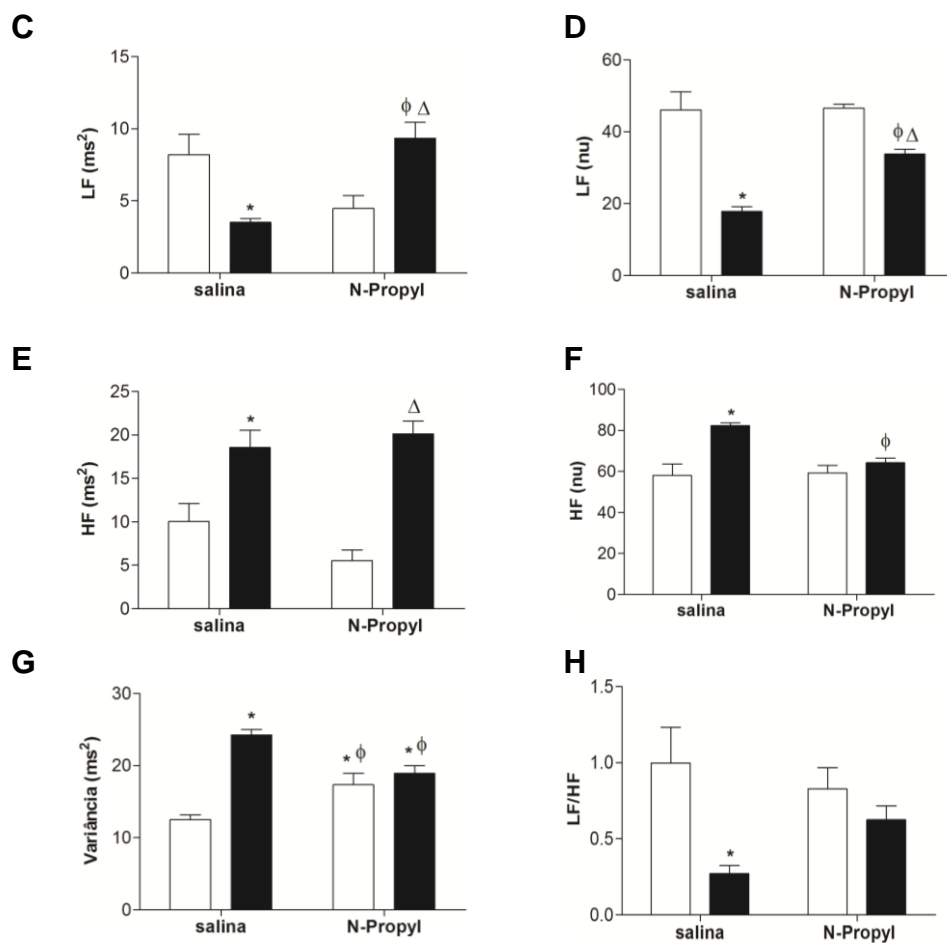


Figura 4: Análise espectral após microinjeção bilateral de salina 0,9% ou N-Propyl no PVN de ratos sedentários (barras brancas, n=6) e treinados por natação (barras pretas, n=6). Em **(A, B)**: Análise espectral da variabilidade da pressão arterial sistólica e em **(C, D, E, F, G, H)**: Análise da variabilidade da frequência cardíaca no intervalo de pulso. LF: baixa frequência; HF: alta frequência; LF/HF: Razão simpato-vagal. Dados normalizados foram apresentados por (nu). Valores analisados por Anova Two Way, *post hoc* Bonferroni e representados por médias \pm erro padrão. Significâncias adotadas: * $P < 0,05$ vs. Sedentários salina; ϕ $P < 0,05$ vs. Treinados salina e Δ $P < 0,05$ vs. Sedentários N-Propyl.

O grupo T que recebeu salina no PVN apresentou melhor índice de barorreflexo espontâneo que o S salina (Ganho total: S: $1,4 \pm 0,1$ vs. T: $2,5 \pm 0,1$ ms/mmHg, ganho up: S: $1,5 \pm 0,1$ vs. T: $2,3 \pm 0,3$ ms/mmHg e ganho down: S: $1,1 \pm 0,2$ vs. T: $2,7 \pm 0,2$ ms/mmHg, $*P < 0,05$, **Figura 5A, B, C**). A inibição da nNOS no PVN diminuiu o ganho total de ambos os grupos comparados com seus respectivos controles salina (S: $1 \pm 0,1$ ms/mmHg, $*P < 0,05$ e T: $2 \pm 0,2$ ms/mmHg, $^{\phi}P < 0,05$, **Figura 5A**), porém, o grupo T N-Propyl ainda permaneceu com maior valor ($^{\Delta}P < 0,05$, **Figura 5A**). O ganho up do grupo T N-Propyl foi maior comparado com o S N-Propyl (T: $2,3 \pm 0,2$ vs. S: $1,2 \pm 0,2$ ms/mmHg, $^{\Delta}P < 0,05$, **Figura 5B**) e a microinjeção de N-Propyl no PVN diminuiu o ganho down de T N-Propyl (T: $1,7 \pm 0,2$ vs. S: $1,2 \pm 0,2$ ms/mmHg, $^{\phi}P < 0,05$, **Figura 5C**), abolindo diferenças observadas previamente.

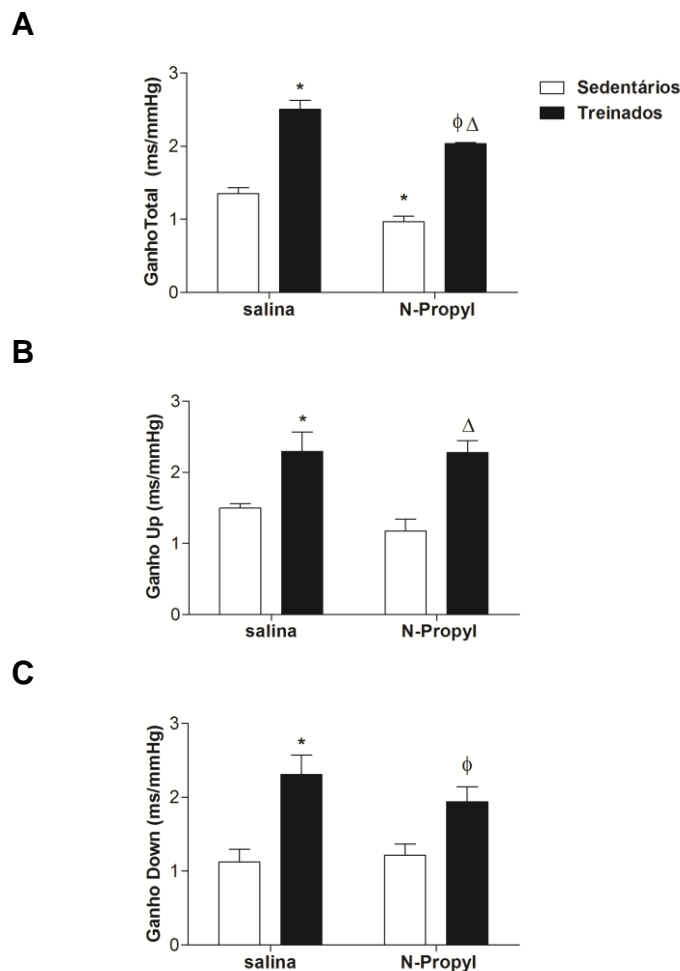
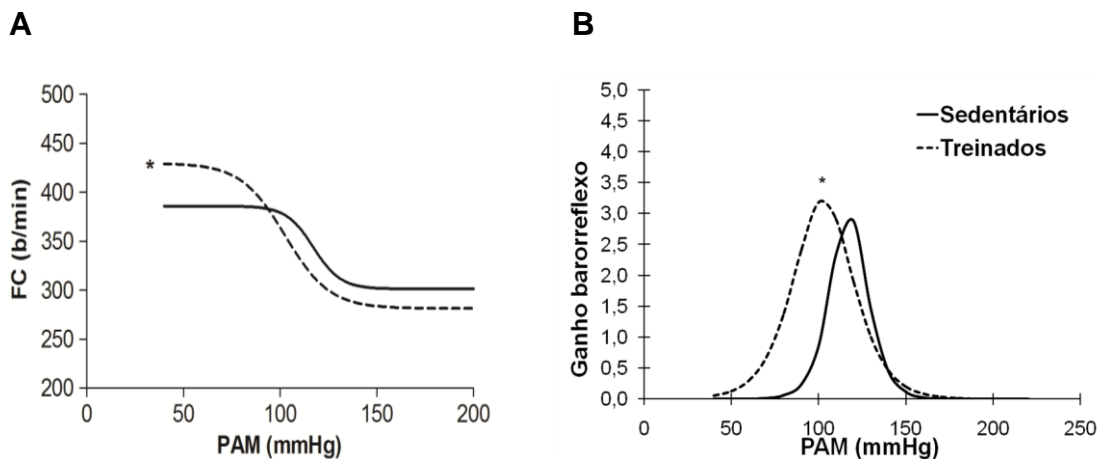


Figura 5: Sensibilidade do barorreflexo espontâneo após a microinjeção bilateral de salina 0,9% ou N-Propyl no PVN de ratos sedentários (barras brancas, $n=6$) e treinados por natação (barras pretas, $n=6$). Em **(A)**: Ganho Total, **(B)**: Ganho Up e **(C)**: Ganho Down (ms/mmHg). Valores analisados por Anova Two Way, *post hoc* Bonferroni e representado por médias \pm erro padrão. Significâncias adotadas: $*$ $P < 0,05$ vs. Sedentários salina; $^{\phi}$ $P < 0,05$ vs. Treinados salina e $^{\Delta}$ $P < 0,05$ vs. Sedentários N-Propyl.

A barocurva representada na **Figura 6A** confirma o melhor ganho barorreflexo demonstrado na **Figura 6B** para ratos T por natação quando comparados aos S. Houve diferenças estatísticas para todos os parâmetros cardiovasculares avaliados (Platô inferior e superior, range de FC, BP50 e máximo ganho de sensibilidade, * $P < 0,05$, **Tabela 1**). A microinjeção de salina no PVN não alterou a análise dos parâmetros cardiovasculares entre os animais, sendo assim, também foi observado melhor resposta barorreflexa para ratos T por natação após a microinjeção de salina no PVN (**Figura 6C, D**), (ver # $P < 0,05$, **Tabela 1**).

Controle barorreflexo antes da microinjeção de salina no PVN



Controle barorreflexo após a microinjeção de salina no PVN

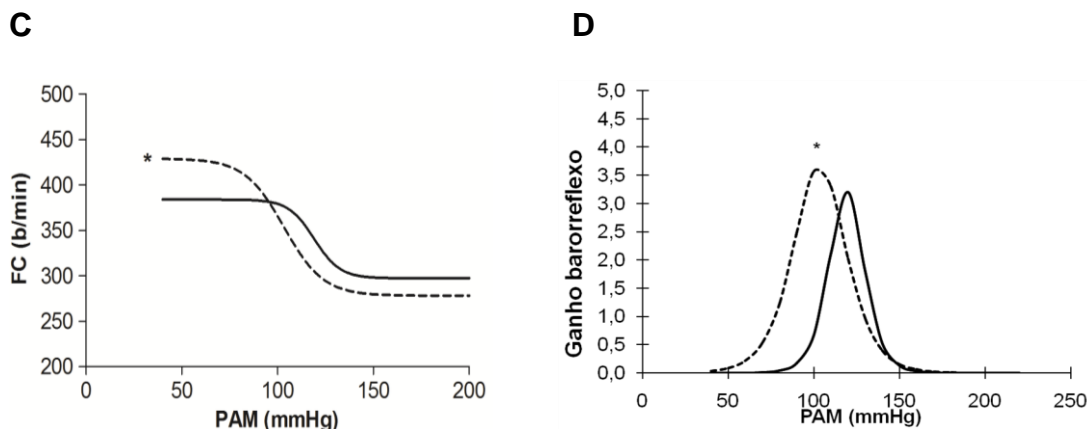


Figura 6: Controle barorreflexo antes e após a microinjeção bilateral de salina 0,9% no PVN. Em **(A, C)**: Curvas sigmóides representando a relação entre pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) durante o disparo dos barorreceptores de ratos sedentários (n=6) e treinados por natação (n=5) antes e após a microinjeção bilateral de salina no PVN. Em **(B, D)**: Alterações do ganho barorreflexo em diferentes níveis de PAM. Valores analisados por Anova Two Way, *post hoc* Bonferroni, Significância adotada: * $P < 0,05$ vs. Sedentários. A descrição detalhada dos parâmetros utilizados para construção das barocurvas assim como as análises estatísticas estão descritas na tabela 1.

Tabela 1. Controle barorreflexo da frequência cardíaca e parâmetros das barocurvas de ratos sedentários ou treinados por natação e submetidos à microinjeção bilateral de inibidor de nNOS no PVN.

Grupos:	Antes da salina no PVN		Após salina no PVN		Antes do N-Propyl no PVN		Após N-Propyl no PVN	
	Sedentários (n=6)	Treinados (n=5)	Sedentários (n=6)	Treinados (n=5)	Sedentários (n=7)	Treinados (n=7)	Sedentários (n=7)	Treinados (n=7)
Platô inferior (b/min)	301±5	281±4*	297±4	278±5 [#]	301±6	257±7 [†]	306±6	268±6 [‡]
Platô superior (b/min)	417±16	429±12*	413±8	425±14 [#]	393±5	436±7 [†]	393±5	396±15 [‡]
Range da FC (b/min)	85±3	148±14*	87±6	151±13 [#]	92±7	178±10 [†]	86±7	128±14 [‡]
BP50 (mmHg)	117±3	103±2*	119±2	103±2 [#]	119±7	102±2	123±6	108±2
Ganho máximo de sensibilidade (b/min/mmHg)	-2,7±0,05	-4,1±0,05*	-2,8±0,2	-4,5±0,1 [#]	-2,7±0,1	-4,4±0,1 [†]	-1,4±0,02 [†]	-2,7±0,3 [‡]

Valores analisados por Anova Two Way, *post hoc* Bonferroni e representados em média ± erro padrão. n é o número de ratos em cada subgrupo. Significâncias adotadas: * P<0,05 vs. Sedentários (Antes da salina no PVN), [#] P<0,05 vs. Sedentários (Após salina no PVN), [†] P<0,05 vs. Sedentários (Antes do N-Propyl no PVN), [‡] P<0,05 vs. Sedentários (Após N-Propyl no PVN), [‡] P<0,05 vs. Treinados (Antes do N-Propyl no PVN).

A **Figura 7A** representa a barocurva de ratos T por natação antes da microinjeção de N-Propyl no PVN e a **Figura 7B** demonstra o melhor ganho barorreflexo deste grupo ($*P<0,05$), evidenciado através de diferenças estatísticas ($^{\dagger}P<0,05$) para os seguintes parâmetros cardiovasculares: Platô inferior e superior, range de FC e ganho máximo de sensibilidade (**Tabela 1**). A microinjeção de N-Propyl no PVN alterou os parâmetros das barocurvas de ratos S e T ($*P<0,05$, **Figura 7C**) diminuindo o ganho barorreflexo de ambos os grupos (**Figura 7D**). Após a inibição da nNOS no PVN houve: Atenuação do ganho máximo de sensibilidade para ratos S ($^{\dagger}P<0,05$, **Tabela 1**) e T ($^{\ddagger}P<0,05$, **Tabela 1**), tal como menor valor de platô inferior ($^{\ddagger}P<0,05$, **Tabela 1**), diminuição do range de FC e platô superior ($^{\ddagger}P<0,05$, **Tabela 1**) para ratos T por natação.

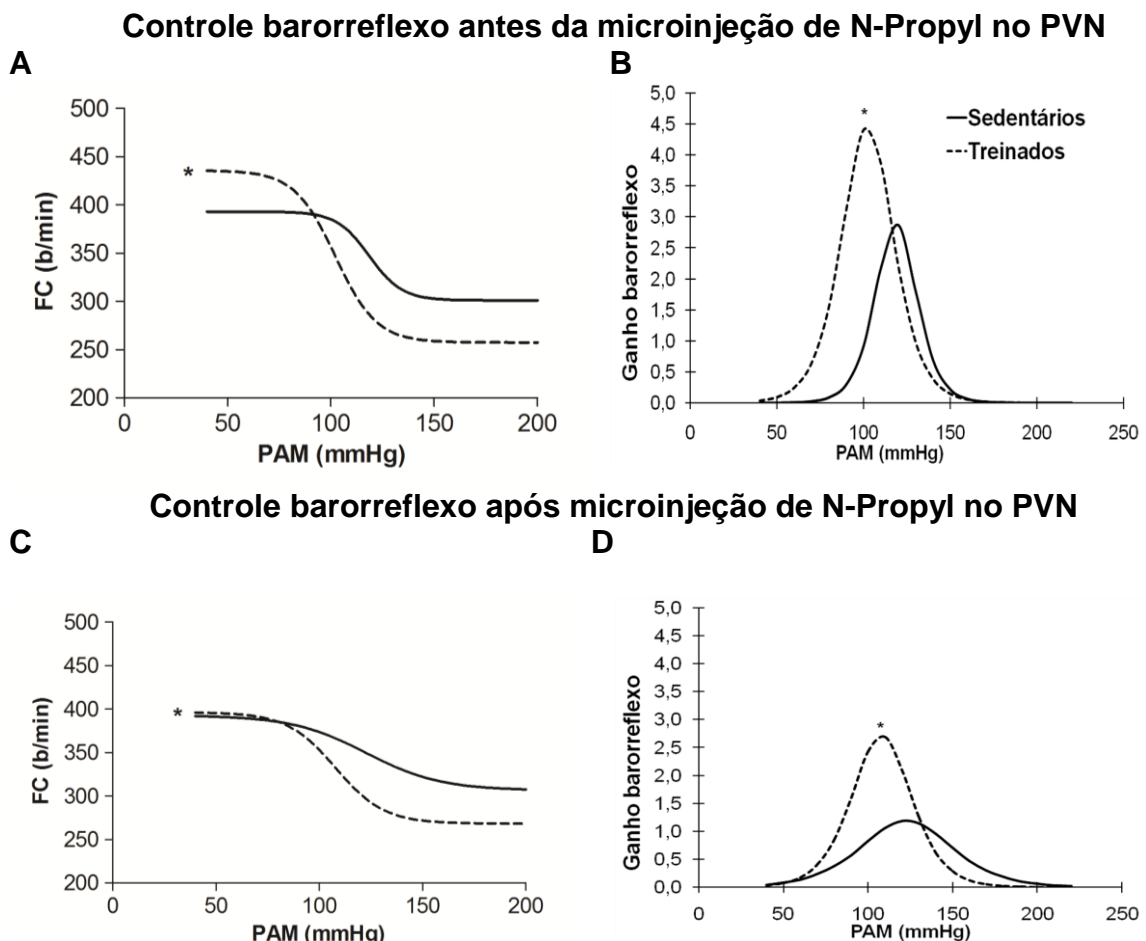
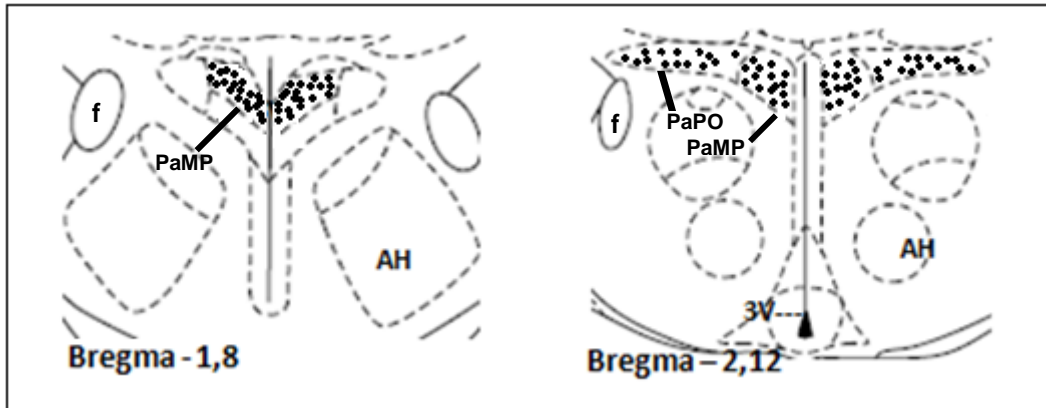


Figura 7: Controle barorreflexo antes e após microinjeção bilateral de N-Propyl no PVN. Em **(A, C)**: Curvas sigmóides representando a relação entre pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) durante o disparo dos barorreceptores em ratos sedentários ($n=7$) e treinados por natação ($n=7$) antes e após microinjeção de N-Propyl no PVN. Em **(B, D)**: Alterações de ganho barorreflexo em diferentes níveis de PAM. Valores analisados por Anova Two Way, post hoc Bonferroni. Significância adotada: $* P<0,05$ vs. Sedentários. Os parâmetros utilizados para construção das barocurvas assim como as análises estatísticas estão descritas na Tabela 1.

Todos os animais do estudo 1 tiveram a confirmação da localização dos sítios de microinjeção (**Figura 8A, B**) e os animais com microinjeção fora do PVN foram excluídos das análises.

A



B

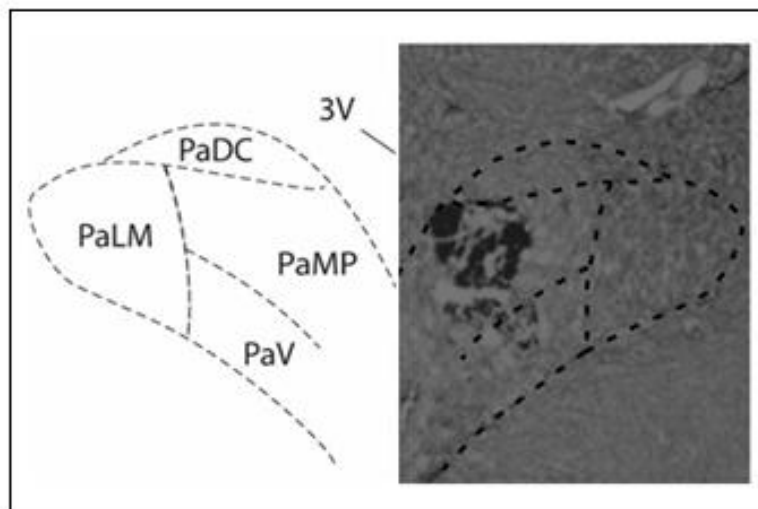


Figura 8: Localização dos sítios de microinjeção bilateral no PVN dos animais do estudo 1. Em **(A)**: Diagrama esquemático com as marcações (•) bilaterais dos sítios de cada microinjeção dentro do PVN de ratos sedentários e treinados por natação (n total= 49 ratos). Em **(B)**: à direita: Fotomicrografia representativa da localização de um sítio de microinjeção dentro do PVN e à esquerda: Figura esquemática do PVN para referência anatômica (Paxinos e Watson, 1997). **(3V)**: terceiro ventrículo, **(f)**: fornix, **(AH)**: área hipotalâmica anterior, **(PaMP)**: núcleo paraventricular do hipotálamo-parte parvocelular medial), **(PaPo)**: núcleo paraventricular do hipotálamo-parte parvocelular posterior), **(PaDC)**: núcleo paraventricular do hipotálamo-dorsal cap, **(PaLM)**: núcleo paraventricular do hipotálamo-parte magnocelular lateral e **(PaV)**: núcleo paraventricular do hipotálamo-parte ventral.

Vale ressaltar que os dados moleculares apresentados no estudo 1 (**Figura 9**) foram relevantes para o entendimento dos achados funcionais. Em ratos T por natação, foi encontrado maior número de neurônios imunoreativos para nNOS no PVN medial (S: 39 ± 1 vs. T: 46 ± 3 , **Figura 9A**, $*P < 0,05$) e PVN posterior (S: 15 ± 1 vs. T: 21 ± 3 , **Figura 9D**, $*P < 0,05$). Somado a isso, ratos T apresentaram maior expressão gênica de nNOS dentro do PVN (Fold Increase: S: $1,1 \pm 0,3$ vs. T: $5,5 \pm 2$ **Figura 9G**, $*P < 0,05$).

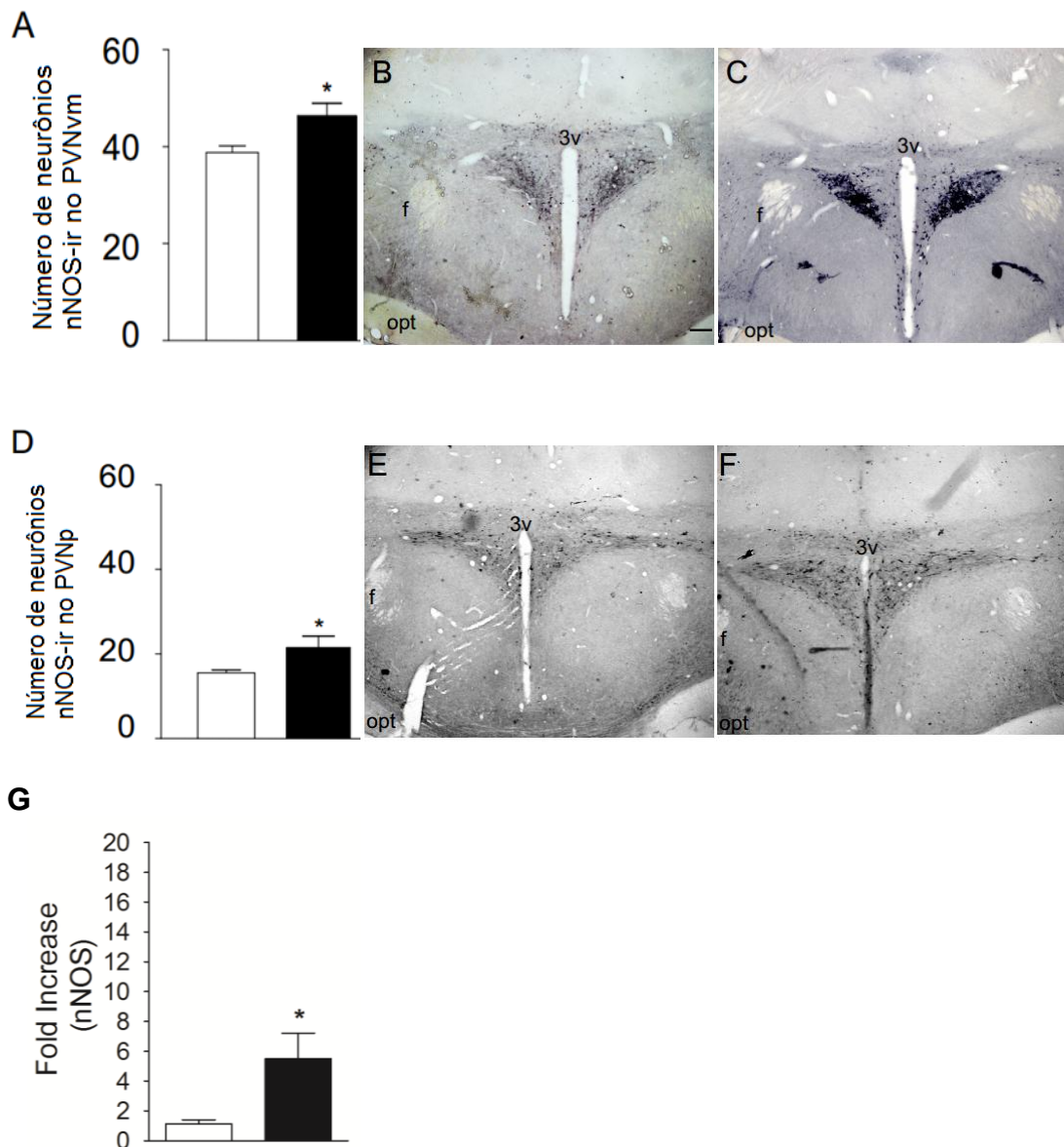
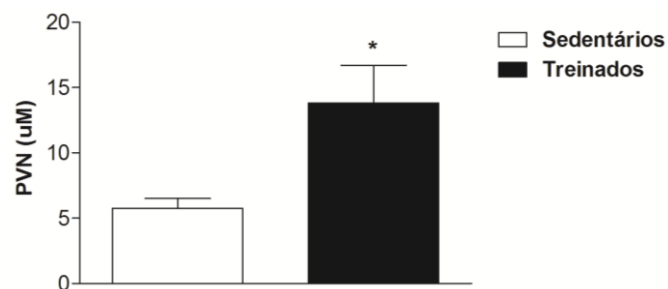


Figura 9: Análises de imunohistoquímica para nNOS e expressão gênica de nNOS no PVN de ratos sedentários (barras brancas) e treinados por natação (barras pretas). Em **(A)**: Número de neurônios imunoreativos para nNOS dentro do PVN ventromedial e em **(D)** dentro do PVN posterior de ratos sedentários (n=6) e treinados (n=6). Em **(B, E)**: Fotomicrografias representativas de sedentários e **(C, F)** de treinados. A escala (—) em **(B)** representa 400 μ m em **C, E, F**. **(3v)**: terceiro ventrículo, **(opt)**: trato óptico, **(f)**: fornix. Em **(G)**: Comparação da expressão gênica de nNOS dentro do PVN de ratos sedentários (n=6) e treinados (n=6). Valores analisados por Student T Teste, não pareado e representado por médias \pm erro padrão. Significâncias adotadas: $* P < 0,05$ vs. Sedentários.

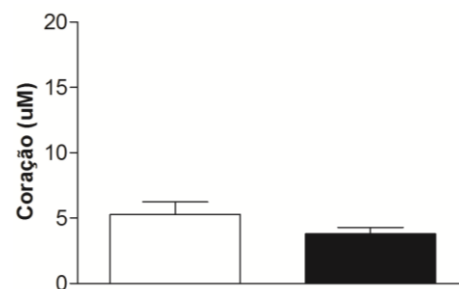
Foi observado ainda que o treinamento de natação contribuiu para maiores níveis de nitrito no PVN (S: 6 ± 1 vs. T: 14 ± 3 uM, **Figura 10A**, $*P < 0,05$), sem modificar os níveis de NO dentro do rim e coração.

Juntos, os dados sugerem que os achados funcionais observados no estudo 1, foram em parte, devido a alterações autonômicas no PVN via nNOS. Apesar disso, mais estudos poderão ser conduzidos para elucidar outros mecanismos de ação do NO para a melhoria do sistema cardiovascular de ratos treinados por natação.

A



B



C

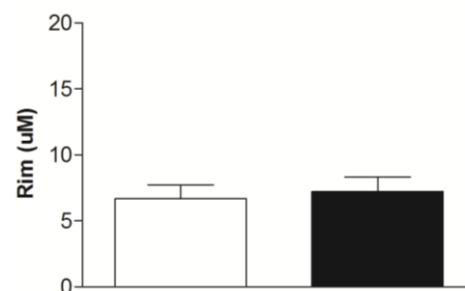


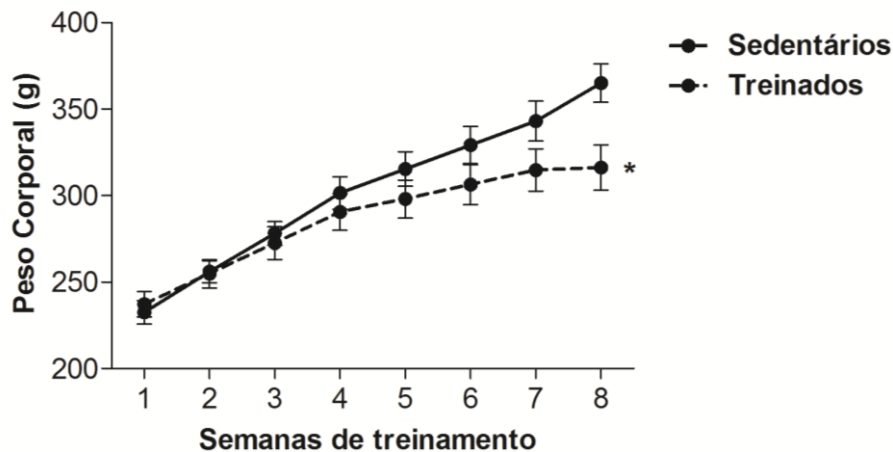
Figura 10: Efeitos do treinamento físico de natação nos níveis de nitrito em diferentes tecidos. Em **(A)**: Níveis de nitrito dentro do PVN (uM) (Sedentários: n=9; Treinados: n=10), em **(B)**: Níveis de nitrito no coração (Sedentários: n=9; Treinados: n=9) e em **(C)**: Níveis de nitrito no rim (Sedentários: n=10; Treinados: n=10). Valores analisados por Student T Teste, não pareado e representados por médias \pm erro padrão. Significância adotada: $* P < 0,05$ vs. Sedentários.

4.2 ESTUDO 2: INIBIÇÃO DA nNOS DO NÚCLEO PARAVENTRICULAR DO HIPOTÁLAMO ALTERA O CONTROLE AUTONÔMICO CARDIOVASCULAR DE RATOS SUBMETIDOS AO TREINAMENTO DE CORRIDA.

A maioria dos resultados do estudo 2 foram semelhantes aos do estudo 1 porém, algumas especificidades foram encontradas para o treinamento de corrida.

Após 8 semanas de treinamento em esteira, ratos T apresentaram menor peso corporal comparado aos S (S: 365 ± 11 vs. T: 316 ± 13 g, * $P < 0,05$, **Figura 11A**) sem alterações no crescimento corporal (distância naso-anal: S: $25 \pm 0,2$ vs. T: $24 \pm 0,2$ cm, $P > 0,05$, **Figura 11B**).

A



B

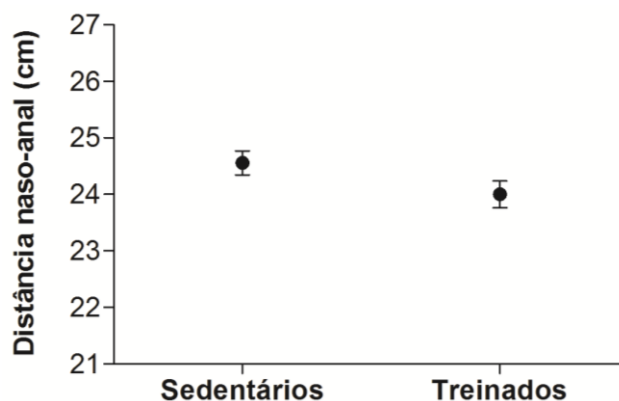


Figura 11: Parâmetros de crescimento corporal em animais sedentários (n=10) ou treinados em esteira elétrica (n=9). Em **(A)**: Variações de peso corporal (g) ao longo de 8 semanas de treinamento físico ou sedentarismo. Valores analisados por Anova Two Way, *post hoc* Bonferroni e representados por média \pm erro padrão. Significância: * $P < 0,05$ vs. Sedentários (semana 8). Em **(B)**: Valores da distância naso-anal (cm) de ratos Wistar após 8 semanas de treinamento de corrida ou sedentarismo. Dados analisados por Student T Teste, não pareado e representados por média \pm erro padrão. Sem significância estatística entre os grupos avaliados.

Dados de composição corporal após protocolo de treinamento em esteira revelaram para ratos T: Menor peso relativo de tecido adiposo (perigonadal: S: $2\pm 0,2$ vs. T: $1\pm 0,2$ %, $*P<0,05$, **Figura 12A** e retroperitoneal: S: $2\pm 0,2$ vs. T: $1\pm 0,2$ %, $*P<0,05$, **Figura 12B**), maior peso relativo de coração (S: $0,32\pm 0,009$ vs. T: $0,35\pm 0,009$ %, $*P<0,05$, **Figura 12C**) e músculos (sóleo: S: $0,10\pm 0,003$ vs. T: $0,12\pm 0,003$ %, $*P<0,05$, **Figura 12E**; gastrocnêmio: S: $0,6\pm 0,01$ vs. T: $0,6\pm 0,03$ %, $*P<0,05$, **Figura 12F**). Entre os grupos avaliados, não houve diferença estatística ($P>0,05$) para peso relativo de rins (**Figura 12D**) e glândulas adrenais (**Figura 12G**).

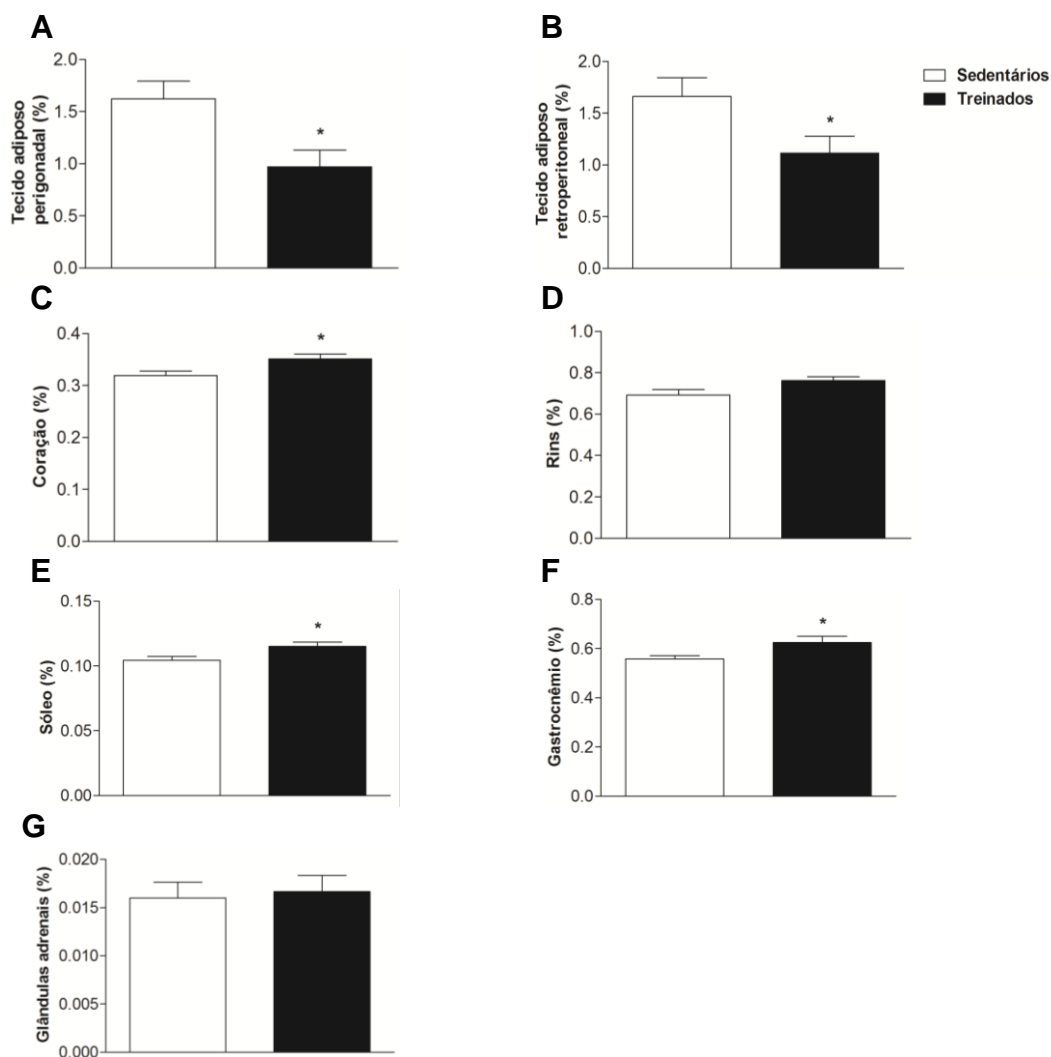
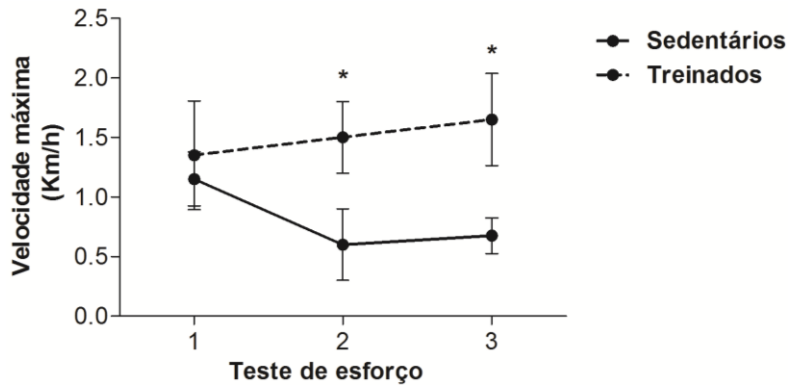


Figura 12: Parâmetros de composição corporal de ratos Wistar após 8 semanas de sedentarismo (barras brancas, $n=10$) ou treinamento em esteira (barras pretas, $n=9$). Em **(A)**: Peso relativo de tecido adiposo perigonadal (%), **(B)**: Peso relativo de tecido adiposo retroperitoneal (%), **(C)**: Peso relativo de coração (%), **(D)**: Peso relativo de rins (%), **(E)**: Peso relativo de músculo sóleo (%), **(F)**: Peso relativo de músculo gastrocnêmio (%), **(G)**: Peso relativo de glândulas adrenais (%). Peso Relativo = (peso absoluto do tecido, órgão ou músculo / peso corporal $\times 100$). Valores analisados por Student T test, não pareado e representados por média \pm erro padrão. Significância adotada: $* P<0,05$ vs. Sedentários.

Ratos T em esteira apresentaram melhor desempenho físico nos testes de esforço comparados aos S (segundo teste de esforço: S: $0,6 \pm 0,2$ vs. T: $1,5 \pm 0,2$ km/h; S: $6,4 \pm 1,2$ vs. T: $13,3 \pm 0,9$ min, $*P < 0,05$; terceiro teste de esforço: S: $0,7 \pm 0,1$ vs. T: $1,6 \pm 0,2$ km/h; S: $6 \pm 0,9$ vs. T: $14,9 \pm 1,7$ min, $*P < 0,05$, **Figura 13A, B**).

A



B

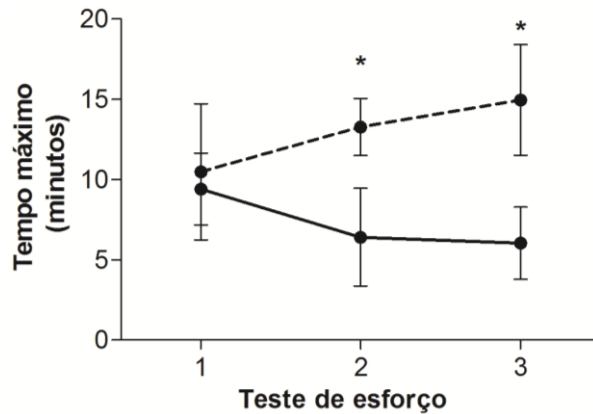


Figura 13: Alterações em parâmetros de rendimento físico em ratos sedentários (linhas contínuas, n=6) ou treinados em esteira (linhas tracejadas, n=6). Em **(A)**: Variações de velocidade máxima (Km/h) e em **(B)**: Tempo máximo (minutos) alcançados durante os testes de esforço em esteira elétrica. Valores analisados por Anova Two Way, *post hoc* Bonferroni e representados por média \pm erro padrão. Significância adotada: $* P < 0,05$ vs. respectivo grupo controle Sedentários.

Em relação aos parâmetros cardiovasculares, em repouso, não houve diferença na PAM de animais que receberam salina (S: 111 ± 2 vs. T: 112 ± 2 mmHg, $P > 0,05$, **Figura 14A**) ou N-Propyl no PVN (S: 111 ± 2 vs. T: 111 ± 1 mmHg, $P > 0,05$, **Figura 14A**), porém, foi evidenciada bradicardia em ratos T em esteira que receberam salina (FC basal: S: 357 ± 10 vs. T: 320 ± 6 b/min, $*P < 0,05$, **Figura 14B**) ou N-Propyl no PVN (FC basal: S: 352 ± 11 vs. T: 319 ± 6 b/min, $^{\Delta}P < 0,05$, **Figura 14B**). A microinjeção bilateral de salina dentro do PVN não alterou significativamente os valores de PAM (Δ PAM: S: $4 \pm 0,5$ vs. T: $4 \pm 0,6$ mmHg, $P > 0,05$, **Figura 14C**) e FC (Δ FC: S: 23 ± 2 vs. T: 21 ± 3 b/min, $P > 0,05$, **Figura 14D**), entretanto, a microinjeção de N-Propyl causou maior resposta pressórica (Δ PAM: S: 24 ± 1 vs. T: 32 ± 3 mmHg, $^{\Delta}P < 0,05$, **Figura 14C**) e taquicárdica (Δ FC: S: 132 ± 4 vs. T: 151 ± 4 b/min, $^{\Delta}P < 0,05$, **Figura 14D**) em ratos T em esteira comparados com S

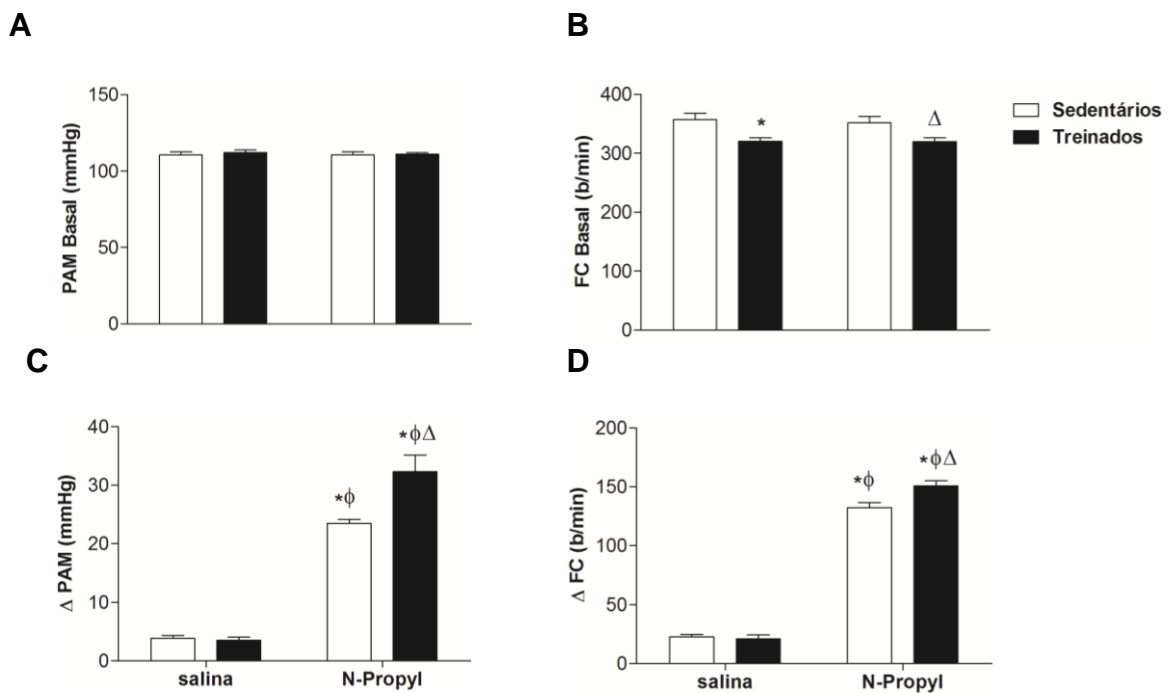


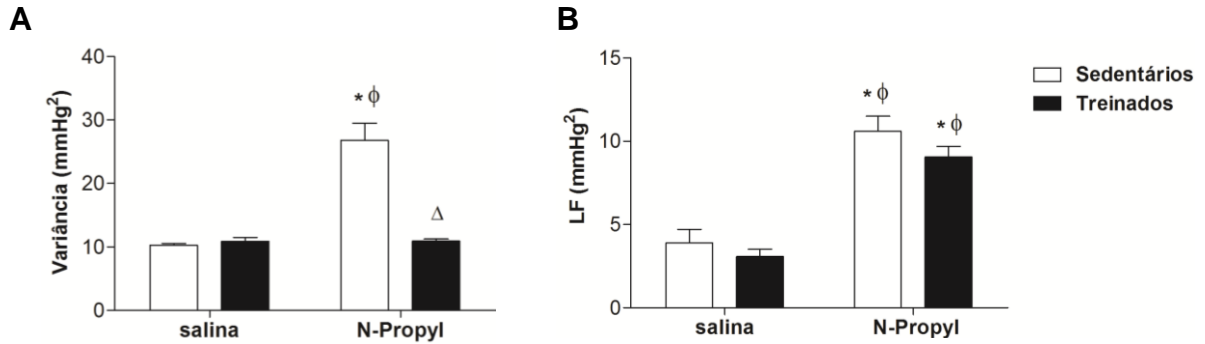
Figura 14: Parâmetros cardiovasculares basais e alterações através da microinjeção bilateral de salina 0,9% ou N-Nw-Propyl-L-arginina (N-Propyl) no PVN de ratos sedentários (barras brancas, n=6) e treinados em esteira (barras pretas, n=6). Em **(A)**: Pressão arterial medial (PAM) basal (mmHg) e em **(B)**: Frequência cardíaca (FC) basal (b/min). Em **(C, D)**: Variações de PAM e FC, respectivamente, durante a microinjeção bilateral de salina 0.9% ou N-Propyl no PVN de ratos sedentários ou treinados. Valores analisados por Anova Two Way, *post hoc* Bonferroni e representados por média \pm erro padrão. Significâncias adotadas: $*$ $P < 0,05$ vs. Sedentários salina; $^{\phi}$ $P < 0,05$ vs. Treinados salina; $^{\Delta}$ $P < 0,05$ vs. Sedentários N-Propyl.

A análise espectral da PAS mostrou que ratos T em esteira que receberam N-Propyl no PVN tiveram menor variância que S N-Propyl (S: 27 ± 3 vs. T: $11\pm 0,3$ mmHg², $\Delta P < 0,05$, **Figura 15A**) sem diferença estatística na modulação do componente simpático (LF: S N-Propyl: 11 ± 1 vs. T N-Propyl: 9 ± 1 mmHg², $P > 0,05$, **Figura 15B**).

A variabilidade da FC no IP em ratos com PVN tratados com salina não revelou diferença estatística para o componente simpático absoluto de ratos T em esteira (LF: S salina: 6 ± 1 vs. T salina: 6 ± 2 ms², $P > 0,05$, **Figura 15C**), porém, houve diminuição do componente simpático normalizado (LFnu: S salina: 41 ± 4 vs. T salina: 20 ± 4 , $*P < 0,05$, **Figura 15D**). Além disso, houve aumento do componente parasimpático absoluto (HF: S salina: 8 ± 1 vs. T salina: 21 ± 4 ms², $*P < 0,05$, **Figura 15E**) e normalizado (HFnu: S: 59 ± 4 vs. T: 76 ± 5 , $*P < 0,05$, **Figura 15F**).

A microinjeção de inibidor da nNOS no PVN de ratos T aumentou o componente simpático absoluto (LF: T N-Propyl: 16 ± 1 ms², $\phi P < 0,05$, **Figura 15C**) comparado ao grupo T salina e ao grupo S N-Propyl (LF: S N-Propyl: 10 ± 1 ms², $\Delta P < 0,05$, **Figura 15C**). Não houve diferença estatística no valor de componente simpático normalizado entre os grupos T N-Propyl (LFnu: T: 27 ± 2 , $P > 0,05$, **Figura 15D**) e T salina (LFnu: T: 20 ± 4 , $P > 0,05$, **Figura 15D**), porém, o grupo T N-Propyl apresentou menor valor quando comparado ao S N-Propyl (LFnu: S: 43 ± 4 , $\Delta P < 0,05$, **Figura 15D**). Foi observado ainda, maior valor absoluto de HF para o grupo T N-Propyl comparado ao S N-Propyl (HF: S: 14 ± 2 vs. T: 36 ± 1 ms², $\Delta P < 0,05$, **Figura 15E**) e apesar disso, a inibição da nNOS no PVN não alterou os valores de HF normalizado entre os grupos S e T avaliados ($P > 0,05$, **Figura 15F**). Contudo, na variabilidade da FC no IP foi observado maior valor de variância para o grupo T salina comparado ao S salina (S: $14\pm 0,4$ vs. T: 30 ± 1 ms², $*P < 0,05$, **Figura 15G**) que foi abolida com a microinjeção de N-Propyl no PVN (S N-Propyl: 24 ± 2 vs. T N-Propyl: 19 ± 1 ms², $\phi P < 0,05$, **Figura 15G**). Então, somente entre os grupos salina foi encontrado diferença estatística para a relação simpato-vagal (LF/HF: S: $0,8\pm 0,2$ vs. T: $0,3\pm 0,1$, $*P < 0,05$, **Figura 15H**).

Pressão Arterial Sistólica



Intervalo de Pulso

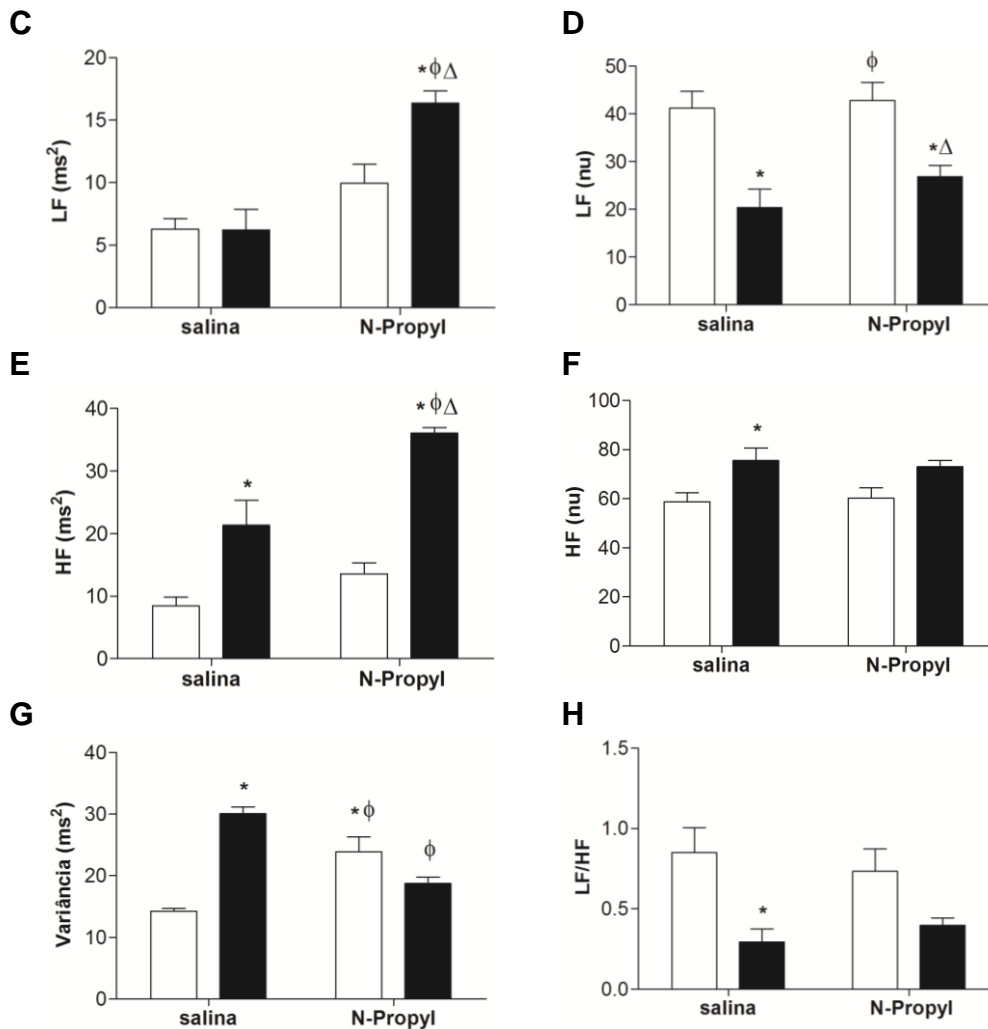


Figura 15: Análise espectral após microinjeção bilateral de salina 0,9% ou N-Propyl no PVN de ratos sedentários (barras brancas, n=6) e treinados em esteira (barras pretas, n=6). Em **(A, B)**: Análise espectral da variabilidade da pressão arterial sistólica e em **(C, D, E, F, G, H)**: Análise de variabilidade da frequência cardíaca no intervalo de pulso. LF: baixa frequência; HF: alta frequência; LF/HF: Razão simpato-vagal. Dados normalizados foram apresentados por (nu). Valores analisados por Anova Two Way, *post hoc* Bonferroni e representados por médias \pm erro padrão. Significâncias adotadas: * $P < 0,05$ vs. Sedentários salina; ϕ $P < 0,05$ vs. Treinados salina e Δ $P < 0,05$ vs. Sedentários N-Propyl.

O grupo T em esteira que recebeu salina no PVN apresentou melhor índice de barorreflexo espontâneo que o S salina (Ganho total: S: $1,7 \pm 0,1$ vs. T: $2,4 \pm 0,2$ ms/mmHg, ganho up: S: $1,6 \pm 0,2$ vs. T: $2,3 \pm 0,2$ ms/mmHg e ganho down: S: $1,8 \pm 0,2$ vs. T: $2,6 \pm 0,3$ ms/mmHg, $*P < 0,05$, **Figura 16A, B, C**). Após a inibição da nNOS no PVN, o índice de barorreflexo espontâneo de ratos T N-Propyl foi diminuído (Ganho total: T: $1,6 \pm 0,1$ ms/mmHg; ganho up: T: $1,6 \pm 0,1$ ms/mmHg e ganho down: T: $1,4 \pm 0,2$ ms/mmHg, $^{\phi}P < 0,05$, **Figura 16A, B, C**) abolindo assim as diferenças estatísticas prévias entre os grupos S e T.

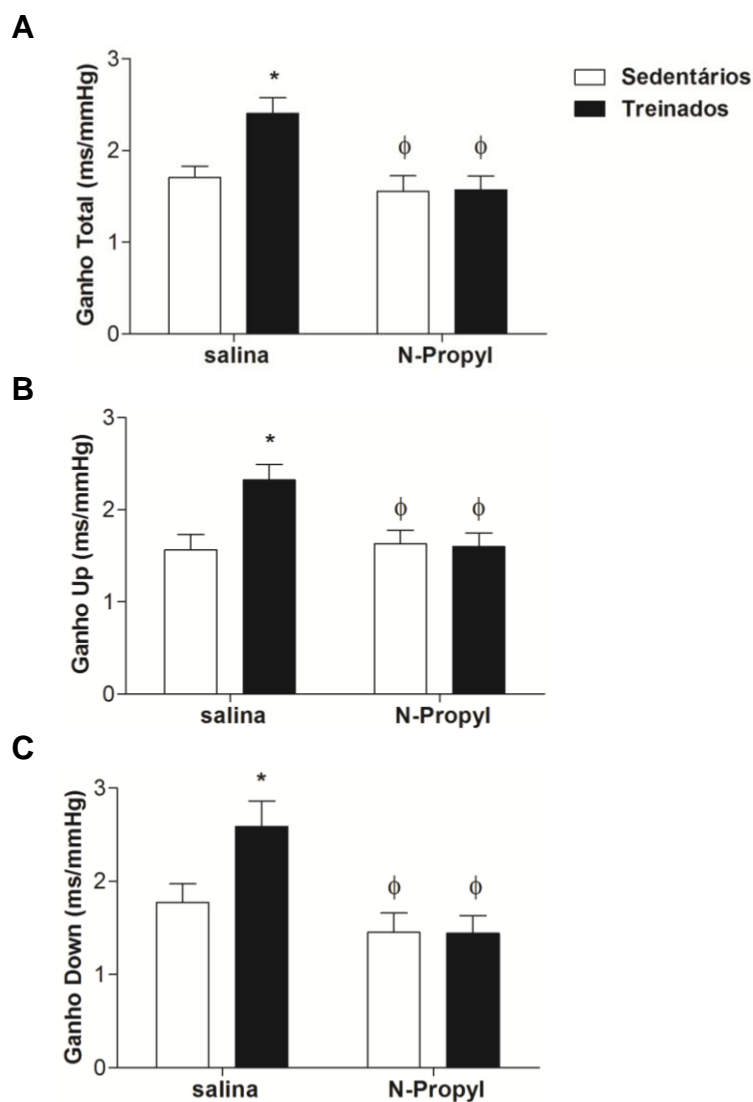


Figura 16: Sensibilidade do barorreflexo espontâneo após microinjeção bilateral de salina 0,9% ou N-Propyl no PVN de ratos sedentários (barras brancas, n=6) e treinados em esteira (barras pretas, n=6). Em **(A)** Ganho Total, **(B)** Ganho Up e **(C)** Ganho Down (ms/mmHg). Valores analisados por Anova Two Way, *post hoc* Bonferroni e representados por média \pm erro padrão. Significâncias adotadas: * $P < 0,05$ vs. Sedentários salina; $^{\phi} P < 0,05$ vs. Treinados salina e $^{\Delta} P < 0,05$ vs. Sedentários N-Propyl.

A **Figura 17A** representa as alterações de PAM e FC durante o teste de barorreflexo e a **Figura 17B** confirma o melhor ganho barorreflexo observado para ratos T em esteira. Houve diferença estatística para os seguintes parâmetros da barocurva: Platô inferior: S= 290 ± 9 vs. T= 262 ± 6 b/min (*P<0,05) e ganho máximo na sensibilidade do barorreflexo: S= $-3 \pm 0,3$ vs. T= $-4,1 \pm 0,4$ b/min/mmHg (*P<0,05) (**ver Tabela 2**).

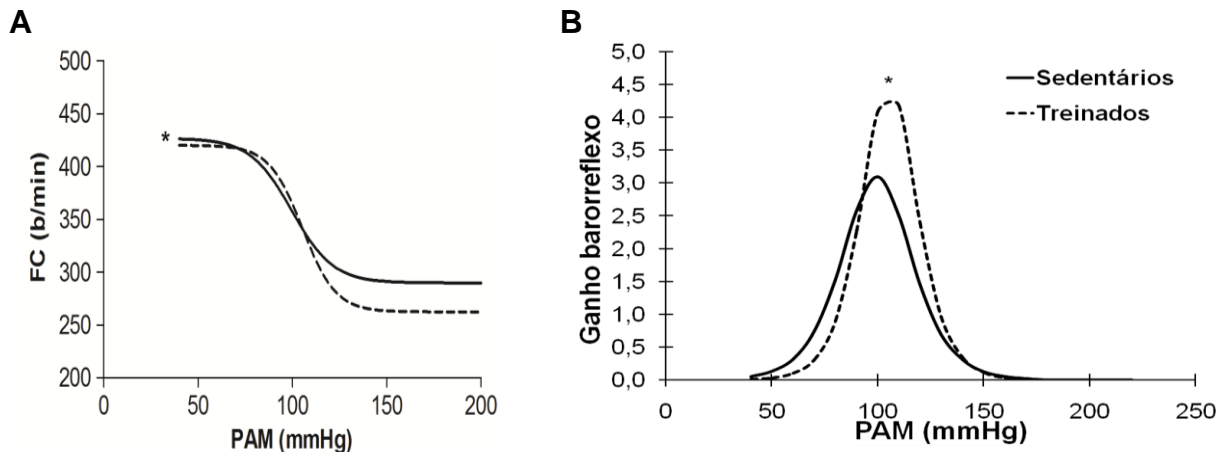


Figura 17: Controle barorreflexo de ratos Wistar submetidos a 8 semanas de sedentarismo ou treinamento físico de corrida. Em **(A)**: Curvas sigmóides representando a relação entre pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) durante o disparo dos barorreceptores de ratos sedentários (S, n=6) e treinados em esteira (T, n=5). Em **(B)**: Alterações do ganho barorreflexo em diferentes níveis de PAM. Valores analisados por Student T Teste, não pareado. Significâncias adotadas: * P<0,05 vs. Sedentários. Os parâmetros utilizados para a construção das barocurvas assim como as análises estatísticas foram apresentadas na tabela 2.

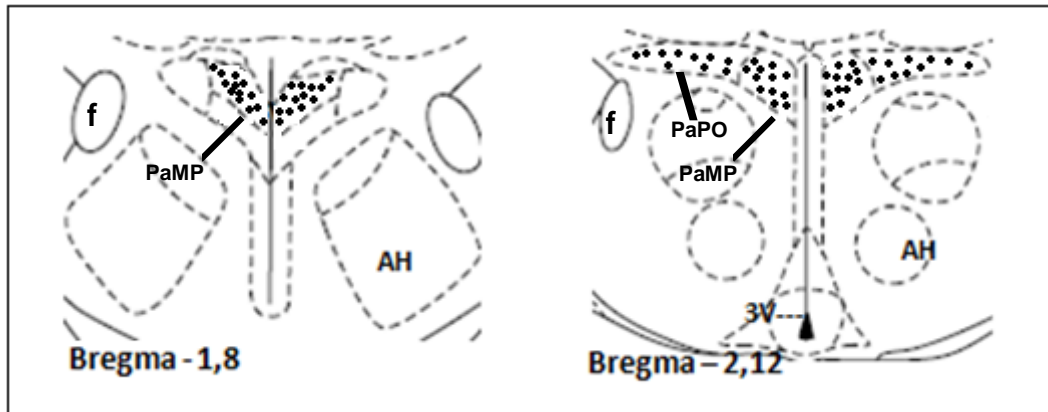
Tabela 2. Controle barorreflexo da frequência cardíaca: Parâmetros utilizados para construção das barocurvas durante teste de barorreflexo em ratos sedentários ou submetidos à 8 semanas de treinamento físico de corrida.

Grupos:	Sedentários (n=6)	Treinados (n=5)
Platô inferior (b/min)	290 ± 9	$262 \pm 6^*$
Platô superior (b/min)	427 ± 12	420 ± 15
Range da FC (b/min)	137 ± 14	158 ± 13
BP50 (mmHg)	100 ± 3	105 ± 4
Ganho máximo de sensibilidade (b/min/mmHg)	$-3 \pm 0,3$	$-4,1 \pm 0,4^*$

Valores analisados por Student T test, não pareado e representados em média \pm erro padrão. n é o número de ratos por grupo. Significâncias adotadas: * P<0,05 vs. Sedentários.

Para realização do estudo 2, todos os sítios de microinjeção foram analisados e foi considerado apenas animais com microinjeção bilateral no PVN (**Figura 18**).

A



B

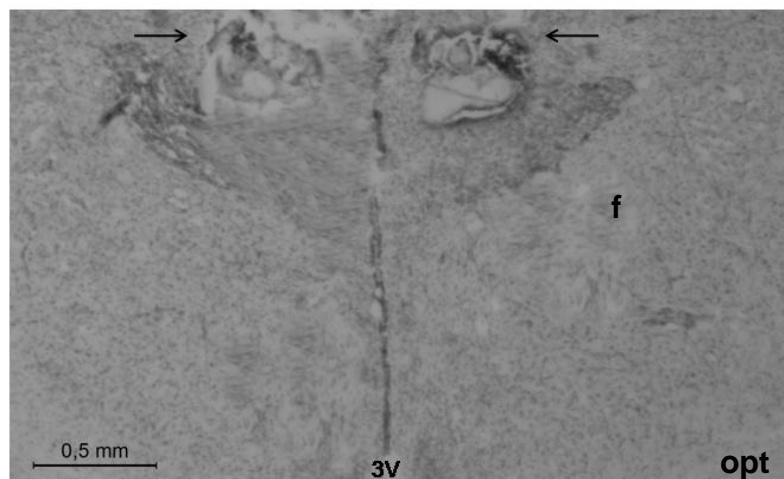


Figura 18: Localização dos sítios de microinjeção bilateral no PVN dos animais do estudo 2. Em **(A)**: Diagrama esquemático com as marcações das microinjeções bilaterais de salina 0,9% ou N-Propyl no PVN de ratos sedentários ou treinados em esteira (n total=35 ratos). Em **(B)**: Fotomicrografia com setas ilustrativas (→) representando o local das microinjeções bilaterais no PVN de um rato individualmente. A escala (-) utilizada representa 0,5mm. (**3V**): terceiro ventrículo, (**f**): fornix, (**AH**): área hipotalâmica anterior, (**PaMP**): núcleo paraventricular do hipotálamo-parte parvocelular medial), (**PaPo**): núcleo paraventricular do hipotálamo-parte parvocelular posterior), (**opt**): trato óptico.

Somado aos dados funcionais, os parâmetros moleculares realizados no estudo 2 foram fundamentais para a compreensão dos achados. Em ratos T por esteira, foi encontrado maior número de neurônios imunoreativos para nNOS no PVN medial (S: 33 ± 2 vs. T: 42 ± 2 , **Figura 19A**, $*P < 0,05$) e PVN posterior (S: 26 ± 3 vs. T: 38 ± 4 , **Figura 19D**, $*P < 0,05$). Além disso, ratos T em esteira apresentaram maior expressão gênica de nNOS dentro do PVN (Fold Increase: S: $1,9 \pm 0,3$ vs. T: $3,8 \pm 0,9$, **Figura 19G**, $*P < 0,05$)

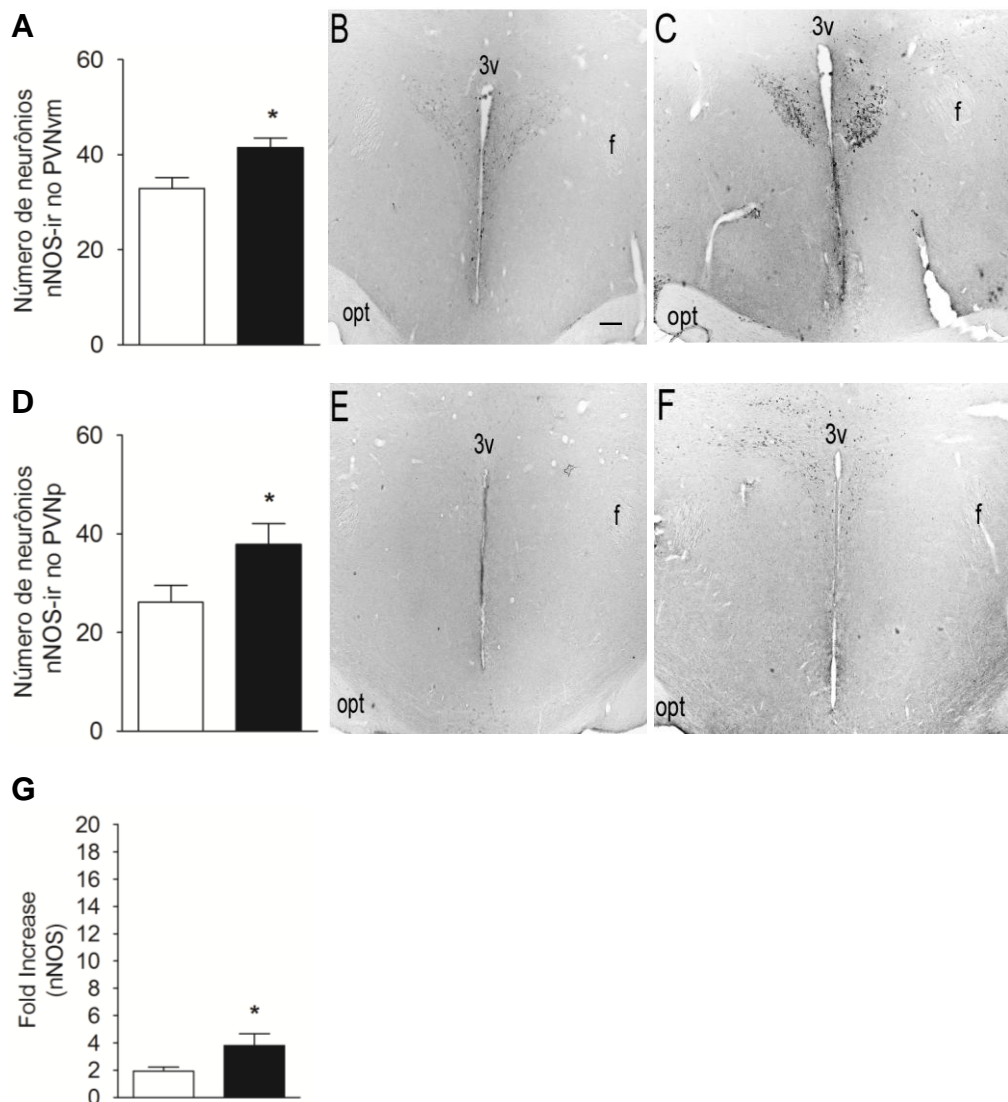


Figura 19: Análises de imunohistoquímica para nNOS e expressão gênica de nNOS no PVN de ratos sedentários (barras brancas) e treinados por esteira (barras pretas). Em **(A)**: Número de neurônios imunoreativos para nNOS dentro do PVN ventromedial e em **(D)** dentro do PVN posterior de ratos sedentários (n=6) e treinados (n=6). Em **(B, E)**: Fotomicrografias representativas de sedentários e **(C, F)** de treinados. A escala (—) em **(B)** representa 400 μ m em **C, E, F**. **(3v)**: terceiro ventrículo, **(opt)**: trato óptico, **(f)**: fornix. Em **(G)**: Comparação da expressão gênica de nNOS dentro do PVN de ratos sedentários (n=9) e treinados (n=6). Valores analisados por Student T Teste, não pareado e representado por médias \pm erro padrão. Significâncias adotadas: $* P < 0,05$ vs. Sedentários.

Ratos T em esteira apresentaram ainda, maiores níveis de nitrito no PVN (S: $7 \pm 1,5$ vs. T: $13 \pm 1,5$ μM , **Figura 20A**, $*P < 0,05$), sem modificar os níveis de nitrito cardíaco (**Figura 20B**, $P > 0,05$) e no rim (**Figura 20B**, $P > 0,05$).

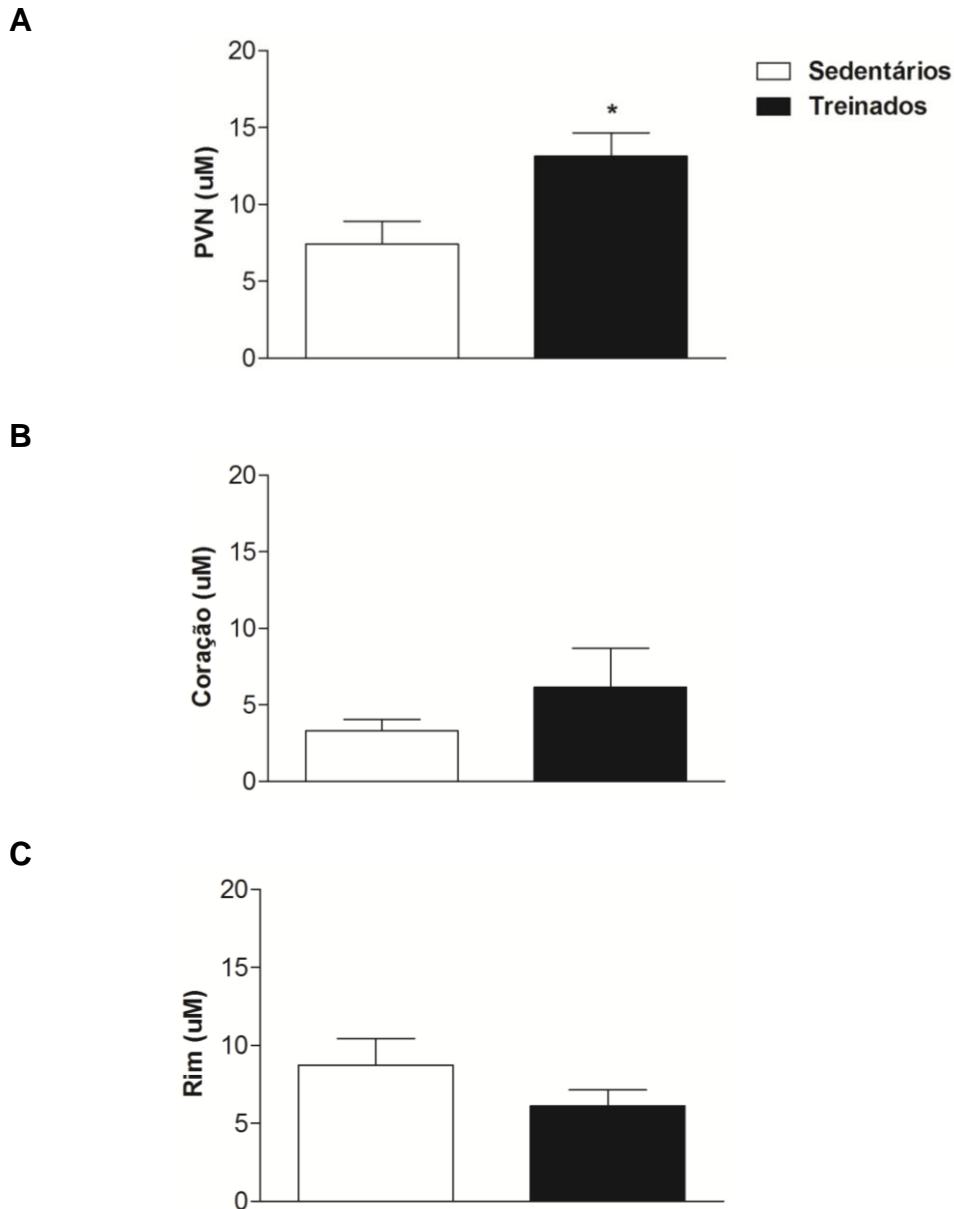


Figura 20: Efeitos do treinamento físico de esteira nos níveis de nitrito em diferentes tecidos. Em **(A)**: Níveis de nitrito dentro do PVN (μM) (Sedentários: $n=8$; Treinados: $n=8$), em **(B)**: Níveis de nitrito no coração (Sedentários: $n=10$; Treinados: $n=9$) e em **(C)**: Níveis de nitrito no rim (Sedentários: $n=10$; Treinados: $n=9$). Valores analisados por Student T Teste, não pareado e representados por médias \pm erro padrão. Significância adotada: $* P < 0,05$ vs. Sedentários.

Os dados obtidos no estudo 2 permitiram uma análise qualitativa e comparativa aos achados do estudo 1. Nas variáveis de composição corporal, foi possível observar alterações similares para os dois protocolos de exercício físico, porém, o treinamento em esteira provocou aumento do peso relativo de músculos sóleo e gastrocnêmio, enquanto no estudo 1, a natação não alterou esses parâmetros (**Tabela 3**).

Tabela 3. Comparações qualitativas das alterações de composição corporal de animais sedentários e treinados após dois protocolos distintos de exercício físico: natação ou esteira.

	Natação	Esteira
Peso corporal (g)	↓	↓
Distância naso-anal (cm)	=	=
Tecido adiposo perigonadal (%)	↓	↓
Tecido adiposo retroperitoneal (%)	↓	↓
Peso coração (%)	↑	↑
Peso rins (%)	=	=
Peso sóleo (%)	=	↑
Peso gastrocnêmio (%)	=	↑
Peso glândulas adrenais (%)	=	=

Foi evidenciado que tanto o treinamento de natação (estudo 1) como em esteira (estudo 2) contribuíram para o efeito de bradicardia em repouso, sem alteração dos valores de PAM. Além disso, a microinjeção bilateral de inibidor da nNOS dentro do PVN causou resposta pressórica e taquicárdica em animais submetidos a ambos os treinamentos físicos (**Tabela 4**).

Tabela 4. Comparações qualitativas de parâmetros cardiovasculares basais e efeitos da microinjeção bilateral de salina 0,9% ou inibidor da nNOS no PVN de ratos sedentários ou treinados por dois protocolos distintos: natação ou esteira.

	Natação	Esteira
PAM basal (mmHg)	=	=
FC basal (b/min)	↓	↓
PAM após microinjeção de salina no PVN (mmHg)	=	=
FC após microinjeção de salina no PVN (b/min)	=	=
PAM após microinjeção de N-Propyl no PVN (mmHg)	↑	↑
FC após microinjeção de N-Propyl no PVN (b/min)	↑	↑

Quanto às análises espectrais, houve similaridade na maioria dos parâmetros investigados entre animais do estudo 1 e 2, porém, na análise da variabilidade da FC no IP, o treinamento de corrida não alterou o componente simpático absoluto (LF, ms^2), já a natação provocou diminuição dessa variável (**Tabela 5**). Por outro lado, a inibição da nNOS no PVN de ratos T em esteira aboliu todas as respostas benéficas de sensibilidade do barorreflexo espontâneo observadas previamente pela prática do exercício enquanto, em ratos T por natação, a microinjeção de N-Propyl no PVN aboliu apenas a resposta do ganho down e atenuou as respostas de ganho total e ganho up (**Tabela 5**).

Tabela 5. Comparações qualitativas de parâmetros autonômicos das análises espectrais após microinjeção de salina 0,9% ou N-Propyl no PVN de ratos sedentários ou treinados por dois protocolos distintos de treinamento físico: natação ou esteira.

	Microinjeção de salina no PVN		Microinjeção de N-Propyl no PVN	
	Natação	Esteira	Natação	Esteira
PAS				
Variância (mmHg^2)	=	=	↓	↓
LF (mmHg^2)	=	=	=	=
IP				
Variância (ms^2)	↑	↑	=	=
LF (ms^2)	↓	=	↑	↑
LFnu	↓	↓	↓	↓
HF (ms^2)	↑	↑	↑	↑
HFnu	↑	↑	=	=
Razão LF/HF	↓	↓	=	=
SBR				
Ganho total	↑	↑	↑	=
Ganho up	↑	↑	↑	=
Ganho down	↑	↑	=	=

PAS: pressão arterial sistólica; LF: baixa frequência; IP: intervalo de pulso; HF: alta frequência; SBR: sensibilidade do barorreflexo espontâneo.

As análises moleculares identificaram o mesmo perfil nitrérgico no PVN de ratos T do estudo 1 e 2, ou seja, ambos os treinamentos (natação e esteira) proporcionaram maior expressão gênica e proteica de nNOS no PVN (**Tabela 6**) assim como aumento dos níveis de nitrito no PVN (**Tabela 7**).

Tabela 6. Comparações qualitativas de imunohistoquímica e expressão gênica para nNOS no PVN de ratos treinados por dois protocolos distintos: natação ou esteira.

	Natação	Esteira
Imunohistoquímica		
Neurônios nNOS dentro do PVN _{vm}	↑	↑
Neurônios nNOS dentro do PVN _p	↑	↑
Expressão gênica		
nNOS dentro do PVN	↑	↑

Tabela 7. Comparações qualitativas dos níveis de nitrito em diferentes tecidos de ratos treinados por dois protocolos distintos: natação ou esteira.

	Natação	Esteira
PVN (uM)	↑	↑
Corção (uM)	=	=
Rim (uM)	=	=

4.3 ESTUDO 3: EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO ORAL DE L-ARGININA NA MODULAÇÃO CARDIOVASCULAR PELO NÚCLEO PARAVENTRICULAR DO HIPOTÁLAMO.

Os resultados do estudo 3 apontam que a suplementação oral de L-arginina proporciona efeitos benéficos ao organismo, em especial, ao sistema cardiovascular.

Após a realização do protocolo de suplementação oral com L-arginina, não foi observado entre os grupos avaliados diferença no peso corporal (C: 309 ± 8 vs. LA: 329 ± 7 g, $P > 0,05$, **Figura 21A**) e distância naso-anal (C: $23 \pm 0,1$ vs. LA: $23 \pm 0,3$ cm, $P > 0,05$, **Figura 21B**).

A

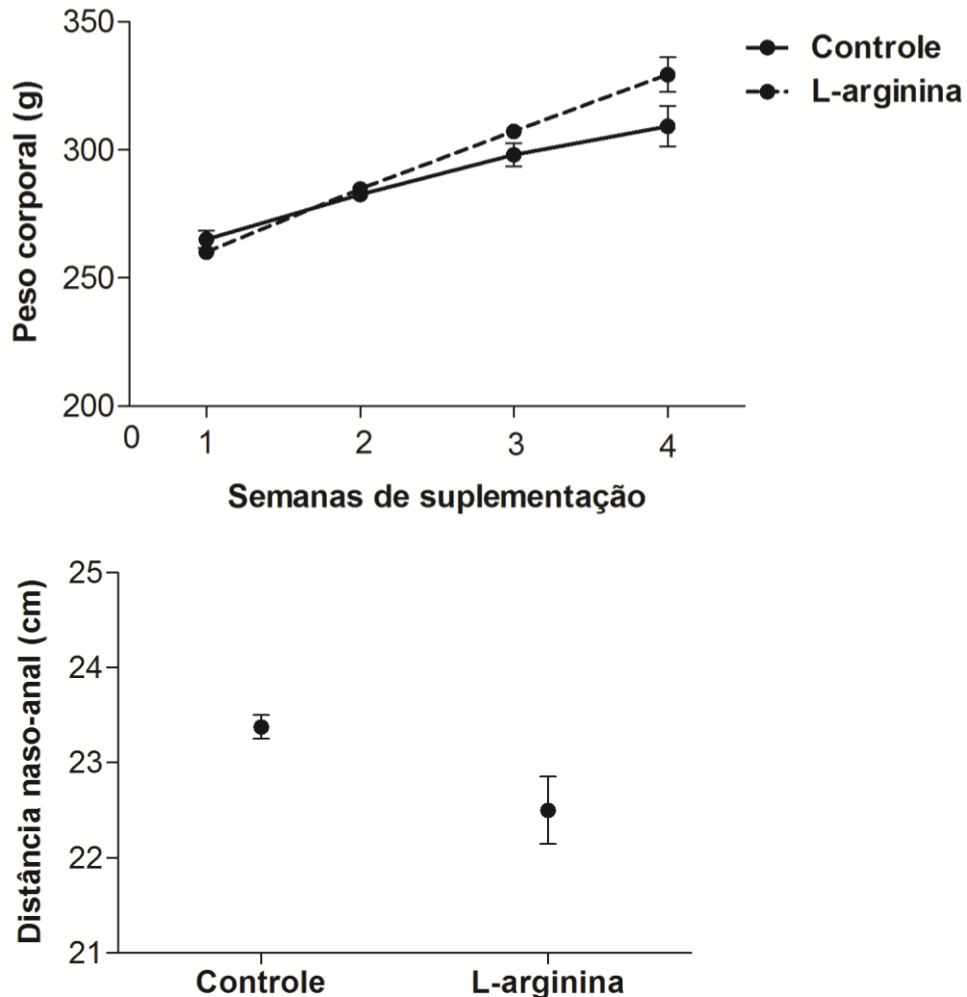


Figura 21: Efeitos da suplementação oral de L-arginina em parâmetros de crescimento corporal de ratos Wistar controle (n=10) e tratados com L-arginina (n=10). Em **(A)**: Variações de peso corporal (g) ao longo de 4 semanas de tratamento com L-arginina ou água. Valores analisados por Anova Two Way, *post hoc* Bonferroni e representados por média \pm erro padrão. Sem significância estatística entre os grupos avaliados. Em **(B)**: Valores da distância naso-anal (cm) de ratos após 4 semanas de suplementação com L-arginina ou água. Dados analisados por Student T Teste, não pareado e representados por média \pm erro padrão. Sem significância estatística entre os grupos avaliados.

Em ratos LA foi observado menor peso relativo de tecido adiposo (perigonadal: C: $1\pm 0,2$ vs. LA: $0,9\pm 0,04$ %, * $P < 0,05$; **Figura 22A** e retroperitoneal: C: $1\pm 0,1$ vs. LA: $0,8\pm 0,1$ %, * $P < 0,05$, **Figura 22B**) e maior peso relativo de rins (C: $0,6\pm 0,06$ vs. LA: $0,8\pm 0,04$ %, * $P < 0,05$, **Figura 22D**) e músculo gastrocnêmio (C: $0,5\pm 0,2$ vs. LA: $0,6\pm 0,02$ %, * $P < 0,05$, **Figura 22F**). Os pesos relativos de coração (**Figura 22C**), músculo sóleo (**Figura 22E**) e adrenais (**Figura 22G**) permaneceram inalterados entre os grupos ($P > 0,05$).

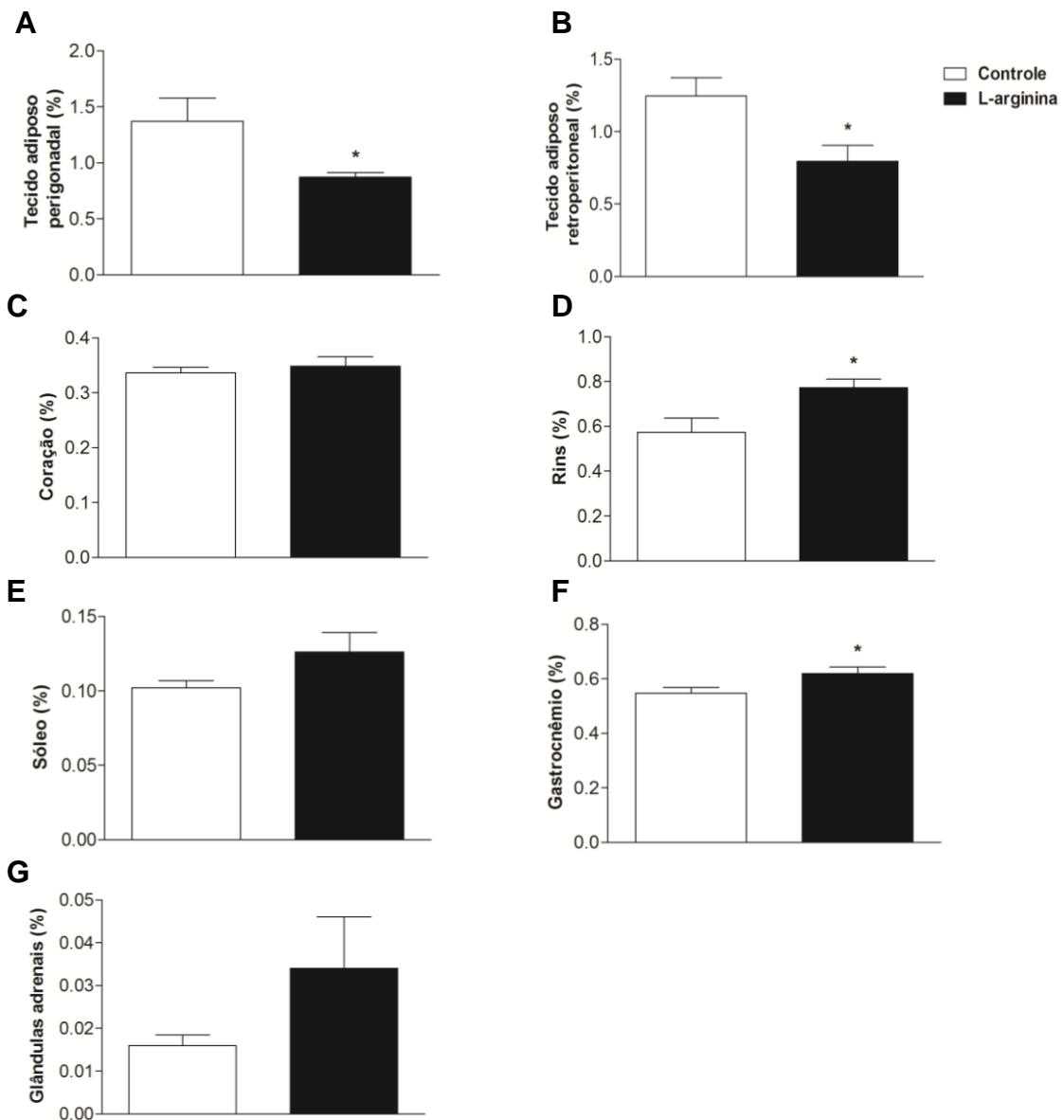


Figura 22: Parâmetros de composição corporal de ratos Wistar após 4 semanas de tratamento (via oral) com água (barras brancas, n=10) ou L-arginina (barras pretas, n=10). Em **(A)**: Peso relativo de tecido adiposo perigonadal (%), **(B)**: Peso relativo de tecido adiposo retroperitoneal (%), **(C)**: Peso relativo de coração (%), **(D)**: Peso relativo de rins (%), **(E)**: Peso relativo de músculo sóleo (%), **(F)**: Peso relativo de músculo gastrocnêmio (%), **(G)**: Peso relativo de glândulas adrenais (%). Peso Relativo = (peso absoluto do tecido, órgão ou músculo / peso corporal x 100). Valores analisados por Student T test, não pareado e representados por média \pm erro padrão. Significância adotada: * $P < 0,05$ vs. Controle.

Ao final de 4 semanas de suplementação com L-arginina, não houve alteração nos valores basais de PAM (C: 108 ± 2 vs. LA: $112 \pm 0,9$ mmHg, $p > 0,05$, **Figura 23A**) entretanto, animais LA apresentaram bradicardia em repouso (C: 360 ± 6 vs. LA: 335 ± 6 b/min, %, $*P < 0,05$, **Figura 23B**). A microinjeção bilateral de salina dentro do PVN não alterou significativamente os valores de PAM (Δ PAM: C: 7 ± 2 vs. LA: 8 ± 2 mmHg, $P > 0,05$, **Figura 23C**) e FC (Δ FC: C: 21 ± 3 vs. LA: 23 ± 4 b/min, $P > 0,05$, **Figura 23D**), entretanto, a microinjeção de N-Propyl causou maior resposta pressórica (Δ PAM: C: 17 ± 2 vs. LA: 26 ± 3 mmHg, $^{\Delta}P < 0,05$, **Figura 23C**) e taquicárdica (Δ FC: C: 87 ± 6 vs. LA: 129 ± 13 b/min, $^{\Delta}P < 0,05$, **Figura 23D**) em ratos LA comparados com C.

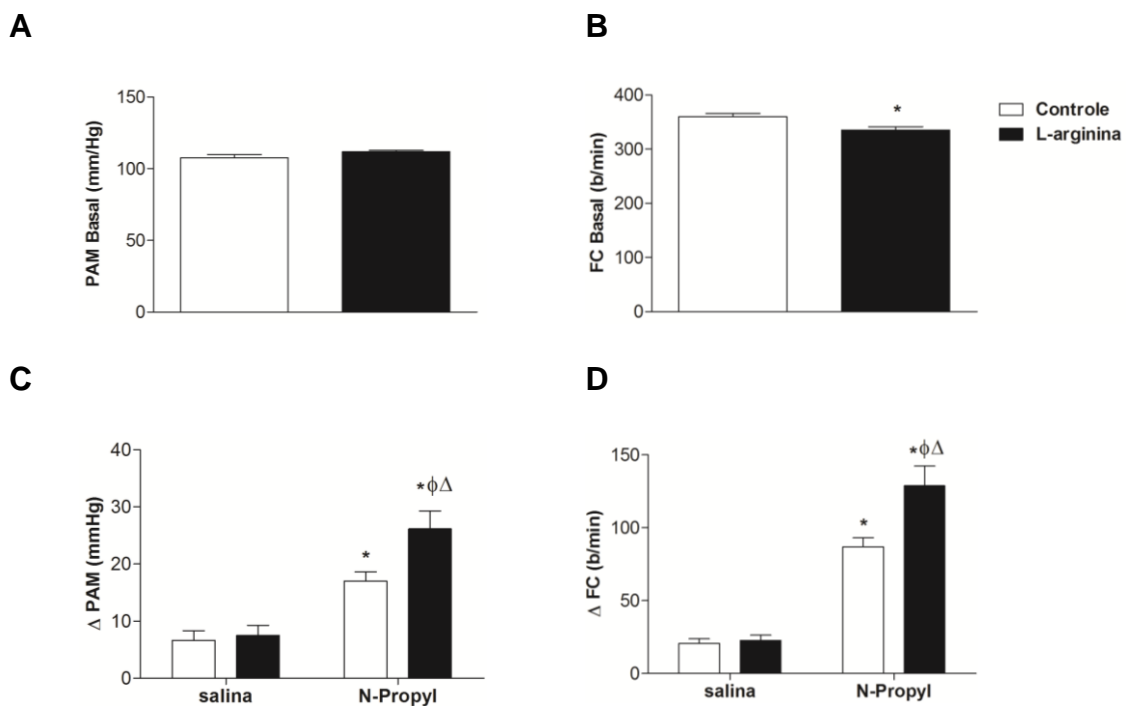


Figura 23: Parâmetros cardiovasculares basais e alterações através da microinjeção bilateral de salina 0,9% ou N-Nw-Propyl-L-arginina (N-Propyl) no PVN de ratos controle (barras brancas, tratados com água, n=6) ou suplementados com L-arginina (barras pretas, n=6). Em **(A)**: Valores basais de pressão arterial média (PAM, mmHg) e em **(B)**: Frequência cardíaca (FC, b/min) de ratos controle ou tratados com L-arginina. Valores analisados por Student T teste, não pareado e representados por médias \pm erro padrão. Significância adotada: * $p < 0,05$ vs. Controle. Em **(C, D)**: Variações de PAM e FC respectivamente, durante a microinjeção bilateral de salina 0,9% ou N-Propyl no PVN de ratos controle ou suplementados com L-arginina. Dados analisados por Anova Two Way, *post hoc* Bonferroni e representados por médias \pm erro padrão. Significâncias adotadas: * $P < 0,05$ vs. Controle salina; $^{\phi} P < 0,05$ vs. L-arginina salina; $^{\Delta} P < 0,05$ vs. Controle N-Propyl.

A análise da variabilidade da PAS realizada 10 minutos antes da microinjeção de N-Propyl (período este considerado basal), não demonstrou diferença estatística ($P > 0,05$) para os valores de variância (C: 13 ± 2 vs. LA: 9 ± 3 mmHg²) e LF (C: $5 \pm 0,7$ vs. LA: $2 \pm 0,5$ mmHg²). Porém, a análise espectral da variabilidade da FC em ratos LA revelou : maior variância (C: 16 ± 1 vs. LA: 21 ± 2 ms²), menor valor do componente simpático normalizado (LFnu: C: 42 ± 5 vs. LA: 24 ± 4), maior componente parasimpático normalizado (HFnu: C: 58 ± 5 vs. LA: 76 ± 4) e menor razão simpato-vagal: (LF/HF: C: $0,9 \pm 0,2$ vs. LA: $0,3 \pm 0,1$) ($*P < 0,05$). Além disso, em ratos LA, antes da microinjeção de N-Propyl no PVN, foi observado ainda, a melhora de todos os parâmetros de sensibilidade do barorreflexo espontâneo (ganho total: C: $1,4 \pm 0,1$ vs. LA: $2,3 \pm 0,2$, ganho up: C: $1,6 \pm 0,2$ vs. LA: $2,6 \pm 0,3$ e ganho down: C: $1,3 \pm 0,1$ vs. LA: $2 \pm 0,2$ ms/mmHg, $* P < 0,05$) (**Tabela 8**).

A análise de variabilidade da PAS após N-Propyl demonstrou aumento da variância, porém, menores valores ainda foram observados no grupo LA (C: $22 \pm 1,5$ vs. LA: $11 \pm 0,6$ mmHg², $^{\dagger}P < 0,05$, **Tabela 8**). A análise de variabilidade da FC evidenciou que a inibição da nNOS no PVN causou aumento da variância em ratos C (C: $22 \pm 0,5$ vs. LA: $18 \pm 0,5$ ms²), abolindo assim a diferença observada previamente entre os grupos ($*P < 0,05$, **Tabela 8**). Além disso, a microinjeção de N-Propyl no PVN de ratos LA provocou o aumento do componente simpático absoluto ($^{\#}P < 0,05$, **Tabela 8**) porém, menores valores de LFnu ainda foram observados para ratos LA (LFnu: C: 49 ± 4 vs. LA: $33 \pm 0,5$, $^{\dagger}P < 0,05$, **Tabela 8**). Curiosamente, após a inibição da nNOS no PVN, ratos LA apresentaram maior HF absoluto (C: $9 \pm 2,5$ vs. LA: 21 ± 3 ms², $^{\dagger}P < 0,05$, **Tabela 8**) e, embora, o componente HFnu de ratos LA tenha diminuído após o N-Propyl no PVN, o valor encontrado no grupo LA ainda foi maior que em animais C (C: 51 ± 4 vs. LA: $67 \pm 0,5$, $^{\dagger}P < 0,05$, **Tabela 8**). Contudo, a microinjeção de N-Propyl no PVN, aboliu as diferenças de LF/HF e sensibilidade do barorreflexo espontâneo, observada previamente entre animas C e LA.

Tabela 8. Análise espectral em ratos Wistar controle (tratados com água) ou tratados com L-arginina: Valores de variabilidade da pressão sistólica, variabilidade da frequência cardíaca e sensibilidade do barorreflexo espontâneo antes da microinjeção de N-Propyl no PVN (valores considerados basais) e após microinjeção de N-Propyl no PVN.

	Antes do N-Propyl no PVN		Após N-Propyl no PVN	
	Controle (n=6)	L-arginina (n=6)	Controle (n=6)	L-arginina (n=6)
PAS				
Variância (mmHg ²)	13±2	9±3	22±1,5*	11±0,6 [†]
LF (mmHg ²)	5±0,7	2±0,5	6±1	4±0,3
IP				
Variância (ms ²)	16±1	21±2*	22±0,5*	18±0,5
LF (ms ²)	5±1	3±0,6	8±1,5	9±3 [#]
LFnu	42±5	24±4*	49±4	33±0,5 [†]
HF (ms ²)	6±0,8	11±4	9±2,5	21±3 [†]
HFnu	58±5	76±4*	51±4	67±0,5 [†]
Razão LF/HF	0,9±0,2	0,3±0,1*	0,8±0,1	0,6±0,1
SBR				
Ganho total	1,4±0,1	2,3±0,2*	1,1±0,1	1,3±0,3 [#]
Ganho up	1,6±0,2	2,6±0,3*	1,3±0,1	1,3±0,3 [#]
Ganho down	1,3±0,1	2±0,2*	1,2±0,1	1,5±0,2

PAS: pressão arterial sistólica; LF: baixa frequência; IP: intervalo de pulso; HF: alta frequência; SBR: sensibilidade do barorreflexo espontâneo; Unidade métrica dos ganhos da SBR: ms/mmHg. Valores analisados por Anova Two Way, *post hoc* Bonferroni e representados em médias ± erro padrão. n é o número de ratos em cada grupo. Significâncias adotadas: * p<0,05 vs. Controle (Antes do N-Propyl no PVN), # p<0,05 vs. L-arginina (Antes do N-Propyl no PVN) e [†] p<0,05 vs. Controle (Após N-Propyl no PVN).

A **Figura 24A** representa a barocurva de ratos C e LA antes da microinjeção de N-Propyl no PVN e a **Figura 24B** demonstra o melhor ganho barorreflexo para animais LA (* $P < 0,05$), evidenciado através de diferenças estatísticas (* $P < 0,05$, **Tabela 9**) para os seguintes parâmetros cardiovasculares: Platô inferior (C: 296 ± 7 vs. LA: 269 ± 4 b/min) e superior (C: 397 ± 6 vs. LA: 444 ± 64 b/min), range de FC (C: 101 ± 11 vs. LA: 175 ± 8 b/min) e ganho máximo de sensibilidade (C: $-2,7 \pm 0,1$ vs. LA: $-3,6 \pm 0,2$ b/min/mmHg). A microinjeção de N-Propyl no PVN alterou os parâmetros das barocurvas de ratos C e LA (* $P < 0,05$, **Figura 24C**) diminuindo portanto o ganho barorreflexo de ambos os grupos (* $P < 0,05$, **Figura 24D**) através da atenuação do ganho máximo de sensibilidade para ratos LA (# $P < 0,05$, **Tabela 9**), menor valor de platô superior (# $P < 0,05$, **Tabela 9**) e diminuição do range de FC (# $P < 0,05$, **Tabela 9**).

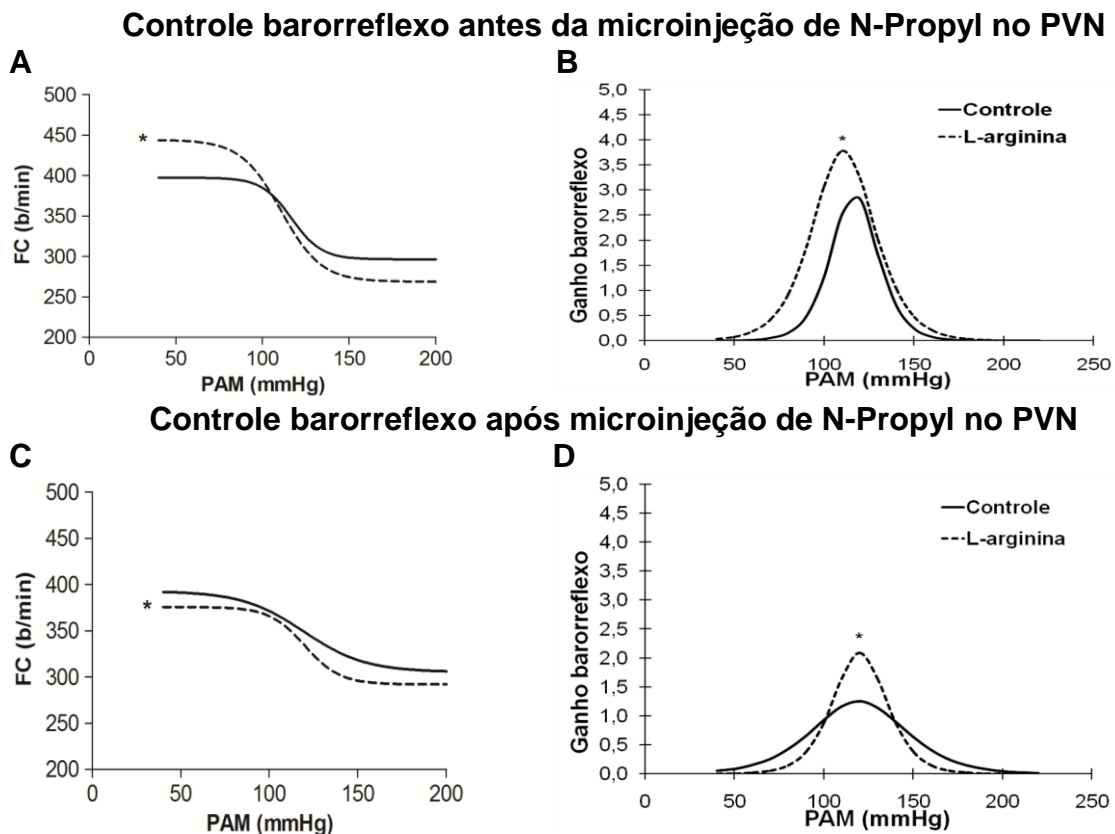


Figura 24: Participação da nNOS no controle barorreflexo pelo PVN após 4 semanas de suplementação oral de L-arginina. Em **(A, C)**: Curvas sigmóides representando a relação entre pressão arterial média (PAM, mmHg) e frequência cardíaca (FC, b/min) durante o disparo dos barorreceptores antes e após a microinjeção bilateral de N-Propyl no PVN de ratos controles ($n=8$) e tratados com L-arginina ($n=6$). Em **(B, D)**: Alterações de ganho barorreflexo em diferentes níveis de PAM. Valores analisados por Anova Two Way, *post hoc* Bonferroni. Significância adotada: * $P < 0,05$) vs. Controle. Os parâmetros utilizados para a construção das barocurvas assim como as análises estatísticas estão descritas na Tabela 9.

Tabela 9. Controle barorreflexo da frequência cardíaca e parâmetros das barocurvas de ratos controle (tratados com água) ou tratados 4 semanas com L-arginina e submetidos à microinjeção bilateral de inibidor de nNOS no PVN.

Grupos:	Antes do N-Propyl no PVN		Após N-Propyl no PVN	
	Controle (n=8)	L-arginina (n=6)	Controle (n=8)	L-arginina (n=6)
Platô inferior (b/min)	296±7	269±4*	305±5	292±8
Platô superior (b/min)	397±6	444±6*	393±4	376±14 [#]
Range da FC (b/min)	101±11	175±8*	88±6	84±11 [#]
BP50 (mmHg)	117±6	111±1	119±6	120±8
Ganho máximo de sensibilidade (b/min/mmHg)	-2,7±0,1	-3,6±0,2*	-1,5±0,1*	-2,1±0,4 [#]

Valores analisados por Anova Two Way, *post hoc* Bonferroni e representados em média ± erro padrão. n é o número de ratos em cada grupo. Significâncias adotadas: * p<0,05 vs. Controle (Antes do N-Propyl no PVN), [#] p<0,05 vs. L-arginina (Antes do N-Propyl no PVN).

A **Figura 25A** representa as alterações de PAM e FC durante o teste barorreflexo realizado antes e após a microinjeção bilateral de L-arginina no PVN de ratos C (*P<0,05, **Tabela 10**). A **Figura 25B** evidencia que a microinjeção de L-arginina no PVN de ratos C melhorou o ganho máximo de sensibilidade (antes da LA no PVN: $-2,97 \pm 0,2$ vs. após LA no PVN: $-4,05 \pm 0,2$ b/min/mmHg, *P<0,05, **Tabela 10**) devido principalmente a diminuição do platô inferior (antes da LA no PVN: 291 ± 11 vs. após LA no PVN: 266 ± 4 b/min, *P<0,05, **Tabela 10**).

Controle barorreflexo antes e após microinjeção de L-arginina no PVN

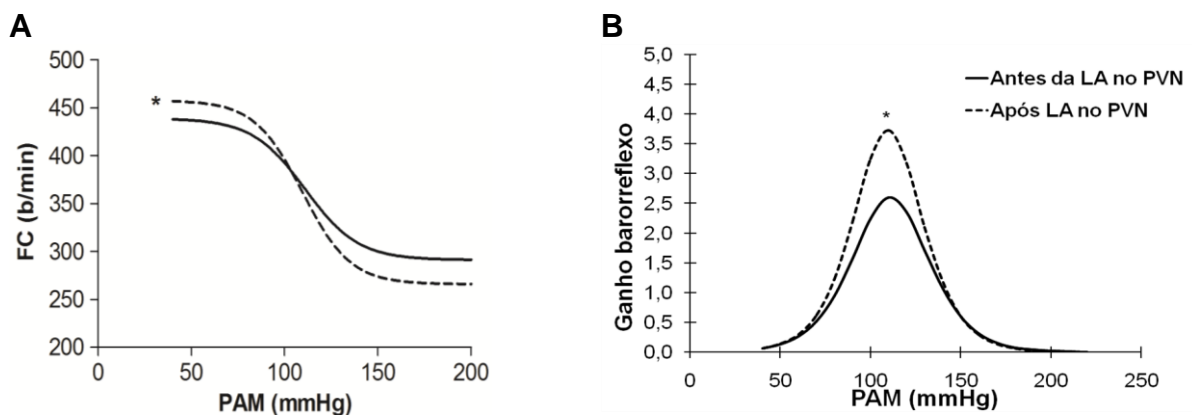


Figura 25: Efeitos da L-arginina (LA) no controle barorreflexo pelo PVN. Em **(A)**: Curvas sigmóides representando a relação entre pressão arterial média (PAM, mmHg) e frequência cardíaca (FC, b/min) durante o disparo dos barorreceptores antes e após a microinjeção de L-arginina no PVN de ratos controles (n=7). Em **(B)**: Alterações de ganho barorreflexo em diferentes níveis de PAM. Valores analisados por Student T Teste, pareado. Significância adotada: * P<0,05 vs. Antes da LA no PVN. Os parâmetros utilizados para a construção das barocurvas assim como as análises estatísticas estão descritas na Tabela 10.

Tabela 10. Controle barorreflexo da frequência cardíaca e parâmetros utilizados para construção das barocurvas de ratos Wistar antes e após à microinjeção bilateral de L-arginina no PVN.

Controle (n=7)	Antes da L-arginina no PVN	Após L-arginina no PVN
Platô inferior (b/min)	291±11	266±4*
Platô superior (b/min)	439±5	458±16
Range da FC (b/min)	148±11	192±12
BP50 (mmHg)	111±2	110±2
Ganho máximo de sensibilidade (b/min/mmHg)	-2,97±0,2	-4,05±0,2*

Valores analisados por Student T test, pareado e representados em média ± erro padrão. n é o número de ratos no grupo. Significâncias adotadas: * p<0,05 vs. Antes da L-arginina no PVN.

Todos os sítios de microinjeção no PVN dos animais do estudo 3 foram confirmadas e apresentadas na **Figura 26**.

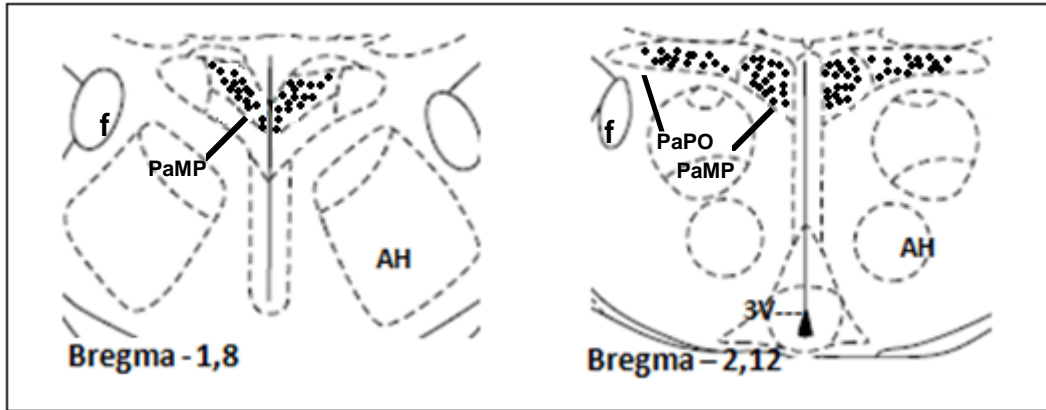


Figura 26: Localização dos sítios de microinjeção bilateral no PVN de animais do estudo 3. Marcações bilaterais dos sítios de microinjeção no PVN de ratos que receberam salina 0,9% ou N-Propyl no PVN e de ratos que foram submetidos ao teste de barorreflexo antes e após microinjeção de N-Propyl ou L-arginina no PVN (n total=45 ratos). (**3V**): terceiro ventrículo, (**f**): fornix, (**AH**): área hipotalâmica anterior, (**PaMP**): núcleo paraventricular do hipotálamo-parte parvocelular medial), (**PaPo**): núcleo paraventricular do hipotálamo-parte parvocelular posterior).

A suplementação oral de L-arginina contribuiu ainda para maiores níveis de nitrito no PVN (C: $5 \pm 0,8$ vs. LA: 10 ± 3 uM, **Figura 27A**, $*P < 0,05$), nos rins (C: $7 \pm 1,4$ vs. LA: 18 ± 3 uM, **Figura 27C**, $*P < 0,05$) e aorta torácica (C: $3,8 \pm 0,6$ vs. LA: 12 ± 3 uM, **Figura 27D**, $*P < 0,05$) sem modificar os níveis de NO do coração ($P > 0,05$, **Figura 27B**) e plasma ($P > 0,05$, **Figura 27E**).

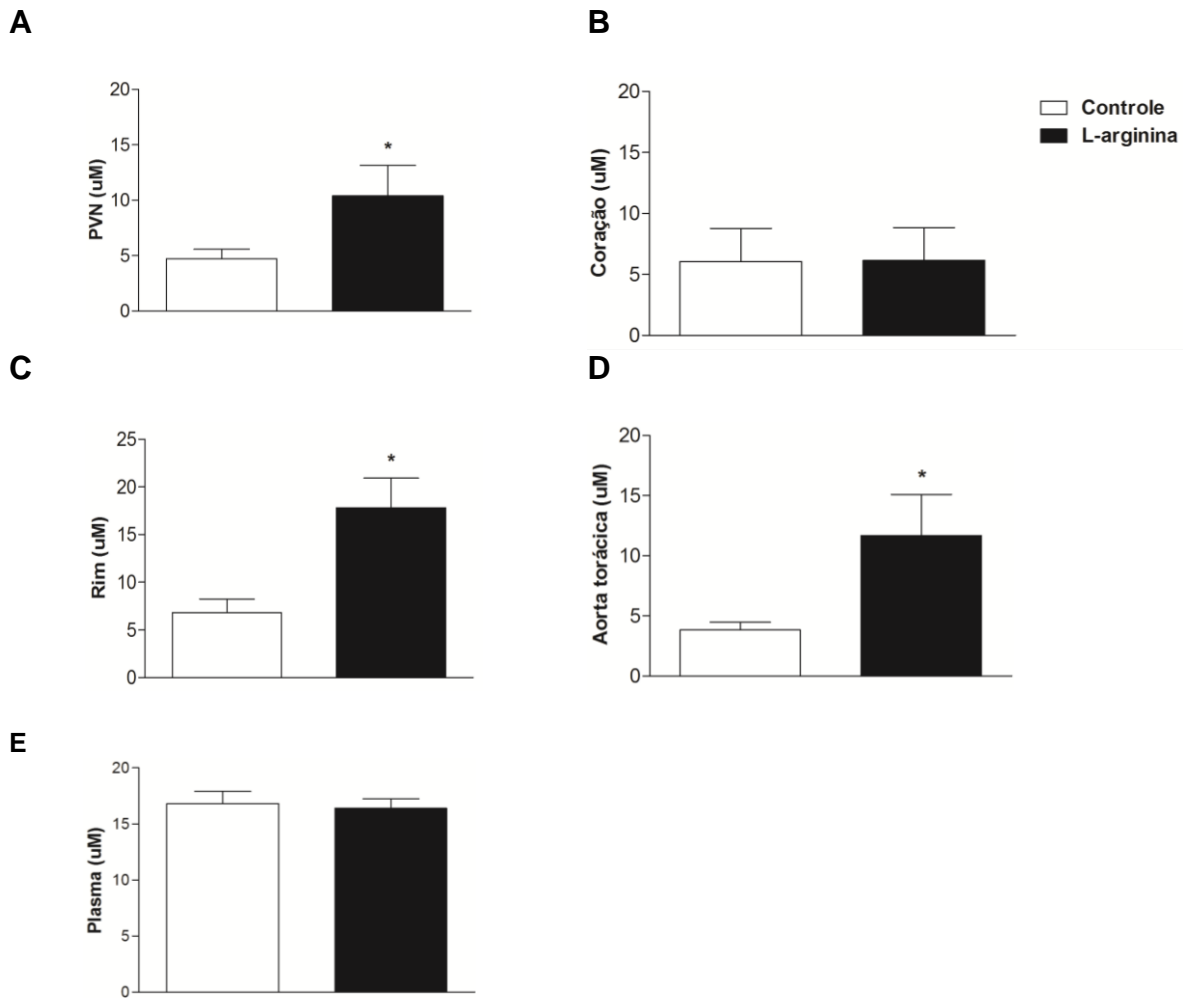


Figura 27: Níveis de nitrito em diferentes tecidos de ratos controle (tratados com água) ou tratados (via oral) durante 4 semanas com L-arginina. Em **(A)**: Concentrações de nitrito no PVN (uM) (Controle: n=9; L-arginina: n=6); em **(B)**: Concentrações de nitrito no coração (uM) (Controle: n=10; L-arginina: n=10); em **(C)**: Concentrações renais de nitrito (uM) (Controle: n=6; L-arginina: n=8); em **(D)**: Concentrações de nitrito em aorta torácica (uM) (Controle: n=7; L-arginina: n=7) e em **(E)**: Concentrações de nitrito no plasma (uM) (Controle: n=6; L-arginina: n=6) Valores analisados por Student T Teste, não pareado e representados por médias \pm erro padrão. Significâncias adotadas: $* P < 0,05$ vs. Controle.

Por último, na **Figura 28** é possível notar que não houve diferença na relação coração/tíbia entre os grupos avaliados (C: $0,3 \pm 0,009$ vs. LA: $0,3 \pm 0,01$ g/cm, $P > 0,05$).

Portanto, as respostas cardiovasculares observadas no estudo 3 foram, em partes, devido a alterações autonômicas e não estruturais do coração. Apesar disso, novos estudos devem ser conduzidos para melhor elucidar os efeitos da suplementação de L-arginina sob aspectos morfofuncionais do sistema cardiovascular de ratos normotensos.

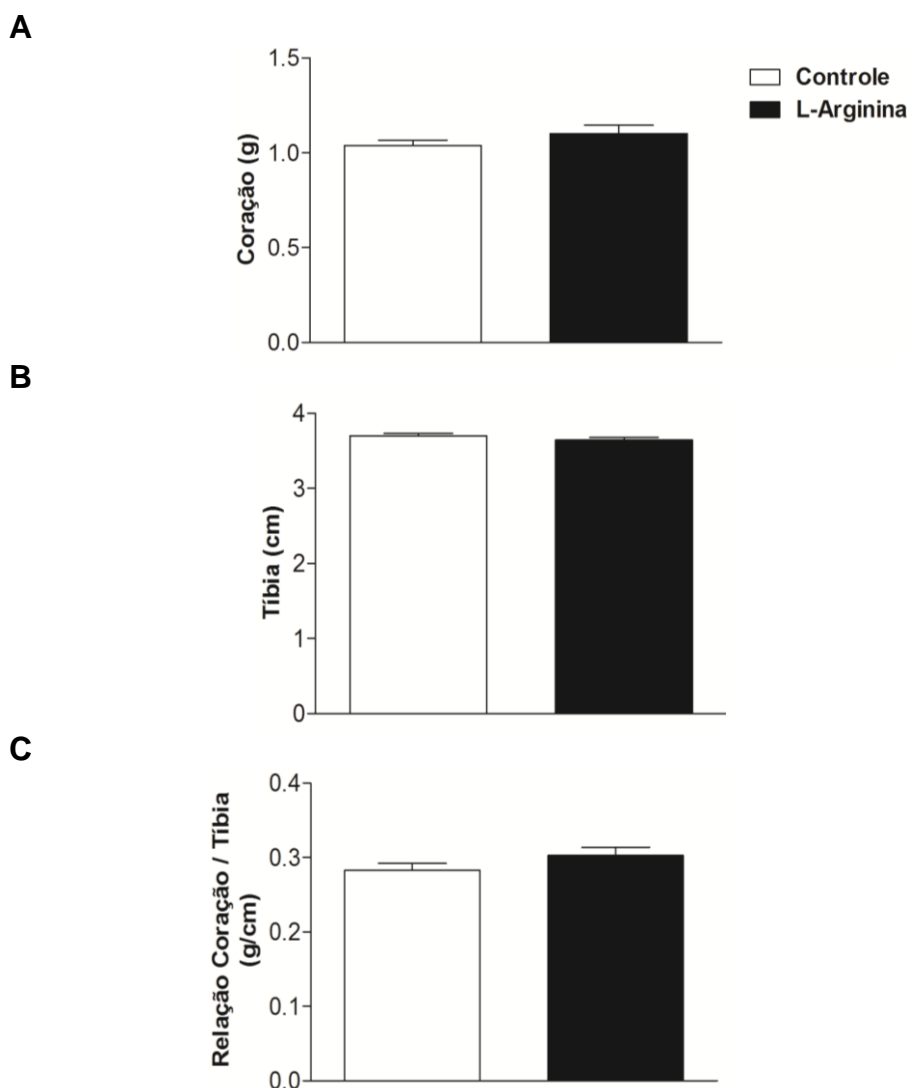


Figura 28: Efeitos da suplementação de L-arginina em parâmetros corporais periféricos. Em **(A)** Peso absoluto de coração (g), **(B)** Comprimento da tíbia (cm), **(C)** Relação coração/tíbia (g/cm) de animais Controle (tratados com água, n=6) ou tratados com L-arginina (n=6) submetidos à microinjeção bilateral de N-Propyl no PVN. Nível de significância adotado: $P < 0,05$, Student T teste, não pareado. Sem diferenças estatísticas entre os grupos avaliados.

5 DISCUSSÃO

5.1 ESTUDO 1: PAPEL MODULATÓRIO DA nNOS DO NÚCLEO PARAVENTRICULAR DO HIPOTÁLAMO SOBRE O CONTROLE BARORREFLEXO DE RATOS TREINADOS POR NATAÇÃO.

O propósito deste trabalho foi avaliar o papel da enzima nNOS no PVN e os possíveis mecanismos de ação no controle autonômico cardiovascular em ratos submetidos a treinamento físico de natação. Testes de barorreflexo associados a microinjeção de inibidor da nNOS no PVN foram conduzidos para evidenciar a participação da nNOS no controle cardiovascular de ratos treinados por natação. Algumas análises de composição corporal foram efetuadas para caracterizar o treinamento físico proposto, assim como, investigar a possível participação de parâmetros periféricos no controle cardiovascular. Além disso, análises quantitativas de nitrito, imunohistoquímica e expressão gênica de nNOS foram realizadas na tentativa de comprovar o papel relevante do NO para o controle cardiovascular após exercício. De fato, os dados encontrados neste trabalho sugerem que o treinamento de natação pode provocar alterações na biodisponibilidade de NO dentro do PVN, causando adaptações no controle baroreflexo via nNOS.

A natação têm sido utilizada como importante ferramenta metodológica para investigações de composição corporal (Wilterdink et al., 1993), metabolismo energético (Afonso et al., 2003) e funções cardiovasculares em animais (Martins-Pinge et al., 2005, Barretti et al., 2012). No presente estudo, após 4 semanas de treinamento de natação, ratos T apresentaram menor ganho de peso corporal comparado aos S, sem alterações significativas no crescimento corporal (distância naso-anal), corroborando com achados prévios (Raquel et al., 2013). Além disso, a natação foi eficiente para provocar algumas alterações de composição corporal, tais como: diminuição de tecido adiposo (perigonadal e retroperitoneal) e aumento do peso relativo do coração, confirmando dados da literatura que apontam perda de tecido adiposo (Wilterdink et al., 1993) e hipertrofia cardíaca fisiológica (Medeiros et al., 2004, Fernandes et al., 2015) após treinamento físico aquático.

Neste estudo, as glândulas adrenais não estavam aumentadas em ratos T, dando indícios que a natação foi uma intervenção segura e que provavelmente não causou estresse crônico em repouso nos animais. Assim, podemos inferir que as diferenças observadas no controle cardiovascular, não estão

relacionadas com o estresse do exercício, mas, por seus efeitos benéficos à função cardíaca. Além disso, em outro estudo do nosso grupo foi observado que os níveis de corticosterona durante o repouso não eram diferentes entre animais S e T (Raquel et al., 2013).

Sabe-se que a prática de exercício físico aeróbio em intensidade moderada melhora a regulação do controle cardiovascular devido a menor influência autonômica simpática (Sant'Ana et al., 2011), aumento da atividade vagal (Medeiros et al., 2004) e principalmente por adaptações em áreas cerebrais envolvidas na regulação central da PA (Martins-Pinge, 2011).

Nesse sentido, o NO também é conhecido por sua participação momento-a-momento no controle cardiovascular devido a sua atuação como neuromodulador em diferentes sinapses (excitatórias e inibitórias) o que amplia ainda mais essa complexa rede de comunicação neural (Zhang et al., 1998, Horn et al., 1994). Dados prévios apontam (Mastelari et al., 2011) que o NO dentro do PVN é um importante neuromodulador da atividade simpática após exercício físico, mas, até o momento, ainda não existia evidência demonstrando o papel específico da nNOS no controle barorreflexo de ratos treinados por natação.

Achados deste estudo confirmam dados prévios (Raquel et al., 2016, Medeiros et al., 2004, Sant'Ana et al., 2011) que também observaram bradicardia em repouso após protocolo de treinamento de natação. Alguns autores (Smith et al., 1989, Hassan, 1991) atribuem esse efeito ao aumento do tônus vagal associado com uma redução no tônus simpático cardíaco, sendo considerado um importante marcador fisiológico da eficácia do treinamento físico para a saúde cardiovascular.

O N-Propyl tem sido utilizado como inibidor seletivo para nNOS (Busnardo et al., 2010). Neste estudo, a administração desta droga no PVN causou resposta pressórica e taquicárdica em animais S e T, embora maiores valores foram observados no grupo T. Como a administração de salina 0,9% no PVN não causou mudanças significativas na PAM e FC dos animais, é possível atribuir ao N-Propyl as respostas cardiovasculares observadas e principalmente ao papel simpatoinibitório da nNOS no PVN de ratos T.

No hipotálamo, populações restritas de neurônios endócrinos e pré-autonômicos são capazes de ativar a nNOS e induzir a formação de NO, o qual tem alta habilidade de difundir-se afetando a atividade parácrina de células (Wood e Garthwaite, 1994). Estudos tem relacionado a atividade da nNOS com a regulação

autonômica e balanço de fluídos em estados fisiológicos e também patológicos tal como insuficiência cardíaca (Wang et al., 2005), hipovolemia (Ueta et al., 1998) e hipotensão (Krukoff et al., 1997). Vários estudos reportaram ação inibitória para o NO do PVN através da diminuição da atividade simpática para a periferia (Horn et al., 1994, Li et al., 2001, Zhang et al., 1997). No entanto, um trabalho aponta para efeitos excitatórios do NO no PVN, onde as respostas cardiovasculares induzidas por L-glutamato envolve uma produção local de NO e ativação da guanilato ciclase (Busnardo et al., 2010).

Nessa perspectiva, o GABA é tido como o neurotransmissor inibitório mais abundante dentro do PVN (Decavel e Van den Pol, 1990), assim, acredita-se que sua ação promova simpatoinibição (Martin et al., 1991). Estudo de Zhang e Patel (1998) evidenciou que no PVN as ações inibitórias do NO para regular a ANS renal são mediadas pela ativação local de neurônios GABAérgicos. Por outro lado, Li e colaboradores, (2003) reportaram que neurônios pré-autonômicos do PVN conectam-se com o NTS e a área RVLM, e quanto maior a disponibilidade de NO mais extensa é a ação inibitória.

Nossos dados de imunohistoquímica do estudo 1 indicaram maior prevalência da marcação de nNOS para neurônios pré-autonômicos parvocelulares localizados na região medial e posterior do PVN de ratos T, e somado a isso, houve maior expressão gênica de nNOS e níveis de nitrito no PVN de ratos T por natação. Esses dados revelam que o aumento do NO dentro do PVN pode envolver mecanismos de ação de vias neuronais aferentes ou eferentes que contribuem significativamente para a manutenção do tonus simpático após exercício.

No estudo 1, após a inibição da nNOS dentro do PVN, ratos T apresentaram um déficit no controle autonômico cardiovascular. Dados prévios (de Abreu et al., 2009, Mastelari et al., 2012) envolvendo o mesmo protocolo de natação observaram a participação do PVN e NO na modulação da variabilidade da FC através de um aumento do componente parasimpático e diminuição do simpático após exercício físico. Os achados do estudo 1 confirmam esses dados e acrescentam que ratos T por natação apresentam melhor barorreflexo espontâneo devido a sua eficácia para responder com bradicardia (ganho up) aos aumentos de PA e taquicardia (ganho down) as diminuições de PA.

No presente estudo, também foi observado que a microinjeção de N-Propyl dentro do PVN de ratos T aumentou os valores de LF (absoluto e

normalizado) e diminuiu o valor de HFnu, causando, portanto, o aumento do componente simpático e diminuição do parasimpático na variabilidade da FC. Além disso, após a microinjeção de N-Propyl no PVN, houve a diminuição da variância na análise da variabilidade de FC e a razão simpato-vagal permaneceu similar entre os grupos S e T. Sendo assim, em geral, os dados do estudo 1 apontam para a nNOS do PVN um importante papel para a melhora do controle autonômico cardiovascular observado em ratos T por natação.

Embora estudos tenham demonstrado que a prática de exercício físico promove mudanças benéficas ao controle barorreflexo (Krieger et al., 1998, Brum et al., 2000) e melhora a ação simpatoinibitória em animais com falência cardíaca (Zheng et al., 2005, Wang et al., 2005), ainda não existia na literatura científica dados funcionais e moleculares associando a nNOS do PVN ao controle barorreflexo em ratos T por natação.

Estudo recente (Raquel et al., 2016) demonstrou que a natação é capaz de melhorar o controle barorreflexo de ratos normotensos. Os dados encontrados aqui no estudo 1 sobre barorreflexo e exercício físico mostram que a inibição da nNOS do PVN em ratos T atenua tanto respostas de ganho barorreflexo como parâmetros de sensibilidade do barorreflexo espontâneo (ganho total e ganho down).

Estudos mais antigos (Ricardo e Koh, 1978, McKellar e Loewy, et al., 1981, Swanson e Sawchenko, 1983) já revelaram que a ativação dos barorreceptores é capaz de disparar atividade neuronal tanto para o NTS como para o PVN, os quais, estão direta ou indiretamente conectados e contribuem para a homeostase do controle cardiovascular. Marcações de imunohistoquímica comprovam que terminais axonais de neurônios do NTS localizados na borda externa do PVN estão muito próximos do corpo celular de interneurônios GABAérgicos que são sinapticamente conectados com neurônios parvocelulares do PVN (Watkins et al., 2009). Além disso, Affleck et al., (2012) destacou a existência de outra via aferente do NTS para o PVN, na qual, a ativação de interneurônios nNOS na borda externa do PVN é capaz de liberar NO e estimular diretamente uma população de neurônios parvocelulares pré-simpáticos do PVN que por sua vez, afetam direta ou indiretamente a atividade de interneurônios GABAérgicos.

Contudo, considerando que o exercício aeróbio melhora a sensibilidade do ganho Barorreceptor aórtico (Brum et al., 2000) e que a natação

realizada no estudo 1 aumentou os níveis de NO dentro do PVN potencializando o efeito simpatoinibitório via nNOS, acredita-se que a atenuação do barorreflexo após N-Propyl no PVN ocorreu devido à mudanças centrais no controle reflexo. Porém, não podemos descartar que componentes periféricos também podem estar envolvidos nesse disparo dos barorreceptores e controle cardiovascular espontâneo. Sendo assim, os dados apresentados no estudo 1 abrem novas possibilidades de investigação sobre os efeitos do exercício físico para o controle barorreflexo em indivíduos normotensos e até mesmo para populações especiais como obesos, idosos, diabéticos e hipertensos.

5.2 ESTUDO 2: INIBIÇÃO DA nNOS DO NÚCLEO PARAVENTRICULAR DO HIPOTÁLAMO ALTERA O CONTROLE AUTONÔMICO CARDIOVASCULAR DE RATOS SUBMETIDOS AO TREINAMENTO EM ESTEIRA.

Já está bem estabelecido que a prática de exercício aeróbio melhora a modulação autonômica tanto de ratos normotensos (Sant'Ana et al., 2011, Mastelari et al., 2011) como hipertensos (Masson et al., 2014, Brum et al., 2000). Entretanto, ainda é incerto se os efeitos autonômicos observados após treinamento de natação diferem dos realizados em esteira.

Fernandes e colaboradores, (2015) evidenciaram que ambos os treinamentos são eficientes para a promoção de remodelamento cardíaco fisiológico, porém, os autores discutem apenas a participação de fatores biomoleculares (microRNAs) e não autonômicos. Sendo assim, considerando a escassez de dados na literatura que comparam os efeitos da natação e da corrida, o presente estudo teve como propósito verificar se o treinamento de corrida provoca alterações similares ou distintas ao protocolo de natação sob a modulação autonômica. Por este motivo, análises semelhantes ao estudo 1 foram conduzidas.

Sabemos que as adaptações fisiológicas no sistema cardiovascular (Brum et al., 2004) advindas da prática de exercício físico são acompanhadas de modificações do metabolismo energético (Morvan et al., 2013). Nossos resultados corroboram com dados prévios que também observaram após protocolo de treinamento em esteira, menor ganho de peso corporal para ratos T em relação aos S (Moraska et al., 2000) e diminuição de tecido adiposo retroperitoneal e perigonadal (Applegate et al., 1982). Ao final do protocolo de corrida, houve ainda aumento do

peso cardíaco e de músculos esqueléticos (sóleo e gastrocnêmio), o que está intimamente relacionado com hipertrofia cardíaca (Brum et al., 2004) e hipertrofia muscular esquelética (Moraska et al., 2000, Applegate et al., 1982).

Ratos T em esteira apresentaram também melhor desempenho físico, assim como observado em estudos prévios (Higa et al., 2009, Moraska et al., 2000). Alguns autores observaram hipertrofia de glândulas adrenais após 8 semanas de corrida em ratos Sprague-Dawley (Moraska et al., 2000), porém, em nosso estudo, realizado com ratos da linhagem Wistar, não observamos alterações nessa variável. Esse achado divergente pode ter relação com as diferenças fisiológicas entre as espécies utilizadas nos estudos. Apesar disso, consideramos eficaz o treinamento realizado em esteira durante 8 semanas em animais do estudo 2, pois provocou efeitos cardiovasculares positivos, sem indícios de estresse crônico.

A escolha de conduzir experimentos com animais acordados e previamente treinados apresenta diversas dificuldades, entretanto, o uso de anestesia poderia influenciar direta ou indiretamente o controle autonômico cardiovascular (Franks e Lieb, 1982, Jin et al., 2009). Então, uma relevância deste trabalho foi avaliar a participação da nNOS no controle cardiovascular pelo PVN em animais treinados por esteira e não anestesiados. Os principais achados em ratos T foram: bradicardia em repouso; diminuição do componente simpático normalizado; aumento do componente parassimpático absoluto e normalizado; e menor razão simpato-vagal nas análises de variabilidade da FC, configurando assim, maior saída vagal para ratos T em esteira, dados estes que corroboram com achados prévios (Negrão et al., 1992).

Evidências apontam aumento de PA, FC (Mastelari et al., 2011) e ANS (Zhang et al., 1997) com a administração de L-NAME no PVN. No estudo 2, assim como no estudo 1, a inibição da nNOS no PVN, provocou maior resposta pressórica e taquicárdica em ratos T que em animais S. Nossos achados vão de encontro com observações prévias (Zhang e Patel., 1998, Bains e Ferguson, 1997). Esses autores demonstraram que o NO oriundo da ativação de receptores NMDA, pode aumentar a liberação de GABA em terminais pré-sinápticos dentro do PVN, sugerindo um papel inibitório para o NO do PVN na saída simpática periférica.

No presente estudo, as maiores respostas pressóricas e taquicárdicas notadas em animais T após a microinjeção de N-Propyl no PVN foram acompanhadas por um aumento do componente simpático absoluto, embora, menor

valor de LFnu tenha sido observado. Curiosamente, em animais T, a inibição da nNOS no PVN provocou também um aumento do componente parassimpático absoluto. Possivelmente, esse efeito pode ter sido em resposta a maior vasoconstrição periférica provocada pelo N-Propyl ou pela combinação de efeitos hemodinâmicos, hormonais ou de substâncias vasoativas que aumentaram o retorno venoso para o coração acionando assim, uma nova via aferente de controle cardiovascular. Respostas semelhantes foram encontradas por Mastelari et al., (2011) após a microinjeção de L-NAME no PVN de ratos T, e os autores atribuem esses efeitos à perda de neurotransmissão nitrérgica no PVN o qual modula diretamente a função autonômica.

No presente trabalho, animais T em esteira apresentaram maior ganho do barorreflexo, assim como ratos treinados por natação (Raquel et al., 2016). Em geral, o exercício induz plasticidade neuronal em centros responsáveis pelo controle autonômico cardiovascular (Michelini e Stern, 2009, Michelini et al., 2015). Sendo assim, no estudo 2, a gênese da melhora do barorreflexo após treinamento de corrida pode estar relacionada com alterações do controle autonômico (aumento da modulação parassimpática e diminuição simpática) (Brum et al., 2000, De Abreu et al., 2009) e a melhora da sensibilidade do barorreflexo espontâneo. Além disso, como todas as respostas espontâneas de barorreflexo em ratos T em esteira foram abolidas após administração de N-Propyl no PVN, atribuímos também a nNOS do PVN os efeitos positivos observados na modulação do barorreflexo após corrida.

Alguns autores (Stern et al., 2003, Horn et al., 1994) sugerem que no PVN, o NO atua como neuromodulador de sinapses que regulam funções endócrinas e autonômicas do sistema cardiovascular. Outros apontam que a prática de exercício físico melhora o mecanismo de ação do NO dentro do PVN proporcionando alterações da ANS em ratos com falência cardíaca (Zheng et al., 2005). Nossos achados moleculares confirmam que o exercício físico pode alterar a biodisponibilidade de NO dentro do PVN e influenciar a modulação autonômica.

A corrida, assim como a natação, proporcionou aumento do nitrito e expressão gênica de nNOS no PVN. Além disso, em ratos T em esteira, houve maior quantidade de marcação nNOS em neurônios parvocelulares da região ventro medial e posterior do PVN comparado com animais S. Juntas, essas informações consolidam nossos achados funcionais e comprovam que o treinamento de corrida

para ratos normotensos pode ser tão eficiente como a natação em promover melhora da atividade simpática inibitória pelo PVN via nNOS.

Portanto, as análises quantitativas e qualitativas apresentadas nos estudos 1 e 2 deste trabalho comprovam que a realização de exercício físico aeróbico (natação ou esteira) é capaz de modular o sistema cardiovascular e o NO derivado da enzima nNOS do PVN que tem papel relevante no controle barorreflexo.

Embora no presente estudo ambos os protocolos de treinamento (natação e esteira) demonstraram ser benéficos ao sistema cardiovascular, parece relevante que novas investigações busquem também comparar outras variáveis envolvidas nos efeitos fisiológicos desses exercícios. A escolha do protocolo experimental de exercício mais adequado para cada população poderá atender melhor as necessidades de cada modelo animal e assim melhorar a capacidade física deles, ou até mesmo reverter determinados aspectos patofisiológicos.

5.3 ESTUDO 3: EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO ORAL COM L-ARGININA NA MODULAÇÃO CARDIOVASCULAR PELO NÚCLEO PARAVENTRICULAR DO HIPOTÁLAMO.

O estudo 3 teve como propósito investigar os efeitos da suplementação com L-arginina na modulação cardiovascular pelo PVN e avaliar o papel funcional da nNOS no controle cardiovascular em animais suplementados. Associado a isso, foram realizadas dosagens de nitrito no PVN, coração, plasma, aorta torácica e rim para evidenciar os níveis de NO presente nesses tecidos e esclarecer possíveis relações com os efeitos cardiovasculares observados.

Os principais achados em ratos suplementados com L-arginina foram: 1) Bradicardia de repouso sem alterações na PAM; 2) Aumento dos níveis de nitrito no PVN e aorta torácica; 3) Maior resposta pressora e taquicárdica após inibição da nNOS no PVN; 4) Menor modulação simpática da PAS; 5) Diminuição da modulação simpática e aumento da parassimpática na variabilidade da FC; 6) Menor balanço simpatovagal; 7) Níveis de nitrito cardíaco e plasmático inalterados.

Outros estudos já evidenciaram benefícios da suplementação de L-arginina para a saúde cardiovascular de populações saudáveis (Blum et al., 2000), cardiopatas (Böger e Ron., 2005), hipertensas (Lekakis et al., 2002) e diabéticas (Piatti et al., 2001). Contudo, ainda não havia trabalho associando os efeitos da

suplementação com L-arginina sob o SNC e os possíveis benefícios cardiovasculares para animais saudáveis. Assim, este estudo realizado com ratos normotensos, permitiu identificar algumas das diversas variáveis que possivelmente estão envolvidas no controle cardiovascular após suplementação com L-arginina.

A utilização de L-arginina como suplemento alimentar vem crescendo nas diferentes populações devido ao fato desse aminoácido ser importante precursor da síntese de NO em sistemas orgânicos (Siasos, et al., 2007). Em geral, doenças endócrino-metabólicas e do sistema cardiovascular estão relacionadas com déficits na produção ou biodisponibilidade de NO, e o uso de L-arginina, tem ajudado no controle de doença arterial coronariana (Lucotti et al., 2009), hipertensão arterial (Palloshi et al., 2004), aterosclerose (Siasos et al., 2007) e diabetes Mellitus (Lucotti et al., 2006).

Normalmente os benefícios advindos da suplementação com L-arginina relacionam-se com a restauração da função endotelial, pois, o NO regula a atividade de células musculares lisas vasculares e também age no controle da agregação plaquetária (Hambrecht et al., 2000; Adams et al., 1997). Assim, esse gás participa da manutenção do tônus vascular facilitando a vasodilatação, melhorando o aporte sanguíneo e a efetividade vascular (Moncada et al., 1991). Por outro lado, no SNC o NO também pode atuar como importante neuromodulador de sinapses excitatórias e inibitórias, e seus efeitos em áreas específicas como o NTS, a RVLM e o PVN pode colaborar para aumentar ainda mais as redes neurais que controlam o sistema cardiovascular (Horn et al., 1994).

Além de atuar como vasodilatador (Furchgott et al., 1984) e neuromodulador (Paakkari e Lindsberg, 1995), há ainda indícios que as ações do NO influenciam a atividade muscular (Silveira et al., 2003, Balon e Nadler, 1994) e o metabolismo lipídico (Ribieri et al., 1996, Gaudiot et al., 1998). Gaudiot e colaboradores, (1998) em uma investigação in vitro, sugerem que o NO pode tanto ativar como inibir a lipólise por vias moleculares distintas. Neste estudo, não houve diferença no peso corporal dos animais após período de suplementação, entretanto, foram evidenciados menores valores relativos de tecido adiposo perigonadal e retroperitoneal em animais LA. Este dado nos sinaliza um possível aumento da lipólise e demonstra que de fato o NO pode ser importante na modulação do tecido adiposo branco. Apesar disso, necessita-se de outros estudos mais detalhados para melhor esclarecer tais achados.

Alguns autores (Kanaley, 2008, Collier et al., 2005) relatam que a suplementação de arginina é eficaz para estimular a secreção de hormônio do crescimento (GH), pois atua na inibição da somatostatina, a qual inibe a secreção do GH (Ghigo et al., 1991). Apesar disso, os achados do presente estudo, confirmam dados prévios de Chiyoda e colaboradores, (2009) que também não observaram alteração de comprimento (distância naso-anal) entre animais C e LA após 4 semanas de suplementação.

Em contrapartida, sabe-se também que a administração de L-arginina isolada pode alterar a biodisponibilidade de NO dentro do músculo esquelético, favorecendo o aporte sanguíneo muscular (Balon e Nadler, 1994). Nesse sentido, Valgas da Silva e colaboradores, (2015) apontam que a melhoria do desempenho físico após a suplementação com L-arginina está associada com a ativação de vias de sinalização do NO dentro do músculo gastrocnêmio. No presente estudo, ratos LA apresentaram maior peso relativo de músculo gastrocnêmio após 4 semanas de suplementação com LA. Embora esse achado seja subjetivo, nos indica que a suplementação de L-arginina pode ter contribuído para a maior disponibilidade de aminoácido facilitando assim, a síntese protéica e hipertrofia muscular. Entretanto, são dados preliminares e necessitam investigação mais específica.

Contudo, vale ressaltar que todos os dados apresentados aqui sobre composição corporal de ratos normotensos após suplementação de L-arginina ainda são prematuros e há necessidade de novos estudos para maiores esclarecimentos acerca destes e outros efeitos da arginina na composição corporal, já que os dados presentes na literatura ainda são muito inconsistentes para comparações.

Embora a síntese de NO seja relevante para a homeostase dos sistemas corporais, alguns fatores como captação e disponibilidade de L-arginina podem ser limitantes para a sua produção (Böger, 2007) e por isso, o acréscimo de L-arginina na dieta têm sido utilizado como aliado para favorecer a síntese de NO (Siasos et al., 2007, Lucotti et al., 2009,). Alguns investigadores apontam ainda efeitos benéficos para a suplementação com L-arginina tal como os proporcionados pela prática de exercício físico, a qual é conhecida por aumentar a produção de NO devido ao “shear stress” (Puga et al., 2011, Hambrecht et al., 2000).

Nesse sentido, os resultados basais (PAM e FC) de ratos LA apresentados aqui foram similares aos observados previamente em estudo que

evidenciou bradicardia em repouso, sem alterações na PAM, em ratos saudáveis submetidos ao protocolo de 4 semanas de natação (Raquel et al., 2016). Assim, os dados atuais demonstram que a suplementação com L-arginina pode ser tão benéfica como o exercício físico para efeitos cardiovasculares tônicos.

Investigações de imunohistoquímica (Watkins et al., 2009) sugerem que neurônios do NTS com terminais axônicos localizados na borda do PVN podem atuar via nNOS sob interneurônios GABA que estão conectados diretamente com neurônios pré-simpáticos do PVN. Assim, acredita-se que quanto maior for a atividade da nNOS maior será a liberação de GABA e conseqüentemente, menor a saída simpática periférica pelo PVN (Watkins et al., 2009).

No presente estudo observamos que a microinjeção bilateral de um inibidor seletivo da nNOS dentro do PVN provocou maiores respostas pressóricas e taquicárdicas em ratos LA. Associado a isso, maiores concentrações de nitrito foram encontradas no PVN de animais LA. Juntos, esses dados revelam que de fato a suplementação com L-arginina aumentou os níveis de NO dentro do PVN proporcionando assim, maior efeito simpatoinibitório.

Outros estudos também sugerem que o NO do PVN diminui a atividade simpática para a periferia (Horn et al., 1994, Zhang et al., 1997, Li et al., 2003). Os dados basais de análise espectral apresentados aqui corroboram com as demais evidências. Foi observado em animais LA, diminuição do tônus simpático periférico e o aumento do tônus parassimpático cardíaco sendo que, a inibição da nNOS no PVN prejudicou esses parâmetros e a modulação autonômica. Desta forma, estes dados fortalecem ainda mais a hipótese sobre a participação do NO do PVN na neuromodulação cardiovascular.

Sabemos que o PVN, juntamente com outras áreas, é responsável pela manutenção da atividade simpática renal (Lü et al., 1994, Ohta et al., 1993, Schramm et al., 1993). Estudo demonstrou que a microinjeção de um agonista GABA (Muscimol) no PVN diminuiu a ANS renal e a PA, enquanto a injeção de um antagonista GABA_A (Bicuculina) aumentou essas respostas (Horn et al., 1994). Outros pesquisadores observaram que inibidores da NOS (L-NAME e L-NMMA) no PVN provocaram aumento da ANS renal (Yang et al., 2004). Somado a isso, foi evidenciado que baixos níveis de NO no PVN contribuem para a elevação da ANS em situações patológicas como falência cardíaca (Patel et al., 2016, Patel et al.,

1996). Portanto, atualmente o NO do PVN tem sido intensamente indicado como regulador da ANS, em especial, a renal (Zheng e Patel, 2016).

Corroborando os dados citados anteriormente, nossos achados demonstraram que a suplementação com L-arginina aumentou os níveis de nitrito renal. Sabemos que o rim é o órgão primário responsável pela manutenção da concentração plasmática de L-arginina (Aoki et al., 1976) e que em condições normais ou patológicas (hipertensão ou falência cardíaca), as informações aferentes dos rins podem regular a ativação neural e hormonal contribuindo para o balanço da PA e fluídos corporais (Patel et al., 2016, Kopp, 2015). Somado a isso, Tseng e colaboradores, (1996) através de marcações de imunohistoquímica evidenciaram que neurônios nNOS da região parvocelular do PVN fazem comunicação direta com células renais.

Nesse sentido, no presente estudo, é possível que os maiores níveis de NO observados nos rins de animais LA, tenha contribuído para mudanças locais no tônus vascular renal, pois, sabe-se que uma estimulação do nervo aferente renal (NAR) aumenta a ANS, PA (Patel et al., 2016, Xu, et al., 2015) e a atividade de neurônios do PVN (Solano-Flores et al., 1997). Desta forma, não podemos negligenciar a hipótese de que o NO dos rins de animais LA poderia estar atuando como neuromodulador local de atividades do NAR. Embora, esses resultados em ratos LA apontem para uma possível participação do NO renal na neuromodulação da atividade simpática pelo PVN, os dados não são conclusivos e outros experimentos poderão ser conduzidos para confirmar esse questionamento.

Os níveis aumentados de nitrito nas aortas torácicas de animais LA parecem também ter contribuído para os efeitos cardiovasculares observados aqui. Sabemos que na regulação do tônus vascular tanto estímulos químicos como físicos são acionados e ativam a eNOS para a síntese e liberação de NO (Furchgott e Zawadzki, 1980). Sabe-se que a força física que o sangue exerce sobre a parede vascular interna (*shear stress*) é o estímulo físico mais expressivo para ativar a produção de NO via eNOS (Moncada, 1997, Boo, 2006). Porém, a atividade dessa enzima pode ser facilmente desregulada se houver mudanças de substratos ou cofatores (Böger, 2007). Considerando que a L-arginina é precursora do NO e que houve aumento do NO na aorta torácica de animais LA, podemos deduzir que a maior síntese e biodisponibilidade de NO vascular também pode ter contribuído para os efeitos cardiovasculares observados no estudo 3.

Neste contexto, no presente estudo a expectativa era que a suplementação de LA também aumentasse os níveis de NO dentro do coração e plasma, porém, os resultados de nitrito cardíaco e plasmático inalterados para o grupo LA foram inesperados. Apesar disso, como o peso cardíaco absoluto entre animais C e LA foi semelhante aqui, acreditamos que os efeitos cardiovasculares obtidos em animais LA (bradicardia de repouso, maior resposta pressórica e taquicárdica com n-Propyl no PVN e melhora do barorreflexo) foram mediados principalmente por alterações autonômicas no PVN via nNOS através da modulação da atividade simpática. Trabalhos prévios realizados em homens (Adams et al., 1995, Chin-Dusting et al., 1996) e em ratos saudáveis (Valgas da Silva et al., 2015) também não observaram alterações plasmáticas nos níveis de nitrito após suplementação oral com L-arginina. Entretanto, Adams e colaboradores (1995) observaram em homens saudáveis, maiores níveis de L-arginina plasmática após 28 dias de suplementação.

Bröer e colaboradores, (2000) identificaram em astrócitos um importante transportador de aminoácidos que permite a transferência organizada e intercelular de arginina e glutamina. Considerando que o cérebro produz um excesso de glutamina, os autores defendem que uma troca de arginina contra a glutamina na barreira hemato-encefálica seria capaz de mediar a oferta de arginina para o cérebro, um mecanismo que poderia desempenhar um papel fisiológico relevante na produção central de NO. Tendo em vista que animais LA apresentaram maior nível de nitrito no PVN e melhor ganho barorreflexo e que após a microinjeção de N-Propyl no PVN houve atenuação das respostas baroreflexas, podemos inferir que a suplementação com L-arginina demonstrou ser estratégia funcional para melhorar a produção e biodisponibilidade de NO via nNOS no PVN, contribuindo assim, para a modulação autonômica de respostas cardiovasculares.

Sabe-se ainda que devido as suas características de alta difusibilidade, o NO é capaz de penetrar rapidamente no citoplasma celular e provocar respostas diretas e precisas (Flora-Filho e Zilberstein, 2000). Nesse sentido, alguns investigadores observaram que a administração de doadores de NO dentro do PVN provoca alterações simpatoinibitórias imediatas em respostas cardiovasculares (Horn et al., 1994, Li et al., 2004, Zhang et al., 1997, Martins-Pinge et al., 2012). No presente estudo, a administração direta de L-arginina no PVN também demonstrou ser estratégia funcional para a modulação positiva do

barorreflexo, confirmando que central ou periféricamente a ação da L-arginina contribui para um melhor controle autonômico cardiovascular.

Portanto, os achados deste estudo permitem concluir que a suplementação com L-arginina favoreceu a síntese de NO dentro do PVN e contribuiu para uma melhor modulação autonômica do barorreflexo via nNOS. Embora seja conhecido que a suplementação com L-arginina é indicada em situações patológicas (Siasos et al., 2007, Lucotti et al., 2009, Palloshi et al., 2004, Lucotti et al., 2006), os dados apresentados indicam que o protocolo realizado aqui em animais normotensos e saudáveis proporcionou efeitos cardiovasculares relevantes e positivos, assim como a prática de exercícios físicos. De qualquer forma, torna-se necessário a realização de novos estudos para outros esclarecimentos acerca dos benefícios centrais e periféricos da suplementação com L-arginina em diferentes populações.

6 CONCLUSÃO GERAL

Os achados deste trabalho permitem concluir que tanto os treinamentos físicos de natação ou esteira como a suplementação de L-arginina foram efetivos para aumentar os níveis de NO do PVN através da enzima nNOS, contribuindo para a melhora da modulação autonômica e barorreflexa.

Embora a inibição da nNOS no PVN tenha alterado os parâmetros cardiovasculares dos animais e que os efeitos observados ocorreram principalmente devido a mudanças centrais no controle autonômico, não podemos descartar a possível participação de componentes periféricos nos achados aqui presentes. Nesse sentido, os dados apresentados abrem novas perspectivas para investigações futuras acerca dos efeitos benéficos do treinamento físico ou suplementação de oral com L-arginina no controle barorreflexo de populações normotensas ou especiais como, hipertensos, diabéticos, idosos e obesos.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, M. R. et al. Oral L-arginine inhibits platelet aggregation but does not enhance endothelium-dependent dilation in healthy young men. **J Am Coll Cardiol**, v. 26, n. 4, p. 1054-61, Oct 1995. ISSN 0735-1097. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7560599> >.
- ADAMS, M. R. et al. Oral L-arginine improves endothelium-dependent dilatation and reduces monocyte adhesion to endothelial cells in young men with coronary artery disease. **Atherosclerosis**, v. 129, n. 2, p. 261-9, Mar 1997. ISSN 0021-9150. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9105569> >.
- AFFLECK, V. S. et al. The projection and synaptic organisation of NTS afferent connections with presympathetic neurons, GABA and nNOS neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. **Neuroscience**, v. 219, p. 48-61, Sep 2012. ISSN 1873-7544. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22698695> >.
- AFONSO, M. et al. Respostas metabólicas agudas ao exercício físico moderado em ratos Wistar. **Revista Motriz**. 9: 83-88 p. 2003
- ALLEN, A. M. Inhibition of the hypothalamic paraventricular nucleus in spontaneously hypertensive rats dramatically reduces sympathetic vasomotor tone. **Hypertension**, v. 39, n. 2, p. 275-80, Feb 2002. ISSN 1524-4563. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11847197> >.
- AMARAL, S. L.; MICHELINI, L. C. Effect of gender on training-induced vascular remodeling in SHR. **Braz J Med Biol Res**, v. 44, n. 9, p. 814-26, Sep 2011. ISSN 1414-431X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21537612> >.
- AMARAL, S. L. et al. Exercise training normalizes wall-to-lumen ratio of the gracilis muscle arterioles and reduces pressure in spontaneously hypertensive rats. **J Hypertens**, v. 18, n. 11, p. 1563-72, Nov 2000. ISSN 0263-6352. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11081768> >.
- ANDRESEN, M.C.; YANG, M. Arterial Barorreceptor resetting: contributions of chronic and acute process. **Clin Exp Pharmacol Suppl**, v.15, p.19-30, 1989. ISSN 0143-9294. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2805444> >
- AOKI, T. T. et al. Amino acid levels across normal forearm muscle and splanchnic bed after a protein meal. **Am J Clin Nutr**, v. 29, n. 4, p. 340-50, Apr 1976. ISSN 0002-9165. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1266783> >.
- APPLEGATE, E. A. et al. Food intake, body composition and blood lipids following treadmill exercise in male and female rats. **Physiol Behav**, v. 28, n. 5, p. 917-20, May 1982. ISSN 0031-9384. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7048359> >.
- ARAKAWA, K. Antihypertensive mechanism of exercise. **J Hypertens**, v. 11, n. 3, p.

223-9, Mar 1993. ISSN 0263-6352. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8387079> >.

ARAÚJO, C. G. S. Fisiologia do exercício físico e hipertensão arterial. Uma breve introdução. **Revista Hipertensão**. 4 2001.

AZEVEDO, L. F. et al. Sport modality affects bradycardia level and its mechanisms of control in professional athletes. **Int J Sports Med**, v. 35, n. 11, p. 954-9, Oct 2014. ISSN 1439-3964. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24886917> >.

BADOER, E. Hypothalamic paraventricular nucleus and cardiovascular regulation. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 28, n. 1-2, p. 95-9, 2001 Jan-Feb 2001. ISSN 0305-1870. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11153547> >.

BAGASRA, O. et al. Activation of the inducible form of nitric oxide synthase in the brains of patients with multiple sclerosis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 92, n. 26, p. 12041-5, Dec 1995. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8618840> >.

BAINS, J. S.; FERGUSON, A. V. Nitric oxide regulates NMDA-driven GABAergic inputs to type I neurones of the rat paraventricular nucleus. **J Physiol**, v. 499 (Pt 3), p. 733-46, Mar 1997. ISSN 0022-3751. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9130169> >.

BALON, T. W.; NADLER, J. L. Nitric oxide release is present from incubated skeletal muscle preparations. **J Appl Physiol** (1985), v. 77, n. 6, p. 2519-21, Dec 1994. ISSN 8750-7587. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7896585> >.

BANDLER, R.; TORK, I. Midbrain periaqueductal grey region in the cat has afferent and efferent connections with solitary tract nuclei. **Neurosci Lett**, v. 74, n. 1, p. 1-6, Feb 1987. ISSN 0304-3940. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2436102> >.

BARNA, B. F. et al. Pontomedullary and hypothalamic distribution of Fos-like immunoreactive neurons after acute exercise in rats. **Neuroscience**, v. 212, p. 120-30, Jun 2012. ISSN 1873-7544. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22521827> >.

BARNEY, J. A. et al. Carotid baroreflex responsiveness in high-fit and sedentary young men. **J Appl Physiol** (1985), v. 65, n. 5, p. 2190-4, Nov 1988. ISSN 8750-7587. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3209562> >.

BARRETTI, D. L. et al. Effects of aerobic exercise training on cardiac renin-angiotensin system in an obese Zucker rat strain. **PLoS One**, v. 7, n. 10, p. e46114, 2012. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23077501> >.

BECKMAN, J. S.; KOPPENOL, W. H. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. **Am J Physiol**, v. 271, n. 5 Pt 1, p. C1424-37, Nov 1996.

ISSN 0002-9513. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8944624> >.

BLAIR, M. L. et al. Role of the hypothalamic paraventricular nucleus in cardiovascular regulation. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 23, n. 2, p. 161-5, Feb 1996. ISSN 0305-1870. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8819646> >.

BLUM, A. et al. Effects of oral L-arginine on endothelium-dependent vasodilation and markers of inflammation in healthy postmenopausal women. **J Am Coll Cardiol**, v. 35, n. 2, p. 271-6, Feb 2000. ISSN 0735-1097. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10676669> >.

BOO, Y. C. Shear stress stimulates phosphorylation of protein kinase A substrate proteins including endothelial nitric oxide synthase in endothelial cells. **Exp Mol Med**, v. 38, n. 4, p. 453, Aug 2006. ISSN 1226-3613. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16981308> >.

BRAGA, D. C. et al. Central oxytocin modulates exercise-induced tachycardia. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 278, n. 6, p. R1474-82, Jun 2000. ISSN 0363-6119. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10848513> >.

BRETT, D. S. et al. Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. **Nature**, v. 347, n. 6295, p. 768-70, Oct 1990. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1700301> >.

BRODY, M. J. et al. **Neurogenic mechanisms of experimental hypertension. Hypertension**: McGraw-Hill, New York: p.117–139, 1983.

BRUM, P. C. et al. Adaptações agudas e crônicas do exercício físico no sistema cardiovascular. **Rev Paulis Educ Fís.** 18: 21-31 p. 2004.

BRUM, P. C. et al. Exercise training increases Barorreceptor gain sensitivity in normal and hypertensive rats. **Hypertension**, v. 36, n. 6, p. 1018-22, Dec 2000. ISSN 1524-4563. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11116118> >.

BRÖER, A. et al. The heterodimeric amino acid transporter 4F2hc/y+LAT2 mediates arginine efflux in exchange with glutamine. **Biochem J**, v. 349 Pt 3, p. 787-95, Aug 2000. ISSN 0264-6021. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10903140> >.

BUSNARDO, C. et al. Cardiovascular responses to L-glutamate microinjection into the hypothalamic paraventricular nucleus are mediated by a local nitric oxide-guanylate cyclase mechanism. **Brain Res**, v. 1344, p. 87-95, Jul 2010. ISSN 1872-6240. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20478280> >.

BÖGER, R. H. The pharmacodynamics of L-arginine. **J Nutr**, v. 137, n. 6 Suppl 2, p. 1650S-1655S, Jun 2007. ISSN 0022-3166. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17513442> >.

BÖGER, R. H.; RON, E. S. L-Arginine improves vascular function by overcoming deleterious effects of ADMA, a novel cardiovascular risk factor. **Altern Med Rev**, v.

10, n. 1, p. 14-23, Mar 2005. ISSN 1089-5159. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15771559> >.

CAMERON, J. D.; DART, A. M. Exercise training increases total systemic arterial compliance in humans. **Am J Physiol**, v. 266, n. 2 Pt 2, p. H693-701, Feb 1994. ISSN 0002-9513. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8141370> >.

CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J.; HAIBARA, A. S. Reflexos cardiovasculares e hipertensão arterial. **Rev Bras Hipertens**, 8: 30-40 p. 2001.

CAMPOS, R. E. A. Hipertensão arterial: o que tem a dizer o sistema nervoso. **Rev Brás Hipertens**: 42-54 p. 2001.

CARD, J. P. et al. Efferent projections of rat rostroventrolateral medulla C1 catecholamine neurons: Implications for the central control of cardiovascular regulation. **J Comp Neurol**, v. 499, n. 5, p. 840-59, Dec 2006. ISSN 0021-9967. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17048222> >.

CASSAGLIA, P. A. et al. Neuropeptide Y acts in the paraventricular nucleus to suppress sympathetic nerve activity and its baroreflex regulation. **J Physiol**, v. 592, n. 7, p. 1655-75, Apr 2014. ISSN 1469-7793. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24535439> >.

CAVALLERI, M. T. et al. Afferent signaling drives oxytocinergic preautonomic neurons and mediates training-induced plasticity. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 301, n. 4, p. R958-66, Oct 2011. ISSN 1522-1490. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21795633> >.

CERONI, A. et al. Chronic absence of Barorreceptor inputs prevents training-induced cardiovascular adjustments in normotensive and spontaneously hypertensive rats. **Exp Physiol**, v. 94, n. 6, p. 630-40, Jun 2009. ISSN 1469-445X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19251981> >.

CHEN, Q. H.; TONEY, G. M. Identification and characterization of two functionally distinct groups of spinal cord-projecting paraventricular nucleus neurons with sympathetic-related activity. **Neuroscience**, v. 118, n. 3, p. 797-807, 2003. ISSN 0306-4522. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12710987> >.

CHIN-DUSTING, J. P. et al. Effects of in vivo and in vitro L-arginine supplementation on healthy human vessels. **J Cardiovasc Pharmacol**, v. 28, n. 1, p. 158-66, Jul 1996. ISSN 0160-2446. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8797150> >.

CHIYODA, A. et al. Efeito da suplementação oral de arginina sobre a secreção de GH e metabolismo de lipídios em ratos Wistar treinados. **Motricidade: Fund Téc Cient Desp**, 5: 1-11 p. 2009.

COLLIER, S. R. et al. Growth hormone responses to varying doses of oral arginine. **Growth Horm IGF Res**, v. 15, n. 2, p. 136-9, Apr 2005. ISSN 1096-6374. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15809017> >.

COMAN, D. et al. A. New indications and controversies in arginine therapy. **Clin Nutr**, v. 27, n. 4, p. 489-96, Aug 2008. ISSN 1532-1983. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18640748> >.

COOTE, J. H. et al. Control of sympathetic outflows by the hypothalamic paraventricular nucleus. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 25, n. 6, p. 461-3, Jun 1998. ISSN 0305-1870. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9673825> >.

COX, R. H. et al. Cardiovascular and sympathoadrenal responses to stress in swim-trained rats. **J Appl Physiol**, v. 58, n. 4, p. 1207-14, Apr 1985. ISSN 8750-7587. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3988676> >.

CRESTANI, C. C. et al. N-methyl-D-aspartate glutamate receptors in the hypothalamic paraventricular nucleus modulate cardiac component of the baroreflex in unanesthetized rats. **Neurosci Res**, v. 67, n. 4, p. 317-26, Aug 2010. ISSN 1872-8111. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20472007> >.

CRUZ, J. C. et al. Intermittent activation of peripheral chemoreceptors in awake rats induces Fos expression in rostral ventrolateral medulla-projecting neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. **Neuroscience**, v. 157, n. 2, p. 463-72, Nov 2008. ISSN 0306-4522. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18838112> >.

CUI, G. Y. et al. Effect of antagonism of glutamate receptors in the PVN region on baroreflex in conscious rats. **Zhongguo Ying Yong Sheng Li Xue Za Zhi**, v. 24, n. 4, p. 421-5, Nov 2008. ISSN 1000-6834. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21158142> >.

DALL'AGO, P. et al. Parasympathetic dysfunction is associated with baroreflex and chemoreflex impairment in streptozotocin-induced diabetes in rats. **Auton Neurosci**, v. 131, n. 1-2, p. 28-35, Jan 2007. ISSN 1566-0702. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16872914> >.

DAMPNEY, R. A. Functional organization of central pathways regulating the cardiovascular system. **Physiol Rev**, v. 74, n. 2, p. 323-64, Apr 1994. ISSN 0031-9333. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8171117> >.

DAMPNEY, R. A. et al. Long-term regulation of arterial blood pressure by hypothalamic nuclei: some critical questions. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 32, n. 5-6, p. 419-25, 2005 May-Jun 2005. ISSN 0305-1870. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15854152> >.

DE ABREU, S. B. et al. Role of paraventricular nucleus in exercise training-induced autonomic modulation in conscious rats. **Auton Neurosci**, v. 148, n. 1-2, p. 28-35, Jun 2009. ISSN 1872-7484. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19297253> >.

DE SOUZA, C. G. et al. Receptor changes in the nucleus tractus solitarii of the rat after exercise training. **Med Sci Sports Exerc**, v. 33, n. 9, p. 1471-6, Sep 2001. ISSN 0195-9131. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11528334>>.

DECAVEL, C.; VAN DEN POL, A. N. GABA: a dominant neurotransmitter in the hypothalamus. **J Comp Neurol**, v. 302, n. 4, p. 1019-37, Dec 1990. ISSN 0021-9967. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2081813> >.

DI FRANCESCO MARINO, S. et al. The effect of physical exercise on endothelial function. **Sports Med**, v. 39, n. 10, p. 797-812, 2009. ISSN 0112-1642. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19757859> >.

DOUTRELEAU, S. et al. Chronic L-arginine supplementation enhances endurance exercise tolerance in heart failure patients. **Int J Sports Med**, v. 27, n. 7, p. 567-72, Jul 2006. ISSN 0172-4622. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16802253> >.

DOUTRELEAU, S. et al. Chronic but not acute oral L-arginine supplementation delays the ventilatory threshold during exercise in heart failure patients. **Can J Appl Physiol**, v. 30, n. 4, p. 419-32, Aug 2005. ISSN 1066-7814. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16258181> >.

DUFLOTH, D. L. et al. Modulation of exercise tachycardia by vasopressin in the nucleus tractus solitarii. **Am J Physiol**, v. 273, n. 4 Pt 2, p. R1271-82, Oct 1997. ISSN 0002-9513. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9362290> >.

DUN, N.J. et al. Nitric oxide synthase immunoreactivity in rat pontine medullary neurons. **Neuroscience**, v.59, p.429-445, 1994.

FARAH, V. M. et al. Comparison of three methods for the determination of baroreflex sensitivity in conscious rats. **Braz J Med Biol Res**, v. 32, n. 3, p. 361-9, Mar 1999. ISSN 0100-879X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10347797> >.

FERNANDES, T. et al. Aerobic exercise training promotes physiological cardiac remodeling involving a set of microRNAs. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 309, n. 4, p. H543-52, Aug 2015. ISSN 1522-1539. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26071549> >.

FILHO, A.R.A. et al. Mecanismos neurais, centrais e periféricos de gênese e controle a curto prazo da pressão arterial: da fisiologia à fisiopatologia. **Rev Bras Cardiol**. 13, p.1-5, 2004.

FLORA FILHO, R.; ZILBERSTEIN, B. Nitric oxide: the simple messenger passing through complexity. Metabolism, synthesis and functions. **Rev Assoc Med Bras (1992)**, v. 46, n. 3, p. 265-71, 2000 Jul-Sep 2000. ISSN 0104-4230. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11070518> >.

FORJAZ, C. L. M. et al. A duração do exercício determina a magnitude e a duração da hipotensão pós-exercício. **Arq Bras Cardiol**, 70: 99-104, p. 1998

FORJAZ, C. L. M. et al. Hipotensão pós-exercício: características, determinantes e mecanismos. **Rev Soc Cardiol Est SP**, 10, 16-24, p. 2000.

FRANKS, N. P.; LIEB, W. R. Molecular mechanisms of general anaesthesia. **Nature**, v. 300, n. 5892, p. 487-93, Dec 1982. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6755267> >.

FURCHGOTT, R. F. et al. Endothelial cells as mediators of vasodilation of arteries. **J Cardiovasc Pharmacol**, v. 6 Suppl 2, p. S336-43, 1984. ISSN 0160-2446. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6206342> >.

FURCHGOTT, R. F.; ZAWADZKI, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, v. 288, n. 5789, p. 373-6, Nov 1980. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6253831> >.

FÖRSTERMANN, U. et al. Isoforms of nitric oxide synthase. Properties, cellular distribution and expressional control. **Biochem Pharmacol**, v. 50, n. 9, p. 1321-32, Oct 1995. ISSN 0006-2952. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7503779> >.

GAUDIOT, N. et al. Modulation of white adipose tissue lipolysis by nitric oxide. **J Biol Chem**, v. 273, n. 22, p. 13475-81, May 1998. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9593681> >.

GAVA, N. S. et al. Low-intensity exercise training attenuates cardiac beta-adrenergic tone during exercise in spontaneously hypertensive rats. **Hypertension**, v. 26, n. 6 Pt 2, p. 1129-33, Dec 1995. ISSN 0194-911X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7498982> >.

GHIGO, E. et al. Arginine reinstates the somatotrope responsiveness to intermittent growth hormone-releasing hormone administration in normal adults. **Neuroendocrinology**, v. 54, n. 3, p. 291-4, Sep 1991. ISSN 0028-3835. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1944815> >.

GRANATA, A. R.; KITAI, S. T. Intracellular analysis in vivo of different barosensitive bulbospinal neurons in the rat rostral ventrolateral medulla. **J Neurosci**, v. 12, n. 1, p. 1-20, Jan 1992. ISSN 0270-6474. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1729431> >.

GREEN, D. J. et al. Effect of exercise training on endothelium-derived nitric oxide function in humans. **J Physiol**, v. 561, n. Pt 1, p. 1-25, Nov 2004. ISSN 0022-3751. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15375191> >.

GREEN, L. C. et al. Nitrate synthesis in the germfree and conventional rat. **Science**, v. 212, n. 4490, p. 56-8, Apr 1981. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6451927> >.

GROSS, S. S. Nitric oxide synthases and their cofactors. **In Nitric oxide and the**

kidney: physiology and pathophysiology. Chapman and Hall: 52-65 p. 1997.

GUIMARAES, P. S. et al. Development of attenuated baroreflexes in obese Zucker rats coincides with impaired activation of nucleus tractus solitarius. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 306, n. 9, p. R681-92, May 2014. ISSN 1522-1490. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24573182> >.

GUYENET, P. G. The sympathetic control of blood pressure. **Nat Rev Neurosci**, v. 7, n. 5, p. 335-46, May 2006. ISSN 1471-003X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16760914> >.

HAMBRECHT, R. et al. Correction of endothelial dysfunction in chronic heart failure: additional effects of exercise training and oral L-arginine supplementation. **J Am Coll Cardiol**, v. 35, n. 3, p. 706-13, Mar 2000. ISSN 0735-1097. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10716474> >.

HASSAN, M. O. The role of the autonomic nervous system in exercise bradycardia in rats. **East Afr Med J**, v. 68, n. 2, p. 130-3, Feb 1991. ISSN 0012-835X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2040232> >.

HEAD, G. A.; MCCARTY, R. Vagal and sympathetic components of the heart rate range and gain of the Barorreceptor-heart rate reflex in conscious rats. **J Auton Nerv Syst**, v. 21, n. 2-3, p. 203-13, Dec 1987. ISSN 0165-1838. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3450695> >.

HIGA, K. T. et al. Baroreflex control of heart rate by oxytocin in the solitary-vagal complex. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 282, n. 2, p. R537-45, Feb 2002. ISSN 0363-6119. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11792664> >.

HIGA et al. Brainstem oxytocinergic modulation of heart rate control in rats: effects of hypertension and exercise training. **Exp Physiol**, v. 94, n. 11, p. 1103-13, Nov 2009. ISSN 1469-445X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19638362> >.

HORN, T. et al. Nitric oxide actions in paraventricular nucleus: cardiovascular and neurochemical implications. **Am J Physiol**, v. 266, n. 1 Pt 2, p. R306-13, Jan 1994. ISSN 0002-9513. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8304554> >.

HUBER, D. A.; SCHREIHOFER, A. M. Exaggerated sympathoexcitatory reflexes develop with changes in the rostral ventrolateral medulla in obese Zucker rats. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 311, n. 2, p. R243-53, Aug 2016. ISSN 1522-1490. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27280427> >.

ICHIGE, M. H. et al. Exercise training preserves vagal preganglionic neurones and restores parasympathetic tonus in heart failure. **J Physiol**, v. 594, n. 21, p. 6241-6254, Nov 2016. ISSN 1469-7793. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27444212> >.

ICHIYAMA, R. M. et al. Changes in the exercise activation of diencephalic and

brainstem cardiorespiratory areas after training. **Brain Res**, v. 947, n. 2, p. 225-33, Aug 2002. ISSN 0006-8993. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12176165> >.

IDA, F. et al The magnitude of rapid resetting of the Barorreceptors is attenuated in spontaneously hypertensive rats. **Gen. Hypertens**, 218, p.65–67, 1992.

IRIGOYEN, M. C. E. A. et al. Controle cardiovascular: regulação reflexa do sistema nervoso simpático. **Rev Brás Hipertens**. 8, p.55-62 p. 2001.

JIN, Y. H. et al. Presynaptic actions of propofol enhance inhibitory synaptic transmission in isolated solitary tract nucleus neurons. **Brain Res**, v. 1286, p. 75-83, Aug 2009. ISSN 1872-6240. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19559683> >.

KANALEY, J. A. Growth hormone, arginine and exercise. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**, v. 11, n. 1, p. 50-4, Jan 2008. ISSN 1363-1950. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18090659> >.

KC, P. et al. Increased vasopressin transmission from the paraventricular nucleus to the rostral medulla augments cardiorespiratory outflow in chronic intermittent hypoxia-conditioned rats. **J Physiol**, v. 588, n. Pt 4, p. 725-40, Feb 2010. ISSN 1469-7793. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20051497> >.

KELLER, D. M. et al. Carotid baroreflex control of leg vasculature in exercising and non-exercising skeletal muscle in humans. **J Physiol**, v. 561, n. Pt 1, p. 283-93, Nov 2004. ISSN 0022-3751. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15388778> >.

KINGWELL, B. A. et al. Spontaneous running increases aortic compliance in Wistar-Kyoto rats. **Cardiovasc Res**, v. 35, n. 1, p. 132-7, Jul 1997. ISSN 0008-6363. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9302357> >.

KINGWELL, B. A. et al. Arterial compliance may influence baroreflex function in athletes and hypertensives. **Am J Physiol**, v. 268, n. 1 Pt 2, p. H411-8, Jan 1995. ISSN 0002-9513. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7840291> >.

KINGWELL, B. A. et al. Exercise training reduces the sympathetic component of the blood pressure-heart rate baroreflex in man. **Clin Sci (Lond)**, v. 82, n. 4, p. 357-62, Apr 1992. ISSN 0143-5221. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1315644> >.

KIRCHHEIM, H. R. Systemic arterial Barorreceptor reflexes. **Physiol Rev**, v. 56, n. 1, p. 100-77, Jan 1976. ISSN 0031-9333. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/174143> >.

KNOWLES, R. G. et al. Kinetic characteristics of nitric oxide synthase from rat brain. **Biochem J**, v. 269, n. 1, p. 207-10, Jul 1990. ISSN 0264-6021. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1695842> >.

KOPP, U. C. Role of renal sensory nerves in physiological and pathophysiological conditions. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 308, n. 2, p. R79-95, Jan 2015. ISSN 1522-1490. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25411364> >.

KRIEGER, E. M. et al. Role of arterial Barorreceptor function on cardiovascular adjustments to acute and chronic dynamic exercise. **Biol Res**, v. 31, n. 3, p. 273-9, 1998. ISSN 0716-9760. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9830515> >.

KRIEGER, E. M. et al. Effects of exercise training on baroreflex control of the cardiovascular system. **Ann N Y Acad Sci**, v. 940, p. 338-47, Jun 2001. ISSN 0077-8923. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11458691> >.

KRUKOFF, T. L. et al. Activation by hypotension of neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus that project to the brainstem. **J Comp Neurol**, v. 385, n. 2, p. 285-96, Aug 1997. ISSN 0021-9967. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9268128> >.

KUBO, T.; KIHARA, M. Unilateral blockade of excitatory amino acid receptors in the nucleus tractus solitarii produces an inhibition of baroreflexes in rats. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, v. 343, n. 3, p. 317-22, Mar 1991. ISSN 0028-1298. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1678142> >.

LANE, P.; GROSS, S. S. Cell signaling by nitric oxide. **Semin Nephrol**, v. 19, n. 3, p. 215-29, May 1999. ISSN 0270-9295. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10226328> >.

LEKAKIS, J. P. et al. Oral L-arginine improves endothelial dysfunction in patients with essential hypertension. **Int J Cardiol**, v. 86, n. 2-3, p. 317-23, Dec 2002. ISSN 0167-5273. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12419572> >.

LÉNÁRD, Z. et al. Cardiovagal autonomic function in sedentary and trained offspring of hypertensive parents. **J Physiol**, v. 565, n. Pt 3, p. 1031-8, Jun 2005. ISSN 0022-3751. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15774521> >.

LI, D. P. et al. Signalling pathway of nitric oxide in synaptic GABA release in the rat paraventricular nucleus. **J Physiol**, v. 554, n. Pt 1, p. 100-10, Jan 2004. ISSN 0022-3751. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14678495> >.

LI, Y. et al. Nitric oxide inhibits the firing activity of hypothalamic paraventricular neurons that innervate the medulla oblongata: role of GABA. **Neuroscience**, v. 118, n. 3, p. 585-601, 2003. ISSN 0306-4522. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12710969> >.

LI, Y. F. et al. NMDA-mediated increase in renal sympathetic nerve discharge within the PVN: role of nitric oxide. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 281, n. 6, p. H2328-36, Dec 2001. ISSN 0363-6135. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11709399> >.

LLEWELLYN-SMITH, I. J. et al. Enkephalin-immunoreactive interneurons extensively innervate sympathetic preganglionic neurons regulating the pelvic viscera. **J Comp Neurol**, v. 488, n. 3, p. 278-89, Aug 2005. ISSN 0021-9967. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15952166> >.

LOVICK, T. A. Ventrolateral medullary lesions block the antinociceptive and cardiovascular responses elicited by stimulating the dorsal periaqueductal grey matter in rats. **Pain**, v. 21, n. 3, p. 241-52, Mar 1985. ISSN 0304-3959. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3991230> >.

LUCOTTI, P. et al. Oral L-arginine supplementation improves endothelial function and ameliorates insulin sensitivity and inflammation in cardiopathic nondiabetic patients after an aortocoronary bypass. **Metabolism**, v. 58, n. 9, p. 1270-6, Sep 2009. ISSN 1532-8600. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19592054> >.

LUCOTTI, P. et al. Beneficial effects of a long-term oral L-arginine treatment added to a hypocaloric diet and exercise training program in obese, insulin-resistant type 2 diabetic patients. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 291, n. 5, p. E906-12, Nov 2006. ISSN 0193-1849. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16772327> >.

LÜ, Y. et al. The distribution and origin of axon terminals with NADPH diaphorase activity in the nucleus of the solitary tract of the rat. **Neurosci Lett**, v. 171, n. 1-2, p. 70-2, Apr 1994. ISSN 0304-3940. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7521950> >.

MACK, S. O. et al. Stimulation of the hypothalamic paraventricular nucleus modulates cardiorespiratory responses via oxytocinergic innervation of neurons in pre-Botzinger complex. **J Appl Physiol (1985)**, v. 102, n. 1, p. 189-99, Jan 2007. ISSN 8750-7587. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16857863> >.

MACMICKING, J. et al. Nitric oxide and macrophage function. **Annu Rev Immunol**, v. 15, p. 323-50, 1997. ISSN 0732-0582. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9143691> >.

MARTIN, D. S. et al. Cardiovascular responses to bicuculline in the paraventricular nucleus of the rat. **Hypertension**, v. 18, n. 1, p. 48-55, Jul 1991. ISSN 0194-911X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1860711> >.

MARTINS-PINGE, M. C. et al. Regulation of arterial pressure by the paraventricular nucleus in conscious rats: interactions among glutamate, GABA, and nitric oxide. **Front Physiol**, v. 3, p. 490, 2012. ISSN 1664-042X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23316170> >.

MARTINS-PINGE, M. C. Cardiovascular and autonomic modulation by the central nervous system after aerobic exercise training. **Braz J Med Biol Res**, v. 44, n. 9, p. 848-54, Sep 2011. ISSN 1414-431X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21956530> >.

MARTINS-PINGE, M. C. et al. Differential influence of iNOS and nNOS inhibitors on rostral ventrolateral medullary mediated cardiovascular control in conscious rats. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**, v.131, p.65-69, 2007.

MARTINS-PINGE, M. C. et al. Attenuated pressor responses to amino acids in the rostral ventrolateral medulla after swimming training in conscious rats. **Auton Neurosci**, v. 122, n. 1-2, p. 21-8, Oct 2005. ISSN 1566-0702. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16139573> >.

MASSON, G. S. et al. Time-dependent effects of training on cardiovascular control in spontaneously hypertensive rats: role for brain oxidative stress and inflammation and baroreflex sensitivity. **PLoS One**, v. 9, n. 5, p. e94927, 2014. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24788542> >.

MASTELARI, R. B. et al. Glutamatergic neurotransmission in the hypothalamus PVN on heart rate variability in exercise trained rats. **Auton Neurosci**, v. 170, n. 1-2, p. 42-7, Sep 2012. ISSN 1872-7484. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22951107> >.

MASTELARI, R. B. et al. Nitric oxide inhibition in paraventricular nucleus on cardiovascular and autonomic modulation after exercise training in unanesthetized rats. **Brain Res**, v. 1375, p. 68-76, Feb 2011. ISSN 1872-6240. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21172321> >.

MCALLISTER, R. M.; LAUGHLIN, M. H. Vascular nitric oxide: effects of physical activity, importance for health. **Essays Biochem**, v. 42, p. 119-31, 2006. ISSN 0071-1365. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17144884> >.

MCCONELL, G. K.; KINGWELL, B. A. Does nitric oxide regulate skeletal muscle glucose uptake during exercise? **Exerc Sport Sci Rev**, v. 34, n. 1, p. 36-41, Jan 2006. ISSN 0091-6331. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16394813> >.

MCDONALD, M. P. et al. Baroreflex function and cardiac structure with moderate endurance training in normotensive men. **J Appl Physiol (1985)**, v. 74, n. 5, p. 2469-77, May 1993. ISSN 8750-7587. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8335580> >.

MCKELLAR, S.; LOEWY, A. D. Organization of some brain stem afferents to the paraventricular nucleus of the hypothalamus in the rat. **Brain Res**, v. 217, n. 2, p. 351-7, Aug 1981. ISSN 0006-8993. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7248792> >.

MEDEIROS, A. et al. Swimming training increases cardiac vagal activity and induces cardiac hypertrophy in rats. **Braz J Med Biol Res**, v. 37, n. 12, p. 1909-17, Dec 2004. ISSN 0100-879X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15558199> >.

MELO, R. M. et al. Training-induced, pressure-lowering effect in SHR: wide effects

on circulatory profile of exercised and nonexercised muscles. **Hypertension**, v. 42, n. 4, p. 851-7, Oct 2003. ISSN 1524-4563. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12913057> >.

MENDES RIBEIRO, A. C. et al. Abnormalities in L-arginine transport and nitric oxide biosynthesis in chronic renal and heart failure. **Cardiovasc Res**, v. 49, n. 4, p. 697-712, Mar 2001. ISSN 0008-6363. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11230969> >.

MENDONÇA, G. V. et al. Impact of Exercise Training on Physiological Measures of Physical Fitness in the Elderly. **Curr Aging Sci**, v. 9, n. 4, p. 240-259, 2016. ISSN 1874-6128. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27113585> >.

MICHELINI, L. C. et al. Neural control of circulation and exercise: a translational approach disclosing interactions between central command, arterial baroreflex, and muscle metaboreflex. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 309, n. 3, p. H381-92, Aug 2015. ISSN 1522-1539. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26024683> >.

MICHELINI, L. C.; STERN, J. E. Exercise-induced neuronal plasticity in central autonomic networks: role in cardiovascular control. **Exp Physiol**, v. 94, n. 9, p. 947-60, Sep 2009. ISSN 1469-445X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19617267> >.

MINAMI, N. et al. Mechanism behind augmentation in baroreflex sensitivity after acute exercise in spontaneously hypertensive rats. **Hypertens Res**, v. 29, n. 2, p. 117-22, Feb 2006. ISSN 0916-9636. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16755145> >.

MINSON, J. B. et al. c-fos identifies GABA-synthesizing barosensitive neurons in caudal ventrolateral medulla. **Neuroreport**, v. 8, n. 14, p. 3015-21, Sep 1997. ISSN 0959-4965. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9331908> >.

MITCHELL, J. H.; VICTOR, R. G. Neural control of the cardiovascular system: insights from muscle sympathetic nerve recordings in humans. **Med Sci Sports Exerc**, v. 28, n. 10 Suppl, p. S60-9, Oct 1996. ISSN 0195-9131. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8897407> >.

MOMBOULI, J.V.; VANHOUTTE, P.M. Endothelial dysfunction: from physiology to therapy. **J.Mol.Cell.Cardiol.**,v.31, p.61-74, 1999.

MONCADA, S. Nitric oxide in the vasculature: physiology and pathophysiology. **Ann N Y Acad Sci**, v. 811, p. 60-7; discussion 67-9, Apr 1997. ISSN 0077-8923. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9186585> >.

MONCADA, S. et al. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacol Rev**, v. 43, n. 2, p. 109-42, Jun 1991. ISSN 0031-6997. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1852778> >.

MOON, E. A. et al. Lateralisation of projections from the rostral ventrolateral medulla

to sympathetic preganglionic neurons in the rat. **Brain Res**, v. 929, n. 2, p. 181-90, Mar 2002. ISSN 0006-8993. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11864623> >.

MORASKA, A. et al. Treadmill running produces both positive and negative physiological adaptations in Sprague-Dawley rats. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 279, n. 4, p. R1321-9, Oct 2000. ISSN 0363-6119. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11004000> >.

MORVAN, E. et al. Metabolic, hemodynamic and structural adjustments to low intensity exercise training in a metabolic syndrome model. **Cardiovasc Diabetol**, v. 12, p. 89, Jun 2013. ISSN 1475-2840. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23777435> >.

MUELLER, P. J. Exercise training attenuates increases in lumbar sympathetic nerve activity produced by stimulation of the rostral ventrolateral medulla. **J Appl Physiol (1985)**, v. 102, n. 2, p. 803-13, Feb 2007. ISSN 8750-7587. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17053106> >.

MURPHY, A. Z. et al. Fos expression induced by changes in arterial pressure is localized in distinct, longitudinally organized columns of neurons in the rat midbrain periaqueductal gray. **J Comp Neurol**, v. 360, n. 2, p. 286-300, Sep 1995. ISSN 0021-9967. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8522648> >.

NAVARRO-GONZÁLVEZ, J. A. et al. Semiautomated measurement of nitrate in biological fluids. **Clin Chem**, v. 44, n. 3, p. 679-81, Mar 1998. ISSN 0009-9147. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9510886> >.

NEGRAO, C. E. et al. Vagal function impairment after exercise training. **J Appl Physiol (1985)**, v. 72, n. 5, p. 1749-53, May 1992. ISSN 8750-7587. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1601782> >.

NEGRÃO, C. E. et al. Effect of exercise training on RSNA, baroreflex control, and blood pressure responsiveness. **Am J Physiol**, v. 265, n. 2 Pt 2, p. R365-70, Aug 1993. ISSN 0002-9513. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8368390> >.

NICASTRO, H. et al. A suplementação de L-arginina promove implicações ergogênicas no exercício físico? Evidências e considerações metabólicas. **Rev. bras. ciênc. mov.** 16: 115-122 p. 2008.

NINOMIYA, I. et al. Central and baroreflex control of sympathetic nerve activity to the heart and kidney in a daily life of the cat. **Clin Exp Hypertens A**, v. 10 Suppl 1, p. 19-31, 1988. ISSN 0730-0077. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3242988> >.

NOSAKA, S. Modifications of arterial baroreflexes: obligatory roles in cardiovascular regulation in stress and poststress recovery. **Jpn J Physiol**, v. 46, n. 4, p. 271-88, Aug 1996. ISSN 0021-521X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8988438> >.

NOVAES, M. R.; LIMA, L. A. Effects of dietetic supplementation with L-arginine in cancer patients. A review of the literature. **Arch Latinoam Nutr**, v. 49, n. 4, p. 301-8, Dec 1999. ISSN 0004-0622. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10883292> >.

OHTA, A. et al. Localization of nitric oxide synthase-immunoreactive neurons in the solitary nucleus and ventrolateral medulla oblongata of the rat: their relation to catecholaminergic neurons. **Neurosci Lett**, v. 158, n. 1, p. 33-5, Aug 1993. ISSN 0304-3940. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7694198> >.

OHTA, H.; TALMAN, W. T. Both NMDA and non-NMDA receptors in the NTS participate in the Barorreceptor reflex in rats. **Am J Physiol**, v. 267, n. 4 Pt 2, p. R1065-70, Oct 1994. ISSN 0002-9513. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7943417> >.

PAKKARI, I.; LINDSBERG, P. Nitric oxide in the central nervous system. **Ann Med**, v. 27, n. 3, p. 369-77, Jun 1995. ISSN 0785-3890. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7546627> >.

PAGE, M. C. et al. GABA in the paraventricular nucleus tonically suppresses baroreflex function: alterations during pregnancy. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 300, n. 6, p. R1452-8, Jun 2011. ISSN 1522-1490. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21368269> >.

PALLOSHI, A. et al. Effect of oral L-arginine on blood pressure and symptoms and endothelial function in patients with systemic hypertension, positive exercise tests, and normal coronary arteries. **Am J Cardiol**, v. 93, n. 7, p. 933-5, Apr 2004. ISSN 0002-9149. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15050504> >.

PANIS, C. et al. Trypanosoma cruzi: effect of the absence of 5-lipoxygenase (5-LO)-derived leukotrienes on levels of cytokines, nitric oxide and iNOS expression in cardiac tissue in the acute phase of infection in mice. **Exp Parasitol**, v. 127, n. 1, p. 58-65, Jan 2011. ISSN 1090-2449. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20599987> >.

PATEL, K. P. et al. Renal Denervation Improves Exaggerated Sympathoexcitation in Rats With Heart Failure: A Role for Neuronal Nitric Oxide Synthase in the Paraventricular Nucleus. **Hypertension**, v. 68, n. 1, p. 175-84, Jul 2016. ISSN 1524-4563. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27185748> >.

PATEL, K. P. et al. Decreased gene expression of neuronal nitric oxide synthase in hypothalamus and brainstem of rats in heart failure. **Brain Res**, v. 734, n. 1-2, p. 109-15, Sep 1996. ISSN 0006-8993. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8896816> >.

PAXINOS G., WATSON C. **The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates**. Compact Third Edition. Academic Press:1997.

PIATTI, P. M. et al. Long-term oral L-arginine administration improves peripheral and

hepatic insulin sensitivity in type 2 diabetic patients. **Diabetes Care**, v. 24, n. 5, p. 875-80, May 2001. ISSN 0149-5992. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11347747> >.

PINHEIRO, A. R. et al. Beneficial effects of physical exercise on hypertension and cardiovascular adverse remodeling of diet-induced obese rats. **Nutr Metab Cardiovasc Dis**, v. 17, n. 5, p. 365-75, Jun 2007. ISSN 1590-3729. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17008074> >.

PUGA, G. M. et al. Efeitos terapêuticos da suplementação de L-arginina nas Doenças Cardiovasculares e Endócrino-Metabólicas. **Arq Med**, 25: 107-114 p. 2011.

PYNER, S.; COOTE, J. H. Identification of an efferent projection from the paraventricular nucleus of the hypothalamus terminating close to spinally projecting rostral ventrolateral medullary neurons. **Neuroscience**, v. 88, n. 3, p. 949-57, 1999. ISSN 0306-4522. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10363830> >.

RACZAK, G. et al. Long-term exercise training improves autonomic nervous system profile in professional runners. **Kardiol Pol**, v. 64, n. 2, p. 135-40; discussion 141-2, Feb 2006. ISSN 0022-9032. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16502362> >.

RAQUEL, H. A. et al. Caracterização bioquímica e composição corporal de um modelo de treinamento físico de natação em ratos. **Biosaúde**, 15 2013.

RAQUEL, H. E. A. et al. Swimming Training Modulates Nitric Oxide-Glutamate Interaction in the Rostral Ventrolateral Medulla in Normotensive Conscious Rats. **Front Physiol**, v. 7, p. 221, Jun, 2016. ISSN 1664-042X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27378935> >.

RAVEN, P. B. et al. Arterial baroreflex resetting during exercise: a current perspective. **Exp Physiol**, v. 91, n. 1, p. 37-49, Jan 2006. ISSN 0958-0670. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16210446> >.

RIBIERE, C. et al. White adipose tissue nitric oxide synthase: a potential source for NO production. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 222, n. 3, p. 706-12, May 1996. ISSN 0006-291X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8651909> >.

RICARDO, J. A.; KOH, E. T. Anatomical evidence of direct projections from the nucleus of the solitary tract to the hypothalamus, amygdala, and other forebrain structures in the rat. **Brain Res**, v. 153, n. 1, p. 1-26, Sep 1978. ISSN 0006-8993. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/679038> >.

RODRIGUES, B. et al. Aerobic exercise training delays cardiac dysfunction and improves autonomic control of circulation in diabetic rats undergoing myocardial infarction. **J Card Fail**, v. 18, n. 9, p. 734-44, Sep 2012. ISSN 1532-8414. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22939043> >.

ROH, J. et al. The Role of Exercise in Cardiac Aging: From Physiology to Molecular

Mechanisms. **Circ Res**, v. 118, n. 2, p. 279-95, Jan 2016. ISSN 1524-4571. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26838314> >.

SÁNCHEZ, F. et al. Coexistence of NADPH-diaphorase with vasopressin and oxytocin in the hypothalamic magnocellular neurosecretory nuclei of the rat. **Cell Tissue Res**, v. 276, n. 1, p. 31-4, Apr 1994. ISSN 0302-766X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8187164> >.

SANT'ANA, J. E. et al. Effect of the duration of daily aerobic physical training on cardiac autonomic adaptations. **Auton Neurosci**, v. 159, n. 1-2, p. 32-7, Jan 2011. ISSN 1872-7484. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20708981> >.

SCHAEFER, A. et al. L-arginine reduces exercise-induced increase in plasma lactate and ammonia. **Int J Sports Med**, v. 23, n. 6, p. 403-7, Aug 2002. ISSN 0172-4622. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12215958> >.

SCHRAMM, L. P. et al. Peripheral and central pathways regulating the kidney: a study using pseudorabies virus. **Brain Res**, v. 616, n. 1-2, p. 251-62, Jul 1993. ISSN 0006-8993. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7689411> >.

SCHREIHOFFER, A. M.; GUYENET, P. G. Identification of C1 presympathetic neurons in rat rostral ventrolateral medulla by juxtacellular labeling in vivo. **J Comp Neurol**, v. 387, n. 4, p. 524-36, Nov 1997. ISSN 0021-9967. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9373011> >.

SIASOS, G. et al. L-Arginine, the substrate for NO synthesis: an alternative treatment for premature atherosclerosis? **Int J Cardiol**, v. 116, n. 3, p. 300-8, Apr 2007. ISSN 1874-1754. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16860889> >.

SILVA, A. S. et al. Cardiovascular and autonomic alterations in rats with Parkinsonism induced by 6-OHDA and treated with L-DOPA. **Life Sci**, v. 127, p. 82-9, Apr 2015. ISSN 1879-0631. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25744393> >.

SILVA, G. J. et al. Acute and chronic effects of exercise on baroreflexes in spontaneously hypertensive rats. **Hypertension**, v. 30, n. 3 Pt 2, p. 714-9, Sep 1997. ISSN 0194-911X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9323011> >.

SILVA, K. A. et al. Previous exercise training has a beneficial effect on renal and cardiovascular function in a model of diabetes. **PLoS One**, v. 7, n. 11, p. e48826, 2012. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23144989> >.

SILVEIRA, L. R. et al. Formation of hydrogen peroxide and nitric oxide in rat skeletal muscle cells during contractions. **Free Radic Biol Med**, v. 35, n. 5, p. 455-64, Sep 2003. ISSN 0891-5849. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12927595> >.

SILVERTHORN, D. U. **Fisiologia integrada. Fisiologia humana. Uma abordagem integrada**. 2, Barueri-SP, Manole, 2003.

- SIMMONS, M. L.; MURPHY, S. Roles for protein kinases in the induction of nitric oxide synthase in astrocytes. **Glia**, v. 11, n. 3, p. 227-34, Jul 1994. ISSN 0894-1491. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7525477> >.
- SMITH, M. L. et al. Exercise training bradycardia: the role of autonomic balance. **Med Sci Sports Exerc**, v. 21, n. 1, p. 40-4, Feb 1989. ISSN 0195-9131. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2927300> >.
- SOLANO-FLORES, L. P. et al. Fos induction in central structures after afferent renal nerve stimulation. **Brain Res**, v. 753, n. 1, p. 102-19, Apr 1997. ISSN 0006-8993. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9125437> >.
- STERN, J. et al. Nitric oxide: a local signalling molecule controlling the activity of pre-autonomic neurones in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. **Acta Physiol Scand**, v. 177, n. 1, p. 37-42, Jan 2003. ISSN 0001-6772. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12492777> >.
- SWANSON, L. W.; SAWCHENKO, P. E. Hypothalamic integration: organization of the paraventricular and supraoptic nuclei. **Annu Rev Neurosci**, v. 6, p. 269-324, 1983. ISSN 0147-006X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6132586> >.
- SZABÓ, C.; THIEMERMANN, C. Regulation of the expression of the inducible isoform of nitric oxide synthase. **Adv Pharmacol**, v. 34, p. 113-53, 1995. ISSN 1054-3589. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8562430> >.
- TATRO, D. L.; et al.. Carotid-cardiac baroreflex response and LBNP tolerance following resistance training. **Med Sci Sports Exerc**, v. 24, n. 7, p. 789-96, Jul 1992. ISSN 0195-9131. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1501564> >.
- TAYLOR, R. B.; WEAVER, L. C. Spinal stimulation to locate preganglionic neurons controlling the kidney, spleen, or intestine. **Am J Physiol**, v. 263, n. 4 Pt 2, p. H1026-33, Oct 1992. ISSN 0002-9513. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1415750> >.
- TSENG, C. J. et al. Cardiovascular effects of nitric oxide in the brain stem nuclei of rats. **Hypertension**, v. 27, n. 1, p. 36-42, Jan 1996. ISSN 0194-911X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8591885> >.
- UETA, Y. et al. Hypovolemia upregulates the expression of neuronal nitric oxide synthase gene in the paraventricular and supraoptic nuclei of rats. **Brain Res**, v. 790, n. 1-2, p. 25-32, Apr 1998. ISSN 0006-8993. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9593810> >.
- VALGAS DA SILVA, C. P. et al. Improvement of the physical performance is associated with activation of NO/PGC-1 α /mtTFA signaling pathway and increased protein expressions of electron transport chain in gastrocnemius muscle from rats supplemented with L-arginine. **Life Sci**, v. 125, p. 63-70, Mar 2015. ISSN 1879-0631. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25636591> >.

VANHOUTTE, P. M. How to assess endothelial function in human blood vessels. **J Hypertens**, v. 17, n. 8, p. 1047-58, Aug 1999. ISSN 0263-6352. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10466457> >.

VINCENT, S. R.; KIMURA, H. Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain. **Neuroscience**, v. 46, n. 4, p. 755-84, 1992. ISSN 0306-4522. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1371855> >.

VÉRAS-SILVA, A. S. et al. Low-intensity exercise training decreases cardiac output and hypertension in spontaneously hypertensive rats. **Am J Physiol**, v. 273, n. 6 Pt 2, p. H2627-31, Dec 1997. ISSN 0002-9513. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9435596> >.

WANG, D. et al. B-adrenoceptors in the hypothalamic paraventricular nucleus modulate the baroreflex in conscious rats. **Neurosci Lett**, v. 551, p. 43-6, Sep 2013. ISSN 1872-7972. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23872094> >.

WANG, Y. et al. Effects of nNOS antisense in the paraventricular nucleus on blood pressure and heart rate in rats with heart failure. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 288, n. 1, p. H205-13, Jan 2005. ISSN 0363-6135. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15331368> >.

WATKINS, N. D. et al. An immunohistochemical investigation of the relationship between neuronal nitric oxide synthase, GABA and presympathetic paraventricular neurons in the hypothalamus. **Neuroscience**, v. 159, n. 3, p. 1079-88, Mar 2009. ISSN 1873-7544. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19272339> >.

WESTON, M. et al. Fos expression by glutamatergic neurons of the solitary tract nucleus after phenylephrine-induced hypertension in rats. **J Comp Neurol**, v. 460, n. 4, p. 525-41, Jun 2003. ISSN 0021-9967. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12717712> >.

WILTERDINK, E. J. et al. Changes in body composition and daily energy expenditure induced in rats during eight weeks of daily swim training. **Int J Obes Relat Metab Disord**, v. 17, n. 3, p. 139-43, Mar 1993. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8385073> >.

WOOD, J.; GARTHWAITE, J. Models of the diffusional spread of nitric oxide: implications for neural nitric oxide signalling and its pharmacological properties. **Neuropharmacology**, v. 33, n. 11, p. 1235-44, Nov 1994. ISSN 0028-3908. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7870284> >.

XU, B. et al. Activation of afferent renal nerves modulates RVLM-projecting PVN neurons. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 308, n. 9, p. H1103-11, May 2015. ISSN 1522-1539. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25637549> >.

YANG, C. W. et al. Oral supplementation of L-arginine prevents chronic cyclosporine

nephrotoxicity in rats. **Exp Nephrol**, v. 6, n. 1, p. 50-6, 1998 Jan-Feb 1998. ISSN 1018-7782. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9523173> >.

YANG, Z.; COOTE, J. H. Influence of the hypothalamic paraventricular nucleus on cardiovascular neurones in the rostral ventrolateral medulla of the rat. **J Physiol**, v. 513 (Pt 2), p. 521-30, Dec 1998. ISSN 0022-3751. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9807000> >.

YANG, Z. et al. Paraventricular nucleus activation of renal sympathetic neurones is synaptically depressed by nitric oxide and glycine acting at a spinal level. **Neuroscience**, v. 124, n. 2, p. 421-8, 2004. ISSN 0306-4522. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14980391> >.

YIN, G. D. et al. Facilitative effect of glycine on regulation of baroreflex in the hypothalamic paraventricular nucleus of conscious rats. **Sheng Li Xue Bao**, v. 61, n. 2, p. 155-60, Apr 2009. ISSN 0371-0874. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19377827> >.

ZHANG, K. et al. Nitric oxide within the paraventricular nucleus mediates changes in renal sympathetic nerve activity. **Am J Physiol**, v. 273, n. 3 Pt 2, p. R864-72, Sep 1997. ISSN 0002-9513. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9321861> >.

ZHANG, K.; PATEL, K. P. Effect of nitric oxide within the paraventricular nucleus on renal sympathetic nerve discharge: role of GABA. **Am J Physiol**, v. 275, n. 3 Pt 2, p. R728-34, Sep 1998. ISSN 0002-9513. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9728069> >.

ZHENG, H. et al. Exercise training improves endogenous nitric oxide mechanisms within the paraventricular nucleus in rats with heart failure. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 288, n. 5, p. H2332-41, May 2005. ISSN 0363-6135. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15653768> >.

ZHENG, H.; PATEL, K. P. Integration of renal sensory afferents at the level of the paraventricular nucleus dictating sympathetic outflow. **Auton Neurosci**, Aug 2016. ISSN 1872-7484. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27527558> >.

ANEXOS

ANEXO A: OFÍCIO DO COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA. PROCESSO Nº: 5185.2014.79.



Universidade
Estadual de Londrina

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OF. CIRC. CEUA Nº 085/2014

Londrina, 11 de Julho de 2014

Prezada Pesquisadora,

A CEUA/UEL reunida em 08 de Abril de 2014 avaliou o projeto de pesquisa intitulado "**Modulação pelo óxido nítrico e estresse oxidativo no núcleo paraventricular do hipotálamo em ratos normotensos treinados por dois protocolos diferentes: natação ou esteira**", registrado sob o processo CEUA nº **5185.2014.79** pesquisa do Centro de Ciências Biológicas, desenvolvido sob sua responsabilidade, julgando-o **aprovado** para execução entendendo-se que os princípios éticos postulados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal, estão respeitados.

Serão utilizados 300 ratos Wistar machos com peso aproximado de 200-250g, provenientes do Biotério Central do CCB. O projeto tem como objetivo avaliar os efeitos do óxido nítrico sob modulação do PVN durante respostas cardiovasculares e parâmetros de estresse oxidativo após treinamento de natação e esteira em ratos Wistar. Os animais destinados ao treinamento físico (T) terão seu peso avaliado diariamente antes do início de cada sessão de natação. Serão 20 sessões (4 semanas) de uma hora de natação por dia, durante 5 dias/ por semana. Na primeira semana haverá um aumento gradual do tempo de natação até alcançar o tempo de uma hora, iniciando com 15 min no primeiro dia, seguindo 30 min no segundo dia, 45 min no terceiro dia e uma hora no quarto dia. Para implante de cânulas no PVN, será realizada cirurgia estereotáxica sob anestesia intraperitoneal de Quetamina + xilazina. Após 3 dias de recuperação os animais serão novamente submetidos à anestesia quetamina e xilazina para a cirurgia de canulação crônica da artéria e veia femorais, com o objetivo de monitorização da pressão arterial (PA) e administração de drogas. O registro da PA e FC serão realizados em animais em estado acordado. No final dos protocolos experimentais todos os animais serão sacrificados com uretana. Os protocolos experimentais estão aprovados para execução em 24 meses.

Cumprir orientar que caso pretendam-se quaisquer alterações no protocolo de pesquisa aprovado, deve-se submeter o novo protocolo à apreciação da CEUA/UEL anteriormente à execução das modificações.

Coloco-me à disposição para quaisquer esclarecimentos que se fizerem necessária. Sem mais para o momento, subscrevo, cordialmente,

Waldiceu Ap. Verri Junior
Prof. Dr. Waldiceu Aparecido Verri Junior
Coordenador da CEUA/UEL

Ilma. Sra.

Profa. Dra. Marli Cardoso Martins Pinge

Departamento de Ciências Fisiológicas

Centro de Ciências Biológicas

Com cópia para Sra Égle Maria de Sousa (Chefe da DCA/PROPPG), Diretor (a) do Centro

ANEXO B: PROTOCOLO EXPERIMENTAL DE TREINAMENTO FÍSICO DE CORRIDA EM ESTEIRA ELÉTRICA ADAPTADA PARA RATOS.

TIME COURSE								WKY	SHR
<i>1° Teste de Esforço Máximo</i>									
Semanas/Dias	Duração	Aquecimento		Endurance		Recuperação			
Semana 1	min	min	vel	50% máx (min)	60% máx (min)	min	vel		
1	17	5	0,4	7	-	5	0,4		
2	20	5	0,4	10	-	5	0,4		
3	25	5	0,4	15	-	5	0,4		
4	30	5	0,4	20	-	5	0,4		
5	30	5	0,4	15	5	5	0,4		
<i>Semana 2</i>									
6	35	5	0,4	15	10	5	0,4		
7	40	5	0,4	20	10	5	0,4		
8	40	5	0,4	20	10	5	0,4		
9	45	5	0,4	25	10	5	0,4		
10	50	5	0,4	25	15	5	0,4		
<i>Semana 3</i>									
11	40	5	0,4	20	10	5	0,4		
12	45	5	0,4	20	15	5	0,4		
13	50	5	0,4	25	15	5	0,4		
14	55	5	0,4	25	20	5	0,4		
15	60	5	0,4	20	30	5	0,4		
<i>Semana 4</i>									
16	45	5	0,4	20	15	5	0,4		
17	60	5	0,4	15	35	5	0,4		
18	60	5	0,4	10	40	5	0,4		
19	60	5	0,4	10	40	5	0,4		
<i>2° Teste de Esforço Máximo</i>									
<i>Semana 5</i>									
21	30	5	0,5	15	-	10	0,5		
22	45	5	0,5	30	-	10	0,5		
23	50	5	0,5	35	-	10	0,5		
24	55	5	0,5	40	-	10	0,5		
25	60	5	0,5	45	-	10	0,5		
<i>Semana 6</i>									
26	45	5	0,5	35	-	5	0,5		
27	60	5	0,5	45	5	5	0,5		
28	60	5	0,5	45	5	5	0,5		
29	60	5	0,5	40	10	5	0,5		
30	60	5	0,5	40	10	5	0,5		
<i>Semana 7</i>									
31	45	5	0,5	25	10	5	0,5		
32	60	5	0,5	40	10	5	0,5		
33	60	5	0,5	40	10	5	0,5		
34	60	5	0,5	35	15	5	0,5		
35	60	5	0,5	30	20	5	0,5		
<i>Semana 8</i>									
36	45	5	0,5	20	15	5	0,5		
37	60	5	0,5	30	20	5	0,5		
38	60	5	0,5	30	20	5	0,5		
39	60	5	0,5	25	25	5	0,5		
<i>3° Teste de Esforço Máximo</i>									