



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

HIVINY DE ATAIDES RAQUEL

**CARACTERIZAÇÃO DE TREINAMENTO FÍSICO POR
NATAÇÃO E PAPEL DAS ISOFORMAS DA NO-SINTASE NA
MODULAÇÃO DA ATIVIDADE GLUTAMATÉRGICA DA ÁREA
ROSTROVENTROLATERAL DO BULBO EM RATOS
SEDENTÁRIOS E TREINADOS**

HIVINY DE ATAIDES RAQUEL

**CARACTERIZAÇÃO DE TREINAMENTO FÍSICO POR
NATAÇÃO E PAPEL DAS ISOFORMAS DA NO-SINTASE NA
MODULAÇÃO DA ATIVIDADE GLUTAMATÉRGICA DA ÁREA
ROSTROVENTROLATERAL DO BULBO EM RATOS
SEDENTÁRIOS E TREINADOS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para sua conclusão.

Orientadora: Prof. Dra. Marli Cardoso Martins Pinge

Co-orientadora: Prof. Dra. Lisete Compagno Michelini

Londrina
2013.

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina.**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

R221c Raquel, Hiviny de Ataidés.
Caracterização de treinamento físico por natação e papel das isoformas da No-Sintase na modulação da atividade glutamatérgica da área rostroventrolateral do bulbo em ratos sedentários e treinados / Hiviny de Ataidés Raquel. – Londrina, 2013.
78 f. : il.

Orientador: Marli Cardoso Martins Pingé.
Coorientador: Lisete Compagno Michelini.
Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, 2013.
Inclui bibliografia.

1. Exercícios físicos – Aspectos fisiológicos – Teses. 2. Natação – Teses. 3. Sistema cardiovascular – Teses. 4. Pressão arterial – Teses. 5. Óxido nítrico – Teses. 6. Rato como animal de laboratório – Teses. I. Pingé, 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. Sociedade Brasileira de Fisiologia. V. Título.

CDU 612.1:796

HIVINY DE ATAIDES RAQUEL

**CARACTERIZAÇÃO DE TREINAMENTO FÍSICO POR NATAÇÃO E
PAPEL DAS ISOFORMAS DA NO-SINTASE NA MODULAÇÃO DA
ATIVIDADE GLUTAMATÉRGICA DA ÁREA
ROSTROVENTROLATERAL DO BULBO EM RATOS SEDENTÁRIOS E
TREINADOS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para sua conclusão.

BANCA EXAMINADORA

Profa.Dra. Marli Cardoso Martins Pinge
UEL – Londrina – PR

Prof. Dr. Vagner Roberto Antunes
USP – Butantã – SP

Profa. Dra. Graziela Scialanti Ceravolo
UEL – Londrina – PR

Londrina, ____ de _____ de 2013.

**Dedico este trabalho á minha família
a qual sempre me incentivou aos estudos e
compreendeu minha ausência e dedicação.**

AGRADECIMENTOS

Durante o período do mestrado várias pessoas acreditaram que este sonho poderia tornar-se realidade e de diversas formas me estimularam a alcançar este objetivo. A todas estas pessoas dedico aqui os meus sinceros agradecimentos.

Agradeço a minha família pelo apoio e principalmente meus pais, estes que me ensinaram a experimentar com dignidade a vida que me deram. Sou grata pelo carinho, dedicação e pelos sacrifícios que fizeram por mim. Minha irmã também merece minha gratidão por ter sido minha parceira e conselheira em tantos momentos de reflexão e dúvida.

Á todos os amigos e amigas que mesmo sem entender do que se tratavam meus estudos ou sem saber o que eu tanto fazia no laboratório, mesmo assim me incentivavam a buscar minha meta profissional contribuindo para realização deste sonho; obrigada.

Sou grata aos colegas, docentes e funcionários do departamento de Ciências Fisiológicas e a coordenação do Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da UEL e do ICB I da USP-SP e pela colaboração, direta ou indireta, de todos.

Em especial, agradeço a professora Lisete Compagno Michelini, minha co-orientadora, que não mediu esforços para tornar este trabalho mais brilhante.

Não poderia concluir sem dar graças a pessoa que abriu as portas da ciência para mim: minha orientadora, professora Marli Cardoso Martins Pinge. Para esta que sempre me ajudou e contribuiu para o meu crescimento profissional e pessoal, que sempre acreditou no meu potencial, que me incentivou a pesquisar e que, com responsabilidade e prazer colaborou para o aperfeiçoamento da nossa obra, eu deixo registrado aqui meu sentimento mais sincero de gratidão.

Concluo, finalmente, que sabedoria consiste em compreender que o tempo dedicado ao trabalho não é perdido e que não se alcança grandes obras sozinha. Portanto, agradeço a todos que iluminaram meu caminho.

Hiviny de Ataides Raquel

“E no meio da dificuldade, encontra-se a oportunidade”...

Albert Einstein

RAQUEL, Hiviny de Ataides. **Caracterização de treinamento físico por natação e papel das isoformas da No-Sintase na modulação da atividade glutamatérgica da área Rostroventrolateral do Bulbo em ratos sedentários e treinados.** Dissertação de mestrado. Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas. Centro de Ciências Biológicas. Departamento de Ciências Fisiológicas. Universidade Estadual de Londrina, 2013.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi caracterizar um modelo de treinamento físico para ratos, usando parâmetros bioquímicos e composição corporal, e analisar a participação do óxido nítrico (NO) na neurotransmissão glutamatérgica da área rostroventrolateral do Bulbo (RVLM) em ratos sedentários e treinados. Foram utilizados dois grupos de ratos Wistar; treinados (GTr) e sedentários (Gsed), ambos com peso inicial de 220 a 250g. O protocolo de treinamento consistiu de 20 sessões de natação (1 hora/dia; 5 dias/semana). Em seguida as gorduras viscerais, glândulas adrenais, músculo sóleo e coração foram removidos e pesados. Ainda foram avaliados, em amostras de sangue, os níveis plasmáticos de corticosterona, lactato e glicemia. Também foi estimado o índice de massa corporal dos ratos. Depois da última sessão de natação foi feito teste baroreflexo com doses crescentes de fenilefrina e nitroprussiato de sódio. Foram implantadas cânulas-guia direcionadas a RVLM em ratos aleatórios dos dois grupos e após 3 dias de recuperação foram implantadas cânulas na artéria e veia femoral para registro direto da pressão arterial (PA) e frequência cardíaca (FC). Foram microinjetadas as seguintes drogas na RVLM durante o registro: L-glutamato (5nmol/100nL), Carboxy-PTIO (scavenger de NO, 1nm/100nL), Dea NONOate (doador de NO, 50nmol/100nL), Nw-Propyl-L-Arginina (inibidor da nNOS, 4nm/100nL), L-NAME (inibidor não seletivo da NOS 15nm/100nL) e 1400W (inibidor da iNOS 2nm/100nL). Foi avaliada a expressão gênica da iNOS, eNOS e nNOS (por real time qPCR). Foi observado menor valor de massa corporal e gordura visceral em ratos do Gtr. Já os níveis plasmáticos de corticosterona, peso relativo das glândulas adrenais e músculo sóleo permaneceram inalterados. Foi observado menor nível plasmático de lactato no Gtr, logo após a natação e em repouso, e aumento da glicemia apenas após a última sessão. Ainda se observou no Gtr um maior peso relativo do coração, maior ganho baroreflexo e bradicardia de repouso. Antes da microinjeção de Carboxy-PTIO, Nw-Propyl-L-Arginina, L-NAME e 1400W, a microinjeção de L-glutamato gerou menor variação pressórica no Gtr, mas após a microinjeção das drogas não houve diferença entre grupos. A microinjeção de doador de NO causou maior aumento da PAM no Gtr. Também se observou menor expressão gênica para a enzima eNOS no Gtr. Nossos dados indicam validade do protocolo proposto em relação à promoção de alterações benéficas ao organismo (nos parâmetros bioquímicos e de composição corporal) e ainda parece indicar que a natação favorece o controle cardiovascular por modulação da neurotransmissão glutamatérgica da RVLM através do NO.

Palavras-chave: Natação. Composição corporal. Baroreflexo. Bulbo rostroventrolateral. Pressão arterial. Óxido nítrico.

Raquel, Hiviny de Ataides. **Characterization of physical training through swimming and role of NO-Sintase isoforms in glutamatergic modulation of rostroventrolateral medulla in sedentary and trained rats.** Master dissertation. Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas. Centro de Ciências Biológicas. Departamento de Ciências Fisiológicas. Universidade Estadual de Londrina, 2013.

ABSTRACT

The objective of this study was to characterize a model of physical training for rats using biochemical parameters and body composition and analyzes the participation of the nitric oxide (NO) on glutamatergic neurotransmission in the rostroventrolateral medulla (RVLM) of sedentary and trained rats. Two groups of Wistar rats were used; trained (Gtr) and sedentary (Gsed), both with initial weight at 220 to 250g. The training protocol consisted of 20 sessions of swimming (1 hour/day; 5 days/week). After that the visceral fat, adrenal glands, soleus muscle and heart were removed and weighted. In addition the plasmatic levels of corticosterone, lactate and glycemia were evaluated from blood samples. Moreover the index of the rats' body mass was estimated. After the last swimming session a baroreflex test was conducted with increasing doses of fenylefrine and sodium nitroprussiate. Guide-cannulas were implanted aiming the RVLM in random rats from the groups and, after 3 days of recovery, cannulas were implanted in the femoral artery and vein for direct register of blood pressure (BP) and heart rate (HR). The following drugs were microinjected: L-glutamate (5nmol/100nL), Carboxy-PTIO (NO scavenger, 1nm/100nL), Dea NONOate (NO donor, 50nmol/100nL), Nw-Propyl-L-Arginine (nNOS inhibitor, 4nm/100nL), L-NAME (non-selective NOS inhibitor 15nm/100nL) e 1400W (iNOS inhibitor 2nm/100nL). Gene expression of iNOS, eNOS and nNOS was evaluated (by real time qPCR). A lesser body mass and visceral fat was observed in Gtr rats. However the plasma levels of corticosterone, relative weight of adrenal glands and soleus muscle remained unaltered. A smaller lactate plasma level on Gtr was noticed, right after swimming and at rest, and an increase in glycemia only after the last session. On Gtr a higher relative weight of the heart, baroreflex gain and rest bradycardia was observed. Before the microinjection of Carboxy-PTIO, Nw-Propyl-L-Arginina, L-NAME e 1400W, L-glutamate microinjection generated a slighter pressure variation on Gtr, but after the microinjection of these drugs there was no difference between groups. The microinjection of NO donor caused greater increase of BP in Gtr. A lesser gene expression for the eNOS enzyme on Gtr was also observed. Our data indicate the protocol validity on promoting benefic alterations on organism (biochemical and body composition parameters) and also indicate that swimming favors cardiovascular control through modulation of glutamatergic neurotransmission of RVLM through NO.

Keywords: Swimming. Body composition. Baroreflex. Rostroventrolateral medulla. Blood pressure. Nitric oxide.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Ganho de Peso Corporal durante o período de Sedentarismo e Treinamento.....	33
Figura 2 – Concentração plasmática de lactato e glicose de ratos Wistar sedentários, treinados em repouso e treinados após última sessão de natação. Concentração plasmática de corticosterona de ratos Wistar sedentários e treinados em repouso.....	36
Figura 3 – Valores de Pressão Arterial Média e Frequência Cardíaca em repouso de animais controles sedentários e treinados não anestesiados.....	37
Figura 4 – Curvas de variação da Pressão Arterial Média e Frequência Cardíaca durante o teste de baroreflexo. Curvas de Ganho da Sensibilidade Baroreflexa. Valores de Pressão Arterial Média	38
Figura 5 – Mapa da superfície ventral do Bulbo com localização bilateral da área RVLM.....	39
Figura 6 – Corte histológico e diagrama da região bulbar com a marcação do sítio central de injeção na RVLM	39
Figura 7 – Alterações da PAM induzidas por microinjeção unilateral de L-glutamato antes e depois da microinjeção de salina 0,9% estéril na RVLM.....	40
Figura 8 – Alterações da PAM induzidas por microinjeção unilateral de L-glutamato antes e depois da microinjeção de Carboxy-Ptio na RVLM.....	41
Figura 9 – Alterações da PAM induzidas por microinjeção unilateral de Dea-NONOate na RVLM de ratos sedentários e treinados	42
Figura 10 – Alterações da PAM induzidas por microinjeção unilateral de L-glutamato antes e depois da microinjeção de L-NAME na RVLM de ratos sedentários e treinados.....	43
Figura 11 – Alterações da PAM induzidas por microinjeção unilateral de L-glutamato antes e depois da microinjeção de n-Propyl na RVLM de ratos sedentários e treinados.....	44

Figura 12 – Alterações da PAM induzidas por microinjeção unilateral de L-glutamato antes e depois da microinjeção de 1400W na RVLM de ratos sedentários e treinados.....	45
Figura 13 – Expressão gênica das isoformas da NOS na RVLM de ratos sedentários e treinados.....	48
Figura 14 – Co-relação dos valores de expressão gênica das isoformas da NOS com os valores de FC basal de ratos sedentários e treinados.....	49

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Variáveis de composição corporal. Peso relativo de gorduras viscerais, coração, músculo Sóleo e glândulas Adrenais; Índice de Lee e Distância Naso-anal.....34
- Tabela 2** – Valores das alterações de FC durante microinjeção de L-glutamato antes e depois da salina ou das drogas moduladoras do NO em animais sedentários46
- Tabela 3** – Valores das alterações de FC durante microinjeção de L-glutamato antes e depois da salina ou das drogas moduladoras do NO em animais treinados46
- Tabela 4** – Valores das alterações de FC durante microinjeção de doador de NO em animais sedentários e treinados47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CVLM	Bulbo ventrolateral caudal
DC	débito cardíaco
eNOS	Óxido Nítrico Sintase Endotelial
FC	freqüência cardíaca
Gsed	grupo sedentário
Gtr	grupo treinado
IML	Coluna intermédio lateral da medula espinhal
iNOS	Óxido Nítrico Sintase Induzível
NA	Núcleo Ambíguo
NO	Óxido Nítrico
NOS	Óxido Nítrico Sintase
nNOS	Óxido Nítrico Sintase Neuronal
NTS	Núcleo Trato Solitário
PA	pressão arterial
PAM	pressão arterial média
PAS	pressão arterial sistólica
PVN	Núcleo Paraventricular do Hipotálamo
ANSL	atividade nervosa simpática lombar
ANSR	atividade nervosa simpática renal
RT – qPCR	método quantitativo de reação em cadeia da polimerase em tempo real
RVLM	área rostroventrolateral do Bulbo
RVP	resistência vascular periférica
SNA	sistema nervoso autônomo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	TREINAMENTO FÍSICO: ALTERAÇÕES METABÓLICAS E DE COMPOSIÇÃO CORPORAL	14
1.2	TREINAMENTO FÍSICO: ALTERAÇÕES CARDIOVASCULARES	16
1.3	TREINAMENTO FÍSICO: MODULAÇÃO AUTONÔMICA CARDIOVASCULAR	17
1.4	TREINAMENTO FÍSICO: ÁREA RVLM E NEUROTRANSMISSÃO GLUTAMATÉRGICA.....	18
1.5	TREINAMENTO FÍSICO: SÍNTESE DE NO.....	19
2	JUSTIFICATIVA	23
3	OBJETIVOS	24
4	MÉTODOS	25
4.1	CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA.....	25
4.2	PROTOCOLO DE TREINAMENTO FÍSICO.....	25
4.3	ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO CORPORAL E BIOQUÍMICA	26
4.3.1	Composição Corporal.....	26
4.3.2	Coleta de Sangue.....	26
4.3.3	Análises Bioquímicas.....	27
4.4	ANÁLISE DOS PARÂMETROS CARDIOVASCULARES.....	28
4.4.1	Implante de Cânulas-guia na RVLM.....	28
4.4.2	Cateterização e Registro Cardiovascular	28
4.4.3	Microinjeção de Drogas na área RVLM.....	29
4.4.4	Protocolos Experimentais de Microinjeção de Drogas na Área RVLM	29
4.5	HISTOLOGIA DA RVLM	30
4.6	ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DA ÁREA RVLM	31
4.7	GANHO BAROREFLEXO	32
4.8	ANÁLISE DOS RESULTADOS.....	32
5	RESULTADOS	33
5.1	COMPOSIÇÃO CORPORAL	33

5.2	PARÂMETROS METABÓLICOS: ANÁLISES BIOQUÍMICAS	35
5.3	PARÂMETROS CARDIOVASCULARES	37
5.4	EXPRESSÃO GÊNICA DAS ISOFORMAS DE NOS NA ÁREA RVLM.....	47
6	DISCUSSÃO	50
7	CONCLUSÃO	57
	REFERÊNCIAS	58
	ANEXOS	66
	ANEXO A – Biochemical characterization and body composition of a model of physical training by swimming in rats.....	67

1 INTRODUÇÃO

O exercício físico caracteriza-se por uma situação que retira o organismo de sua homeostase o que implica em diversas adaptações fisiológicas especialmente do sistema cardiovascular (Brum et al, 2004) e do metabolismo (Afonso et al, 2003) para a manutenção energética durante e após o esforço. O aumento do débito cardíaco (DC), frequência cardíaca (FC) (Negrão et al, 1992) e atividade simpática (Mitchell; Victor, 1996) são alguns exemplos de adaptações agudas acionadas para suprir a nova demanda metabólica.

O treinamento aeróbio de baixa intensidade promove também alterações crônicas em parâmetros metabólicos por mobilização de substratos energéticos e modificação da composição corporal, por isso, diversos protocolos de exercício têm sido aplicados em animais para tentar esclarecer os mecanismos pelos quais o treinamento físico provoca tais alterações no organismo (Afonso et al., 2003).

Além disso, o exercício físico é capaz de contribuir para um estado cardiovascular favorável por induzir adaptações em sítios centrais responsáveis pelo controle autonômico da pressão arterial (PA) em especial, na porção simpática (Martins-Pinge, 2011). Sendo assim, a área rostroventrolateral do bulbo (RVLM) que é considerada a principal eferência simpática para o controle cardiovascular pode ser um potente alvo para o treinamento físico exercer sua ação modulatória nas funções autonômicas (Dampney, 1994; Mitchell; Victor, 1996). Somado a isso, é possível também que o óxido nítrico (NO) tenha um papel funcional nos neurônios da RVLM tendo em vista que essa molécula é capaz de agir a nível sináptico como neuromodulador (Dun et al., 1994).

1.1 TREINAMENTO FÍSICO: ALTERAÇÕES METABÓLICAS E DE COMPOSIÇÃO CORPORAL

A melhora de parâmetros metabólicos como glicose e lactato e de composição corporal como tecido adiposo são alguns dos diversos efeitos benéficos promovidos ao organismo através da prática de exercício físico. Assim, o treinamento aeróbio de baixa intensidade, tem-se demonstrado forte aliado no tratamento de doenças crônico-degenerativas como hipertensão arterial (Véras-Silva

et al., 1997), diabetes mellitus (Rodrigues et al., 2012), obesidade (Trombetta et al., 2003) e insuficiência cardíaca (Krieger et al., 2001).

Nas últimas décadas, diversos estudos têm sugerido protocolos de exercício físico aeróbio para ratos na tentativa de evidenciar os diferentes mecanismos pelos quais o treinamento físico provoca as alterações no organismo e como isso melhora as condições de sobrevivência e capacidade física dos animais. A natação tem sido importante ferramenta metodológica para investigar alterações de composição corporal, metabolismo energético, funções cardiovasculares e respiratórias nos animais, pois, apresenta-se como uma intervenção eficiente sobre os diferentes parâmetros fisiológicos (Afonso et al., 2003; Brum et al., 2004; Cox et al., 1985).

Em relação aos efeitos hormonais e bioquímicos advindos do treinamento de natação, têm sido relatadas por diversos autores alterações em parâmetros plasmáticos de corticosterona e lactato. Sabe-se, que uma única sessão de exercício é capaz de promover ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenais e provocar um efeito estressor com aumento na liberação de corticosterona e lactato (Afonso et al., 2003). Apesar disto, no estudo de Cox e colaboradores (1985) foi observado que animais sedentários comparados aos treinados apresentaram maiores níveis de lactato e corticosterona quando submetidos a um teste único de natação por 20 minutos. Isso evidencia, portanto, que o treinamento prévio é capaz de promover uma resposta adaptativa para os animais em relação à estimulação simpato-adrenal.

A comparação de aspectos relacionados à composição corporal entre animais sedentários e treinados também tem sido observada por alguns autores (Wilterdink et al., 1993; Speretta et al., 2012), sendo assim, ratos que nadam diariamente têm demonstrado menor ganho de peso corporal e tecido adiposo quando comparados a animais sedentários.

Por outro lado, considerando as alterações de composição corporal, podemos citar ainda as alterações na hipertrofia cardíaca provocada pela prática do treinamento de natação (Medeiros et al., 2004). Tal alteração fisiológica ocorre principalmente pelo aumento do volume sanguíneo e força contrátil do coração durante o exercício para manter a demanda metabólica durante o esforço e este efeito crônico é denominado hipertrofia cardíaca excêntrica, o qual está associado com uma melhora do desempenho durante o exercício.

Além disso, dados da literatura (Irigoyen et al., 2003) sugerem que a prática de exercício físico tem sido útil para promover reabilitação alterando as variáveis metabólicas e de composição corporal em diversos casos de doenças degenerativas, como a obesidade e a hipertensão.

1.2 TREINAMENTO FÍSICO: ALTERAÇÕES CARDIOVASCULARES

O exercício físico provoca uma série de respostas fisiológicas nos sistemas corporais e, em especial, no cardiovascular. Os efeitos fisiológicos do exercício físico no sistema cardiovascular podem ser classificados em: agudos imediatos, agudos tardios ou crônicos. Os efeitos agudos são os que acontecem em associação direta com a sessão de treinamento e ocorrem nos períodos peri e pós- imediato do exercício, como elevação da FC (Silverthorn, 2003). Os efeitos agudos tardios acontecem ao longo das primeiras 24 ou 48 horas após a sessão de exercício e podem ser identificados através da discreta redução dos níveis tensionais, em especial nos hipertensos, por uma melhora da função endotelial (Brum et al., 2004). Já os efeitos crônicos são considerados adaptações, as quais resultam da exposição freqüente às sessões de exercícios e apresenta aspectos morfofuncionais que diferenciam indivíduos fisicamente treinados de sedentários. Como exemplos têm-se a bradicardia relativa de repouso, hipertrofia ventricular esquerda fisiológica e angiogênese por aumento do fluxo sanguíneo para músculos esquelético e cardíaco (Araújo, 2001).

O exercício físico realizado regularmente provoca outras importantes adaptações como alterações autonômicas e hemodinâmicas as quais, também influenciam o sistema cardiovascular (Rondon; Brum, 2003). Com o objetivo de manter a homeostasia celular diante do incremento das demandas metabólicas há aumento do DC sendo que a PA sistólica (PAS) aumenta diretamente na proporção do aumento do DC para fazer a redistribuição do fluxo sanguíneo e elevação da perfusão circulatória para os músculos em atividade (Araújo, 2001). No momento do exercício aeróbio há também uma leve diminuição na PA diastólica (PAD) devido a diminuição da resistência vascular periférica (RVP) e concomitantemente há um aumento da atividade simpática que permite vasoconstrição em tecidos não exercitados compensando a vasodilatação do músculo esquelético que está em atividade (De Mello Aires, 2008).

O treinamento físico por natação parece promover estes e outros efeitos benéficos ao sistema cardiovascular. Através da modificação do balanço autonômico da FC há um aumento do componente parassimpático e diminuição do simpático (de Abreu et al., 2009) e isto pode, em parte, ser responsável pela bradicardia de repouso observada após treinamento físico. Além disso, deve-se considerar também que associado aos mecanismos hemodinâmicos envolvidos na hipotensão pós-exercício em hipertensos (Silva et al., 1997) tem-se as alterações na sensibilidade barorreflexa que após exercício físico podem influenciar no controle da PA na fase de recuperação (Brum et al., 2004; Medeiros et al., 2004; Sant'Ana et al., 2011).

Atualmente também parece ser consenso que o exercício físico de baixa intensidade e aeróbico induz adaptações em sítios centrais que controlam o sistema cardiovascular, e que tanto as alterações agudas como crônicas promovidas pelo exercício físico parecem contribuir para o melhor funcionamento do sistema cardiovascular, seja nos componentes hemodinâmicos como nos autonômicos (Ichiyama et al., 2002; Becker et al., 2005; Martins-Pinge et al., 2005; Mueller, 2007; Michelini, Stern, 2009; De Abreu et al., 2009; Martins-Pinge, 2011).

1.3 TREINAMENTO FÍSICO: MODULAÇÃO AUTONÔMICA CARDIOVASCULAR

A manutenção da PA dentro de valores considerados normais é regulada momento-momento e depende do DC e RVP. Diferentes mecanismos atuam na regulação dos vasos sanguíneos (tônus vascular) e DC, mas o sistema nervoso autônomo (SNA) tem papel fundamental neste controle, pois, participa de forma tônica e reflexa no controle cardiovascular, atuando na manutenção da homeostase tanto em situações de repouso como em exercício (Negrão et al., 1993; Dicarlo, Bishop, 1990).

Já está bem estabelecido na literatura que áreas específicas do SNC estão envolvidas no controle cardiovascular, tendo sua atividade alterada em resposta a uma única sessão de exercício (Ichiyama et al., 2002). Dentre as áreas envolvidas com as adaptações cardiovasculares ao exercício podemos citar: a RVLN (Martins-pinge et al., 2005, Muller, 2007), o Núcleo Trato Solitário (NTS) (De Souza et al., 2001; Michelini & Stern, 2009) e o núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) (de Abreu et al., 2009, Michelini & Stern, 2009, Mastelari et al., 2011).

Dentre as áreas citadas, o tônus simpático do sistema cardiovascular é gerado principalmente pela área RVLM e PVN, que enviam projeções excitatórias para neurônios pré-ganglionares simpáticos localizados na coluna intermediolateral da medula espinhal (IML) (Dampney, 1994). Os centros responsáveis pela manutenção e controle do tônus cardiovascular atuam basicamente através de mecanismos reflexos como: o baroreflexo, o quimio-reflexo e o reflexo cardiopulmonar (Dampney, 1994). As terminações das fibras aferentes dos reflexos cardiovasculares estão localizadas principalmente: no núcleo do trato solitário (NTS), cujos neurônios se projetam para as áreas do bulbo ventrolateral caudal (CVLM) e rostral (RVLM) (Dampney, 1994). Juntas, essas áreas contribuem para a manutenção da PA e FC seja em repouso, exercício ou durante a ativação de reflexos cardiovasculares (Dampney, 1994).

As modificações promovidas pela prática regular de atividade física parecem estar diretamente relacionadas com a modulação da porção simpática do SNA (Mitchell & Victor, 1996). Sendo assim, a área RVLM, que é considerada a principal eferência simpática para o controle cardiovascular e que é capaz de controlar também funções autonômicas pode ser diretamente modulada através da prática de exercício físico (Dampney, 1994). Apesar disto, apenas poucos trabalhos avaliaram as alterações funcionais da RVLM em ratos submetidos previamente a treinamento físico (Becker et al., 2005; Martins-Pinge et al., 2005; Mueller, 2007).

1.4 TREINAMENTO FÍSICO: ÁREA RVLM E NEUROTRANSMISSÃO GLUTAMATÉRGICA

A importância da área RVLM no controle do sistema cardiovascular já está bem estabelecida (Dampney, 1994; Guertzenstein, Silver, 1974; McAllen et al., 1982, Reis et al., 1994). Na área RVLM, os neurônios pré-motores são responsáveis pela condução do tônus excitatório para neurônios pré-ganglionares simpáticos localizados na IML e nesta sinalização neural, o glutamato parece ser um importante neurotransmissor (Guertzenstein; Silver, 1974; Dampney, 1994). A microinjeção de L-glutamato na RVLM de ratos anestesiados (Bachelard et al., 1990) ou acordados (Martins-Pinge et al, 2005) produz aumento de PA e bradicardia, sendo que o aumento da PA acontece devido à ativação de uma área que é considerada simpática, a RVLM, e a bradicardia é uma resposta reflexa do controle autonômico para tentar normalizar os valores de PA. Alguns estudos têm relatado

um papel importante para o glutamato na RVLM durante contrações musculares estáticas (Lillaney et al., 1999, Caringi et al., 1998; Ishide et al., 2000), pois a liberação deste neurotransmissor parece estar diretamente envolvida no reflexo pressórico ao exercício (Ally, 1998).

Dados evidenciaram uma menor resposta pressora ao L-glutamato na RVLM de ratos acordados e submetidos previamente ao protocolo de natação, e esta resposta provavelmente aconteceu devido ao *down-regulation* dos receptores de glutamato por exposição crônica a este neurotransmissor na área RVLM (Martins-Pinge et al., 2005). Somado a isso, um estudo evidenciou (Mueller, 2007) que durante a estimulação de neurônios glutamatérgicos da RVLM, animais sedentários apresentaram maior atividade nervosa simpática lombar (ANSL) quando comparados aos treinados, corroborando assim, com as evidências anteriores sobre a menor simpatoexcitação da RVLM em animais treinados.

Portanto, considerando os centros cardiovasculares do SNA, em especial, a RVLM que controla a saída do tônus simpatoexcitatório e participa do reflexo pressórico ao exercício através da liberação de glutamato; o treinamento físico que parece causar alterações neuronais e influenciar nas respostas autonômicas cardiovasculares (DiCarlo, Bishop, 1990, Mack et al., 1991, Negrão et al., 1993, Raven, Pawelczyk, 1993, Chen, DiCarlo, 1996), é possível que o glutamato como neurotransmissor excitatório durante reflexos cardiovasculares (Talman et al., 1980; Kiely, Gordon, 1994; Mitchell et al., 1983; Ishide et al., 2000), seja um dos principais alvos dessa modulação.

1.5 TREINAMENTO FÍSICO: SÍNTESE DE NO

O exercício físico regular é conhecido por promover melhora na função endotelial e isso favorece alterações positivas ao sistema cardiovascular. Diversos mecanismos estão envolvidos na síntese de NO através da atividade física, especialmente, pelo aumento do fluxo de sangue por “estresse de cisalhamento” que resulta em aumentada produção e biodisponibilidade de NO pelo endotélio vascular (Di Francescomarino et al., 2009).

O NO é um radical produzido a partir da L-arginina, por uma reação mediada pela enzima NO-sintase (NOS) (Knowles et al., 1990). Ele pode ser produzido por distintas isoformas da enzima NOS. O tipo I da NOS conhecida como

nNOS (neuronal) é encontrada nos 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, Thiernemann, 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).

Foi comprovado que o NO tem um papel funcional nos neurônios da RVLM no controle cardio-circulatório, já que neurônios que expressam NOS foram encontrados na RVLM (Dun et al., 1994). Entretanto, existe controvérsia a respeito dos efeitos do NO nessa área do bulbo. Alguns investigadores descreveram aumentos na PA com a administração de L-arginina e doadores de NO (Hirooka et al., 1996; Martins-Pinge et al., 1997), enquanto outros obtiveram decréscimos (Shapoval et al., 1991; Zanzinger et al., 1995; Tseng et al., 1996; Kagiya et al., 1997). É possível que esses efeitos contraditórios estejam embasados nas diferentes concentrações utilizadas pelos pesquisadores. Enquanto, altas doses de NO na RVLM levam a quedas na PA, doses menores produzem aumentos (Morimoto et al., 2000). Huang e colaboradores (2003) constataram que altas concentrações de SIN-1, um doador de NO, parece inibir a liberação pré-sináptica de glutamato através da formação de peroxinitrito, o que por sua vez atuaria liberando adenosina para ativar seus receptores pré-sinápticos. No entanto, o NO demonstra ter papel fundamental nos efeitos pós-sinápticos do glutamato na RVLM, já que inibidores da guanilato ciclase inibiram quase completamente o aumento da PA produzido pela microinjeção de glutamato nessa área (Martins-Pinge et al., 1999).

Um estudo (Chan et al., 2001) evidenciou a existência de RNAm para a nNOS e iNOS na RVLM, as quais, em condições fisiológicas são capazes de ativar a síntese e expressão molecular de NO. Nesse estudo também foi sugerido que em situações fisiológicas parece existir uma prevalência da atividade da nNOS sobre a iNOS, associando uma dominância simpatoexcitatória sobre a simpatoinibição para a manutenção do tônus simpático pela área RVLM. Foi observado também, que bloqueadores específicos da nNOS na RVLM promovem redução na PA e no tônus simpático, enquanto inibidores da iNOS induzem o

aumento desses parâmetros (Chan et al., 2001). Em animais anestesiados demonstrou-se que o NO derivado da nNOS induziu simpatoexcitação via receptores ionotrópicos para o glutamato na RVLM e que o NO derivado da iNOS media seus efeitos via GABA (Chan et al. 2003). Os achados sobre os efeitos diferenciais do NO pelas isoformas nNOS e iNOS na excitação e inibição da RVLM foram corroborados em estudo com ratos acordados (Martins-Pinge et al., 2007).

Pesquisadores têm utilizado um método interessante para analisar os efeitos do reflexo pressórico ao exercício: a contração muscular estática. Ela é promovida por estimulação de nervos periféricos (Nervo Ciático) e é considerada uma contração muscular sem realização de movimento. A literatura mostrou que antagonistas da nNOS (Ishide et al, 2003; Ally, et al., 2007) na RVLM potencializaram os efeitos pressóricos, através da liberação de glutamato, durante a contração muscular estática em ratos anestesiados. Em outro estudo do mesmo grupo observou-se que após o bloqueio da iNOS com aminoguanidina, a resposta pressora devido a contração muscular estática foi atenuada, assim como o aumento da FC e os níveis de glutamato na RVLM (Ally et al., 2006). Juntos, esses resultados sugerem que durante o reflexo pressórico ao exercício, a nNOS diminui a simpatoexcitação por inibição da via glutamatérgica sendo que a iNOS parece atuar produzindo efeitos contrários. No entanto, nenhum trabalho mostrou a influência do NO na RVLM após treinamento físico.

Outro grupo mostrou que a super expressão de eNOS (por vetores AdeNOS) na RVLM diminuiu a PA, FC e atividade nervosa simpática renal (ANSR) tanto em ratos normotensos conscientes (Kishi et al., 2001) como em hipertensos (Kishi et al., 2002), sendo que, estas respostas foram mediadas por liberação de GABA na RVLM. Neste mesmo sentido, outro trabalho sugere que o aumento na produção de NO na RVLM parece promover maior inibição simpática para o coração, assim como, melhor ganho baroreflexo em ratos hipertensos (Kishi, et al., 2003). Em contrapartida, a microinjeção de antagonista seletivo da eNOS na RVLM potencializou as respostas cardiovasculares através do aumento dos níveis de glutamato e diminuição de GABA durante a contração muscular em ratos anestesiados (Ishide et al., 2005).

Contudo, existem ainda evidências indicando que durante o treinamento físico aeróbico há aumento na produção periférica de NO devido ao aumento do fluxo durante o exercício, efeito este denominado “estresse de

cisalhamento” o qual, associado às sessões repetidas de exercício estimula a produção de NO e conseqüente vasodilatação (Green et al., 2004; McAllister, Laughlin, 2006). Apesar disto, os efeitos do NO dentro do SNC bem como seus potenciais efeitos no controle neural da circulação após treinamento físico, ainda não foram avaliados.

2 JUSTIFICATIVA

Considerando a importância do exercício físico para a promoção da saúde através de alterações metabólicas e de composição corporal, bem como diminuição da frequência cardíaca e da pressão arterial em hipertensos; das evidências a cerca da aumentada produção periférica de NO pelo exercício; da conhecida participação do glutamato liberado na RVLM durante o reflexo pressor do exercício; da também conhecida relação do NO com as sinapses glutamatérgicas no sistema nervoso central assim como o conhecimento dos efeitos atenuados na resposta pressora ao glutamato em animais submetidos a um treinamento físico por natação, pretende-se com esse estudo esclarecer os efeitos do treinamento por natação em parâmetros metabólicos e de composição corporal, além de melhor elucidar as alterações funcionais do NO sobre a resposta cardiovascular ao glutamato na RVLM, bem como avaliar a expressão gênica das isoformas da NOS na RVLM de animais conscientes sedentários e treinados.

3 OBJETIVOS

Os objetivos do presente estudo foram:

1. Caracterizar o modelo de treinamento físico de natação para ratos Wistar através da análise de parâmetros bioquímicos e de composição corporal;
2. Analisar a sensibilidade barorreflexa em animais acordados sedentários e treinados;
3. Avaliar os efeitos funcionais do NO e da inibição do NO sobre a resposta cardiovascular ao glutamato na RVLM de ratos acordados sedentários ou treinados;
4. Analisar a expressão gênica das isoformas da NOS na RVLM de animais sedentários e treinados.

4 MÉTODOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

Foram utilizados ratos Wistar (n=196), adultos, com peso entre 220-240g (início treinamento), provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Londrina, Brasil. Os animais foram divididos aleatoriamente em caixas e alojados em uma sala silenciosa, com temperatura de $21\pm 1^{\circ}\text{C}$, ciclo claro escuro de 12/12horas e com água e ração oferecidas “*ad libitum*”. Todos os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética da Universidade Estadual de Londrina, Brasil (processo número: 35247.2011.45).

4.2 PROTOCOLO DE TREINAMENTO FÍSICO

Os animais utilizados foram divididos aleatoriamente em grupos sedentários (Gsed) ou treinados (Gtr) sendo que os animais do Gsed não foram submetidos ao protocolo de exercício físico, enquanto os do Gtr realizaram treinamento físico espontâneo de natação sem estímulos ou cargas.

O treinamento proposto aos animais foi a natação realizado de acordo com trabalho prévio do grupo (Martins-Pinge et al., 2005).

As sessões de natação foram realizadas no período matutino (entre 11:00h e 13:00h), em um tanque de vidro, com 4000cm^2 de área de superfície e 60 cm de profundidade, com água aquecida a $31\pm 1^{\circ}\text{C}$. O protocolo de treinamento consistiu em 4 semanas (20 sessões) de natação sendo realizado 5 vezes por semana e 60 minutos por dia. Durante a primeira semana, os animais foram submetidos a uma fase de adaptação ao treinamento físico, onde nadaram 15 minutos no primeiro dia, 30 minutos no segundo dia e 45 minutos no terceiro dia. A partir do quarto dia, cada sessão consistiu em 60 minutos de treinamento físico.

4.3 ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO CORPORAL E BIOQUÍMICA

4.3.1 Composição Corporal

O peso corporal dos animais foi avaliado desde o primeiro dia quando chegaram do Biotério Central da Universidade Estadual de Londrina, até o último dia de protocolo experimental. O peso corporal era avaliado antes do treinamento físico, através de uma balança digital e anotado em uma planilha de dados para posterior análise da curva de crescimento e ganho de peso. O peso corporal dos animais sedentários também foi avaliado diariamente.

O índice de massa corporal para ratos foi estimado pelo cálculo do Índice de Lee [$\sqrt[3]{\text{peso corporal} / \text{distância naso-anal} \times 1000}$] e a obtenção do comprimento naso-anal foi mensurado por fita métrica, no momento final do experimento, antes da coleta dos seguintes tecidos: gordura visceral e gonadal; músculo sóleo, glândulas adrenais, e coração. O peso absoluto dos tecidos foi normalizado em (Peso Relativo= peso absoluto do tecido / peso corporal x 100) para as análises dos dados.

4.3.2 Coleta de Sangue

Os animais foram divididos em Gsed e Gtr, porém, o Gtr foi dividido em 0horas (Gtr/0h) ou 24horas (Gtr/24h). Os animais do Gtr/0h foram eutanasiados logo após os 60 minutos de treinamento da última sessão de natação e o Gtr/ 24h, foram eutanasiados por guilhotina, 24 horas após a última sessão de exercício para retirada de sangue (4mL).

As amostras de sangue foram transferidas para tubos de vidro heparinizados e mantidos a 4°C até a centrifugação a 2000 rpm (4°C, 15 minutos). O plasma obtido foi armazenado a -80°C e utilizado para dosagens de glicemia, lactato e corticosterona.

4.3.3 Análises Bioquímicas

Vinte e quatro horas após a última sessão de exercício físico os animais do Gsed e Gtr/24h foram alojados em ambiente silencioso, onde permaneceram em repouso e alimentados por 30 minutos. Em seguida, foi realizada a eutanásia por guilhotina para retirada de sangue e separação do plasma. A concentração plasmática de corticosterona foi determinada pelo método fluorimétrico modificado de Guillemin (Guillemin et al., 1959), utilizando-se padrão de corticosterona (1mg de corticosterona em 10mL de álcool etílico anidro), diclorometano, ácido sulfúrico concentrado, NaOH 0,1M, água destilada, álcool etílico anidro e 100 µL de plasma. A fluorescência foi determinada no leitor de microplacas *Victor*® no nível de excitação de 477, emissão de 520 e sensibilidade de 11. A concentração de corticosterona foi obtida em µg/dL.

Nos animais do Gsed e Gtr as concentrações plasmáticas de lactato e glicemia foram analisadas em repouso, imediatamente após a última sessão de natação (Gtr/0h) e 24 horas após a última sessão de exercício (Gtr/24h). A coleta de sangue dos animais em repouso (Gsed e Gtr/24h) foi realizada por decapitação sendo que eles estavam previamente alimentados e alojados em um ambiente silencioso. Já a coleta de sangue após o exercício físico (Gtr/0h), foi feita nos animais do Gtr imediatamente após 60 minutos de treinamento de natação.

A análise de lactato plasmático foi realizada por método enzimático, segundo a técnica de Gutman, Wahlefeld (1974). O teste consistiu em 150µL de plasma diluído (20 µL plasma + 1,0 mL H₂O) + 300 µL de mistura reativa. As amostras permaneceram 30 minutos em banho Maria e utilizou-se 150µL de água destilada para leitura (branco a 340nm). A equação utilizada para cálculo da concentração de lactato no sangue (mM) foi: $[Lac] = Abs \times 3,0 \text{ (diluição dosagem)} \times 51 \text{ (diluição amostra)} \div 6,22 = Abs \times 24,6$.

A glicemia dos animais foi avaliada através do método enzimático de acordo com a técnica de Bergmeyer, Bernt, (1974).

4.4 ANÁLISE DOS PARÂMETROS CARDIOVASCULARES

4.4.1 Implante de cânulas-guias na RVLM

Um dia após a última sessão de exercício físico os ratos dos Gsed e Gtr foram anestesiados com pentobarbital sódico (40 mg/kg, i.p.) e submetidos à cirurgia estereotáxica para implante de cânulas-guia direcionadas bilateralmente a área RVLM. Os animais foram posicionados no aparelho estereotáxico (David Kopf Institute) com a barra incisiva 5 mm abaixo da linha interaural e as cânulas guia direcionadas a partir da linha Lambda de acordo com as coordenadas antero posterior (AP= -2.5 mm) e latero-lateral (L= 1.8 mm). Todos os procedimentos cirúrgicos para fixação das cânulas guias seguiram a descrição de Martins-Pinge e colaboradores (1997). Ao término desse procedimento, os animais receberam uma dose profilática de 30.000 UI de pentabiótico veterinário e voltaram ao biotério por 3 dias para recuperação cirúrgica.

4.4.2 Cateterização e Registro Cardiovascular

Vinte e quatro horas antes dos experimentos, os animais foram novamente anestesiados (Tribromoetanol, 250 mg/kg, i.p.) para implante de cateteres na artéria e veia femoral, para mensuração da PA e FC, e quando necessária administração de drogas respectivamente. Trinta minutos antes do início do registro, os animais eram adaptados ao ambiente de experimento e mantidos em gaiolas individuais em uma sala silenciosa. Em seguida, era registrada a PA e FC por 30 minutos. O registro foi feito com os animais acordados e com livre movimentação. A cânula arterial do animal estava acoplada a um transdutor de pressão (Powerlab modelo MLT0380) e conectado a um sistema de registro computadorizado (Powerlab/ADInstruments). Durante o período de registro os animais foram mantidos em caixas individuais e em ambiente silencioso.

4.4.3 Microinjeção de Drogas na Área RVLM

Foram submetidos aos protocolos experimentais de microinjeção na área RVLM os animais sedentários (Gsed) e treinados por natação (Gtr). Foram microinjetadas unilateralmente na RVLM dos animais as seguintes drogas: L-glutamato (5 nmol/100 nL), solução de salina estéril 0,9%, “Scavenger” de NO (Carboxy-PTIO: 1 nmol/100nl), doador de NO (DEA-NONOate: 50nmol/100nL), inibidor da NOS (NG-nitro-L-arginina metil ester: L-NAME 15 nmol/100nl), inibidor da nNOS (Nw-Propyl-L-Arginina, 4nmol/100nL) e inibidor da iNOS (1400W: 2 nmol/100nl). As concentrações das drogas utilizadas foram baseadas nas seguintes literaturas: L-glutamato, Salina estéril 0,9% e L-NAME: Martins-Pinge et al., (2007); Carboxi-Ptio e n-Propyl-L-arginina: Busnardo et al., (2010); Dea-NONOate: YAO et al., (2007); 1400W: Tabrizian et al., (2010). Ao final de cada protocolo experimental os animais foram eutanasiados com uma dose extra de anestésico e em seguida realizado os procedimentos de marcação dos sítios de microinjeção e retirada do cérebro para posterior análise histológica.

4.4.4 Protocolos Experimentais de Microinjeção de Drogas na Área RVLM:

A microinjeção de substâncias na área RVLM foi realizada de acordo com o seguinte esquema de protocolo:

– Microinjeção de L-glutamato e Salina Estéril 0,9%

<i>Registro basal PA</i>	<i>Microinjeção L-glutamato</i>	<i>Intervalo e retorno valor basal PA</i>	<i>Microinjeção de Salina 0,9%</i>	<i>Intervalo e retorno valor basal PA</i>	<i>Microinjeção L-glutamato</i>
30 minutos		5 minutos		5 minutos	

– Microinjeção de L-glutamato e “Scavenger” de NO

<i>Registro basal PA</i>	<i>Microinjeção L-glutamato</i>	<i>Intervalo e retorno valor basal PA</i>	<i>Microinjeção de “Scavenger” de NO</i>	<i>Intervalo e retorno valor basal PA</i>	<i>Microinjeção L-glutamato</i>
30 minutos		5 minutos		5 minutos	

– Microinjeção de doador de NO

Registro basal PA	Microinjeção de Doador de NO	Intervalo e retorno valor basal PA	Microinjeção L-glutamato
30 minutos		5 minutos	

-----▶

– Microinjeção de L-glutamato e inibidor da NOS

Registro basal PA	Microinjeção L-glutamato	Intervalo e retorno valor basal PA	Microinjeção de inibidor da NOS	Intervalo e retorno valor basal PA	Microinjeção L-glutamato
30 minutos		5 minutos		5 minutos	

-----▶

– Microinjeção de L-glutamato e inibidor da nNOS

Registro basal PA	Microinjeção L-glutamato	Intervalo e retorno valor basal PA	Microinjeção de inibidor da nNOS	Intervalo e retorno valor basal PA	Microinjeção L-glutamato
30 minutos		5 minutos		5 minutos	

-----▶

– Microinjeção de L-glutamato e inibidor da iNOS

Registro basal PA	Microinjeção L-glutamato	Intervalo e retorno valor basal PA	Microinjeção de inibidor da iNOS	Intervalo e retorno valor basal PA	Microinjeção L-glutamato
30 minutos		5 minutos		5 minutos	

-----▶

4.5 HISTOLOGIA DA RVLM

Ao término do protocolo experimental, os animais foram eutanasiados com sobredose de pentobarbital sódico e em seguida tiveram a marcação dos sítios de microinjeção na RVLM com corante azul de Evans 2% (100nl). Após este procedimento, o cérebro de cada animal foi retirado e armazenado em formaldeído 10% para posterior análise histológica. Os cérebros

foram cortados em criostato, em fatias com espessura de 25µm e coradas com vermelho neutro 1%. Os cortes foram examinados microscopicamente e comparados com auxílio de um atlas de cérebro de rato (Paxinos, Watson, 1998). Somente os ratos com marcação da microinjeção na área RVLM foram considerados para as análises (Figura 5 e 6).

4.6 ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA DA ÁREA RVLM

A expressão de RNAm foi estimada através da quantificação por PCR em tempo real em 7-9 amostras por grupo, sendo eles, Gsed e Gtr. As amostras foram adquiridas após perfusão transcardíaca de salina estéril 0,9%. O cérebro foi retirado e sob baixa temperatura com gelo seco, foi separado a porção bulbar para secção de uma fatia de 1 mm na altura da área RVLM. Considerando o Núcleo Ambíguo (NA) como referência anatômica cerebral e com o auxílio de uma agulha para “punchs”, foi coletado bilateralmente amostras de tecido cerebral da área RVLM. Após este procedimento os punchs foram armazenados em -80°C e posteriormente usando o reagente Trizol[®] foi feita a extração do RNAm que em seguida foi dissolvido em 10 µl de água DEPC e novamente estocado em -80°C. Logo após, as amostras foram tratadas com DNase I para síntese de cDNA por transcrição reversa (RevertAidTM M-MuLV Reverse Transcriptase) de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante. O cDNA obtido foi então armazenado a -20°C. As amostras foram submetidas à amplificação por método de Real Time qPCR usando Platinum SYBR Green PCR Supermix-UDG e oligonucleotídeos específicos da enzima NOS: (eNOS: sense primer: GCCAACAGGCCTGGCGCAA, antisense Primer: GTGCTGTCCTGCAGTCCCGA; iNOS: sense primer: GGATATCTTCGGTGCGGTCTT, antisense primer: GCTGTA ACTCTTCTGGGTGTCAGA; nNOS: sense primer: CGCTACGCGGGCTACAAGCA, antisense primer: GCACGT CGAAGCGGCCTCTT). A expressão do RNAm foi estimada pelo método PCR semi-quantitativo em tempo real, através do termociclador denominado 7500 Real-Time PCR System. A especificidade dos ensaios de SYBR Green foi confirmada por análise dos pontos da curva de melting. O gene endógeno utilizado foi a Hipoxantina-guanina fosforibosil transferase (HPRT) o qual é expresso constitutivamente em todas as células do organismo e que, em experimento-piloto, não foi alterado pelo treinamento físico. A

análise da expressão gênica das reações foi obtida pelo software geNorm VBA applet for Microsoft Excel considerando os valores de threshold cycle (Ct), pelo método de $\Delta\Delta Ct$ (Pfaffl, 2001) e com resultados expressos em porcentagem de aumento (fold increase). Todos os reagentes e oligonucleotídeos foram comprados da Invitrogen (San Diego, CA).

4.7 GANHO BAROREFLEXO

A análise da função baroreflexa da FC de cada animal (sedentário ou treinado) foi feita nos animais previamente cateterizados (de acordo com a metodologia já descrita) e após um período de registro basal foi realizada a injeção em “bolus” intravenoso de doses crescentes de Fenilefrina e Nitroprussiato de Sódio (0,2 até 12,8 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Os valores de PAM e FC foram avaliados por equação logística sigmoidal, conforme descrições prévias (Higa et al., 2002; Head; McCarty, 1987; Kent et al, 1972). Esses experimentos foram realizados em animais dos grupos sedentários e treinados sem implantes de cânulas-guia.

4.8 ANÁLISE DOS RESULTADOS

Todos os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média. Os dados de composição corporal e dosagens bioquímicas foram analisados através do teste t' de Student pareado e não pareado e as variações da PAM induzidas por microinjeção de drogas na área RVLM foram analisadas pelo teste Anova One Way, seguido de Newman Keuls post hoc. O nível de significância adotado foi de 95% ($p \leq 0,05$). Os valores de expressão gênica das isoformas de NOS com os valores de FC de repouso foram analisadas através do teste de correlação de Pearson considerando como significativa $r \geq 0.1$ e $p \leq 0,05$.

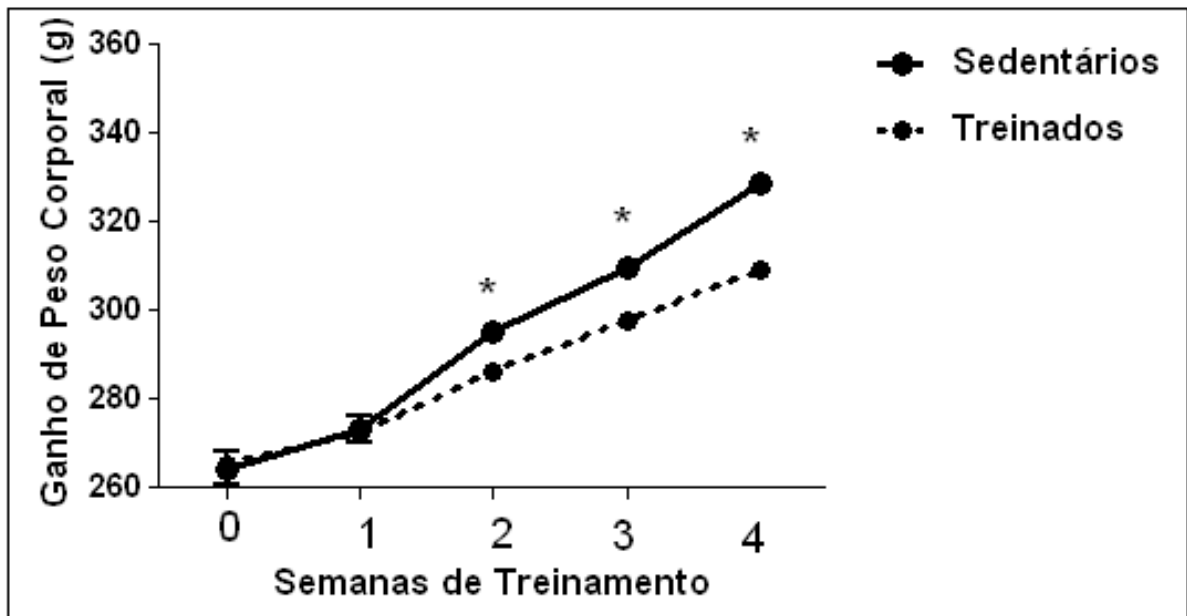
5 RESULTADOS

5.1 COMPOSIÇÃO CORPORAL

Peso corporal, Índice de Lee, comprimento naso-anal e coleta de tecidos.

O ganho de peso corporal foi diretamente modificado pelo treinamento físico. Os animais (Gsed; n=10 e Gtr; n=10) iniciaram o protocolo experimental com peso corporal similar (Gsed: $264,30 \pm 3,91\text{g}$ vs. Gtr: $265,30 \pm 2,95\text{g}$). Já na segunda semana de natação, os animais treinados apresentaram valores menores para ganho de peso corporal comparados aos animais sedentários (Gsed: $295 \pm 2,20\text{g}$ vs. Gtr: $286,22 \pm 0,99\text{g}$), e isto se repetiu na terceira semana de treinamento/sedentarismo sendo que ao final da quarta semana experimental esta diferença no peso corporal entre os animais foi ainda mais evidente (Gsed: $328,34 \pm 16,02$ vs. Gtr: $309,22 \pm 1,11$) (Figura 1).

Figura 1 – Ganho de Peso Corporal (g) durante o período de Sedentarismo vs. Treinamento (* $p \leq 0,05$ treinados vs. Sedentários).



Não foram encontradas diferenças estatísticas entre os animais nas análises do Índice de Lee (Gsed: $0,30 \pm 0,002$ vs. Gtr: $0,30 \pm 0,003$) e comprimento

naso-anal (Gsed: 23,10 \pm 0,31 vs. Gtr: 22,55 \pm 0,26) demonstrando que o treinamento de natação proposto não alterou esses parâmetros da composição corporal (Tabela 1).

As alterações na gordura visceral acompanharam as mudanças de peso corporal dos animais. Ao final de 4 semanas de natação, os animais treinados apresentaram menores valores de gordura retroperitoneal (Gsed: 0,90 \pm 0,09g vs. Gtr: 0,60 \pm 0,06) e perigonadal (Gsed: 0,82 \pm 0,05 vs. Gtr: 0,61 \pm 0,03) comparados aos sedentários (Tabela 1).

Foi avaliado também o peso relativo de alguns órgãos e músculos. O peso relativo do coração dos animais treinados foi estatisticamente maior que os animais sedentários (Gsed: 0,33 \pm 0,01 vs. Gtr: 0,37 \pm 0,01). Além disso, não foi encontrada diferença entre os animais em relação ao peso relativo de glândulas adrenais (Gsed: 0,019 \pm 0,002 vs. Gtr: 0,016 \pm 0,002) e músculo Sóleo (Gsed: 0,106 \pm 0,004 vs. Gtr: 0,109 \pm 0,005) (Tabela 1).

Tabela 1 – Variáveis de composição corporal. Peso relativo (peso absoluto/ peso corporal x 100) de gorduras viscerais, coração, músculo Sóleo e glândulas Adrenais; Índice de Lee [massa corporal (g) / comprimento naso-anal (cm) x 1000] e Distância Naso-anal (cm). (* $p \leq 0.05$ vs. Grupo Sedentários).

Tecidos e Medidas	Grupo Sedentário (n=10)	Grupo Treinado (n=10)
Gordura Retroperitoneal	0,90 \pm 0,09	0,60 \pm 0,06*
Gordura Perigonadal	0,82 \pm 0,05	0,61 \pm 0,03*
Coração	0,33 \pm 0,01	0,37 \pm 0,01*
Músculo Sóleo	0,106 \pm 0,004	0,109 \pm 0,005
Glândulas Adrenais	0,019 \pm 0,002	0,016 \pm 0,002
Índice de Lee	0,30 \pm 0,002	0,30 \pm 0,003
Distância Naso-Anal (cm)	23,10 \pm 0,31	22,55 \pm 0,26

5.2 PARÂMETROS METABÓLICOS: ANÁLISES BIOQUÍMICAS

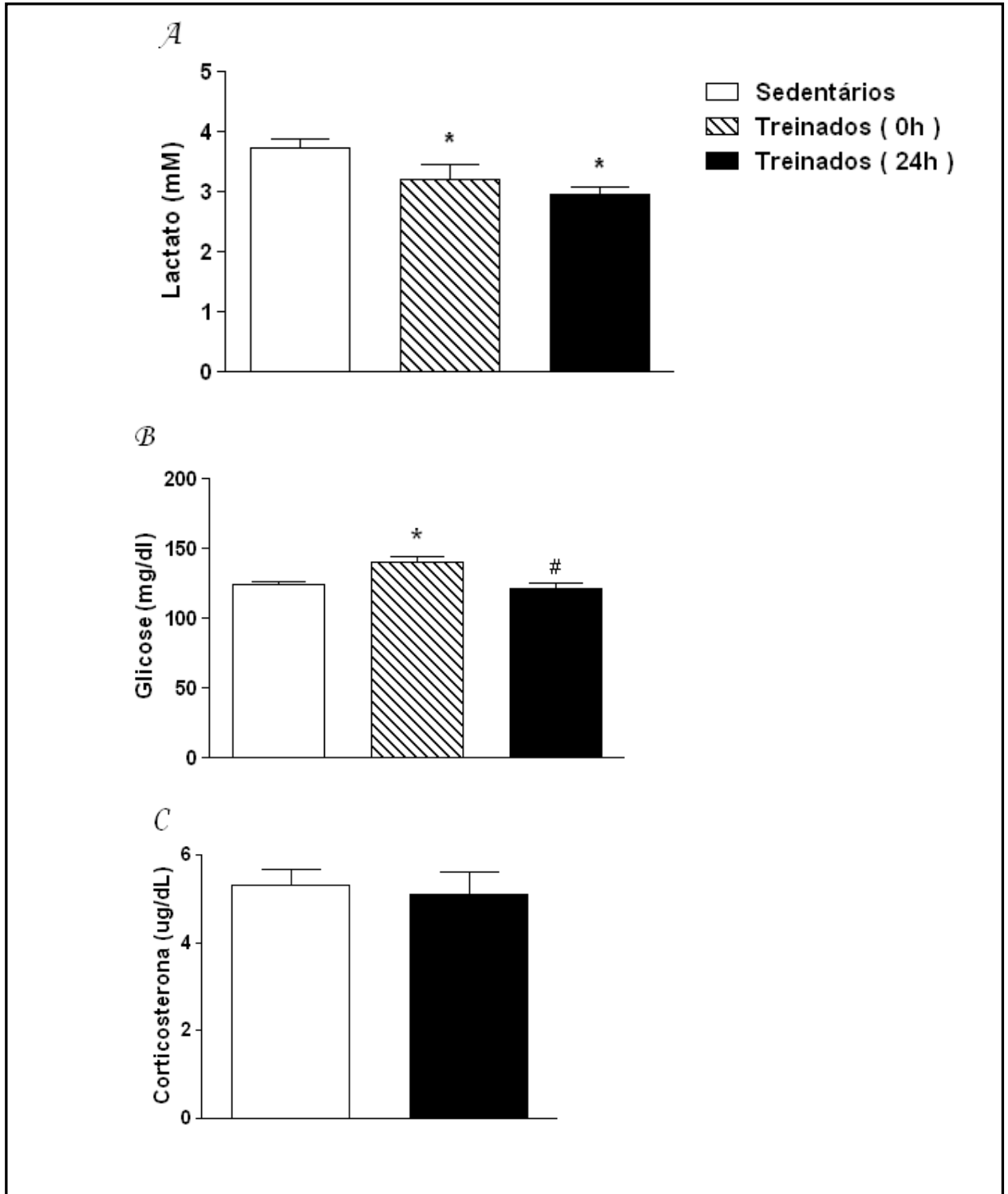
Corticosterona, Glicemia e Lactato

De acordo com os dados analisados, não foram encontradas diferenças estatísticas nas análises dos níveis plasmáticos de corticosterona entre os animais sedentários (n=10) e treinados (n=10) em repouso, 24 horas após a última sessão de treinamento (Gsed: $5,31 \pm 0,38$ mg/dL vs. Gtr: $5,09 \pm 0,50$ mg/dL) (Figura 2c).

Os níveis plasmáticos de glicose e lactato foram avaliados em duas situações diferentes: em repouso: (24 horas após exercício; Gsed: n=10 e Gtr: n=10) e imediatamente após 60 minutos de natação (0 hora; Gtr: n=10). Foi observado que logo após o treinamento a glicemia dos animais treinados estava maior que a dos animais sedentários (Gsed: $124,14 \pm 2,56$ mg/dL vs. Gtr: $140,26 \pm 04,01$ mg/L). Entretanto, em repouso, 24 horas após a última sessão de treinamento, não foram encontradas diferenças nos níveis plasmáticos de glicose dos animais (Gsed: $124,14 \pm 2,56$ mg/dL vs. Gtr: $121,93 \pm 3,74$ mg/dL). Apesar disso, quando comparados os níveis de glicose dos animais treinados nas diferentes situações (Gtr/0h vs. Gtr/24h) foi encontrado menores níveis de glicemia para o Gtr/24h (Gtr/24h: $121,93 \pm 3,74$ mg/dL vs. Gtr/0h: $140,26 \pm 01,04$ mg/dL) (Figura 2b).

Os níveis plasmáticos de lactato também foram analisados em duas situações como a glicemia. Os animais do Gtr/0h tiveram menores níveis de lactato sanguíneo quando comparados com os animais sedentários (Gsed: $3,74 \pm 0,15$ mM vs. Gtr/0h: $3,22 \pm 0,25$ mM), entretanto, quando comparados aos animais do Gtr/24h esses valores não foram diferentes (Gtr/24h: $2,96 \pm 0,13$ vs. Gtr/0h: $3,22 \pm 0,25$ mM) (Figura 2a).

Figura 2 – Concentração plasmática de lactato ($\mu\text{mol/L}$) e glicose (mg/dL) de ratos Wistar sedentários, treinados em repouso (24h) e treinados após última sessão de natação (0h). Concentração plasmática de corticosterona (mg/dL) de ratos Wistar sedentários e treinados em repouso (24h). (* $p \leq 0,05$ vs. Gsed). (# $p \leq 0,05$ vs. Gtr/0h).

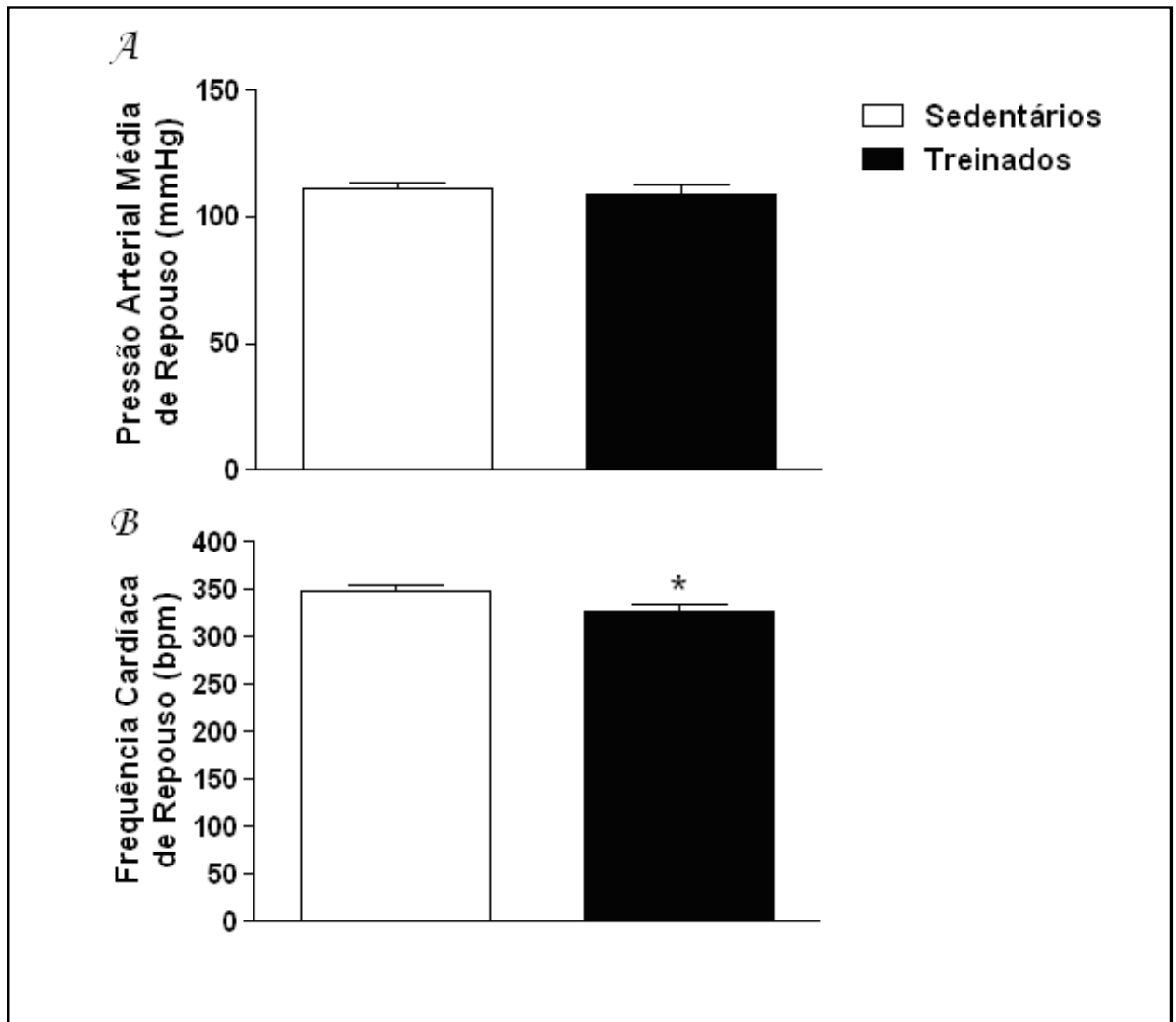


5.3 PARÂMETROS CARDIOVASCULARES

Pressão arterial e frequência cardíaca de repouso

Os valores basais de PAM não demonstraram diferenças entre os grupos (Gsed: $111,3 \pm 1,3$ mmHg vs. Gtr: $109,1 \pm 3,4$ mmHg) (Figura 3a). Já os resultados basais da FC demonstraram bradicardia de repouso para os animais treinados quando comparados ao grupo sedentários (Gsed: $349,63 \pm 4,9$ bpm vs. GTr: $326,67 \pm 7,3$ bpm) (Figura 3b).

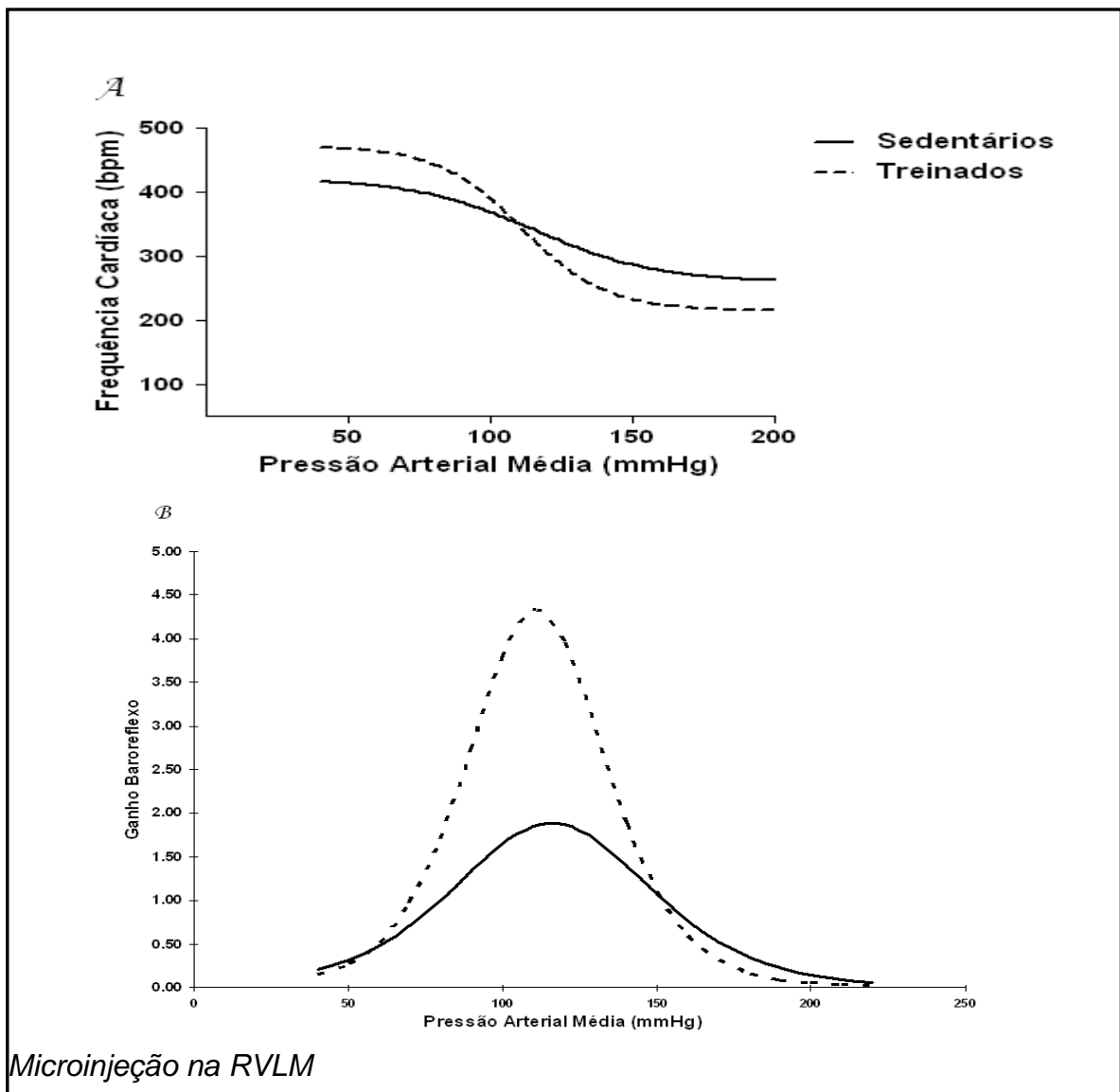
Figura 3 – Valores de Pressão Arterial Média em repouso (mmHg) e Frequência Cardíaca em repouso (bpm) de animais controles sedentários (n=9) e treinados (n=10) não anestesiados. (* $p \leq 0,05$ vs. Sedentários).



Ganho baroreflexo

Os dados demonstraram maior sensibilidade ao baroreflexo (figura 4a) e maior ganho baroreflexo (figura 4b) para os animais treinados (n=8) comparado aos sedentários (n=8) (Gsed: $-2,42 \pm 0,31$ vs. Gtr: $-4,41 \pm 0,5$), o que evidenciou, efeitos cardiovasculares benéficos advindos do protocolo de natação proposto aos animais.

Figura 4 – (A) Curvas de variação da Pressão Arterial Média (mmHg) e Frequência Cardíaca (bpm) durante o teste de baroreflexo. Doses crescentes de Fenilefrina e Nitroprussiato de Sódio administrados intravenosamente. (B) Curvas de Ganho da Sensibilidade Baroreflexa. Valores de Pressão Arterial Média (mmHg). Linha contínua (-): Gsed; Linha pontilhada (...): Gtr.



Histologia e localização da área RVLM

A confirmação do sítio de microinjeção unilateral na RVLM foi detectada através da visualização de corte histológico com marcação com corante Azul de Evans e auxílio do Atlas Paxinos, Watson, (1998) e por meio de um mapa da superfície ventral do Bulbo (Figura 5). Somente os ratos com marcação da microinjeção na área RVLM foram considerados para as análises tendo como referência para localização da RVLM o núcleo Ambíguo (NA) (Figura 6).

Figura 5 – Mapa da superfície ventral do Bulbo com localização bilateral da área RVLM. XII Nervo craniano; C1: Primeiro nervo cervical.

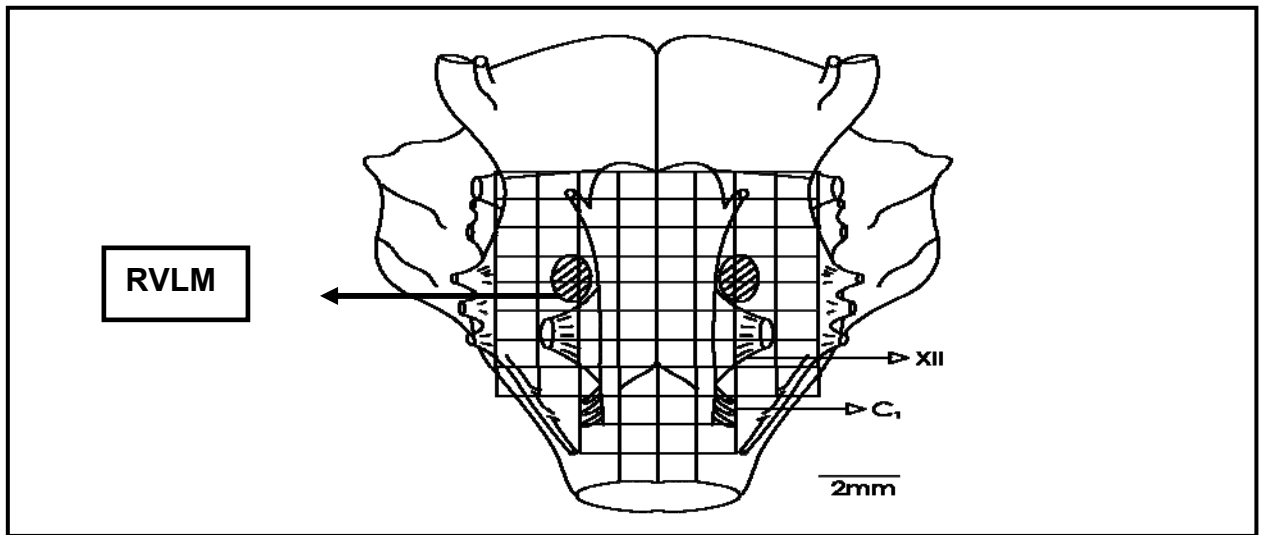
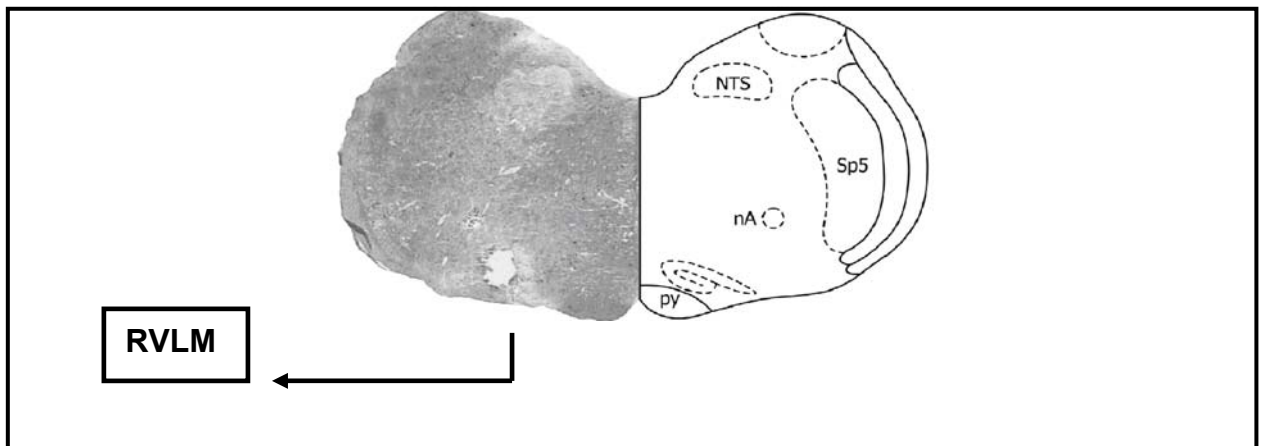


Figura 6 – Corte histológico e diagrama da região bulbar com a marcação do sítio central de injeção na RVLM. NTS: Núcleo Trato Solitário; nA: Núcleo Ambíguo; Sp5: núcleo espinal do trigêmeo; py: Trato Piramidal.

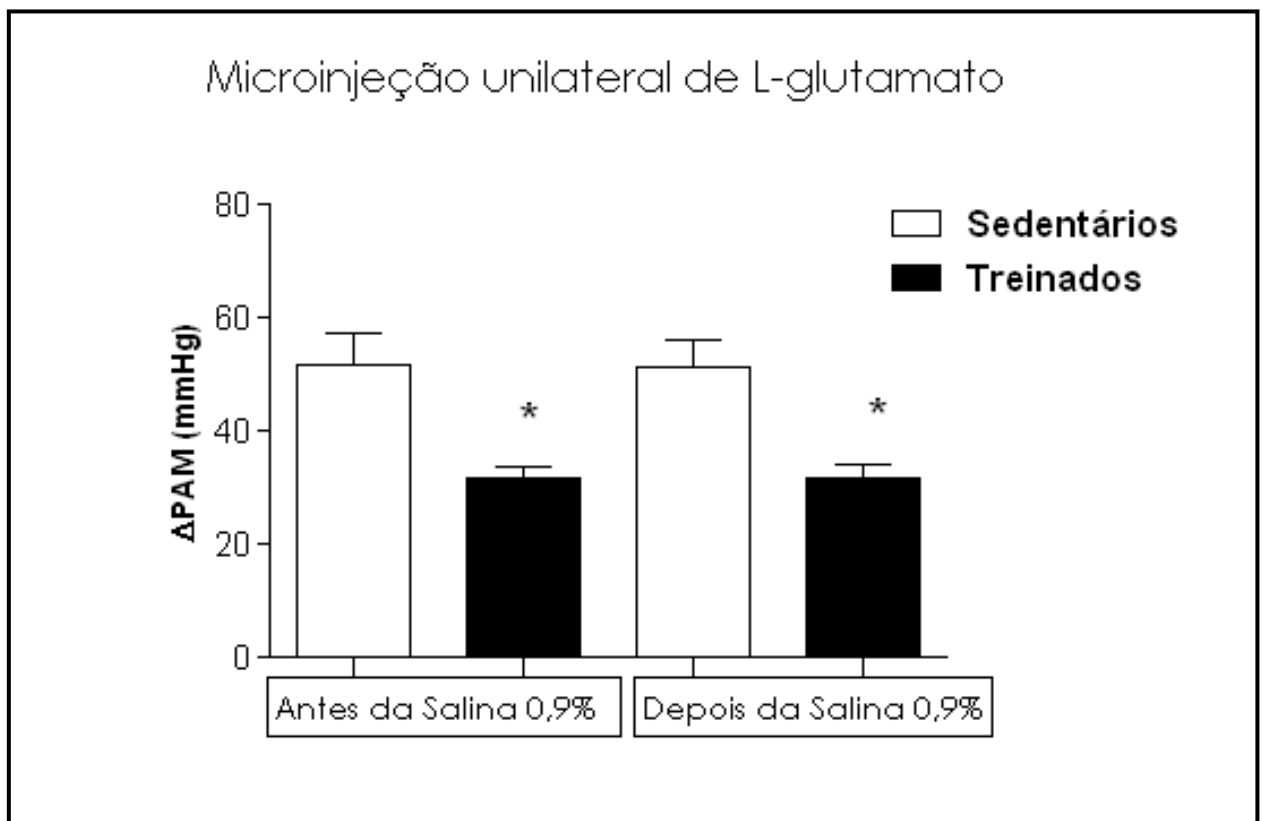


Microinjeção de drogas na RVLM

Microinjeção de L-glutamato e Salina 0,9% estéril

Os grupos controles sedentários (n=6) e treinados (n=6) foram obtidos através da microinjeção de L-glutamato na RVLM antes e depois da microinjeção de salina 0,9%. Não foi observada diferença estatística para os valores de PAM entre os grupos imediatamente antes da primeira (Gsed: $118 \pm 5,2$ mmHg vs. Gtr: 122 ± 8 mmHg) e segunda (Gsed: $125 \pm 3,8$ mmHg vs. Gtr: $120 \pm 2,7$ mmHg) microinjeção unilateral de L-glutamato. A microinjeção de L-glutamato promoveu maior variação pressórica em ratos sedentários antes (Δ PAM: Gsed: $52 \pm 5,6$ mmHg vs. Gtr: 32 ± 2 mmHg) e depois (Δ PAM: Gsed: 51 ± 5 mmHg vs. Gtr: $32 \pm 2,4$ mmHg) da microinjeção de salina, entretanto, a microinjeção de salina não alterou as respostas de variações pressóricas ao L-glutamato em ambos os grupos (Figura 7).

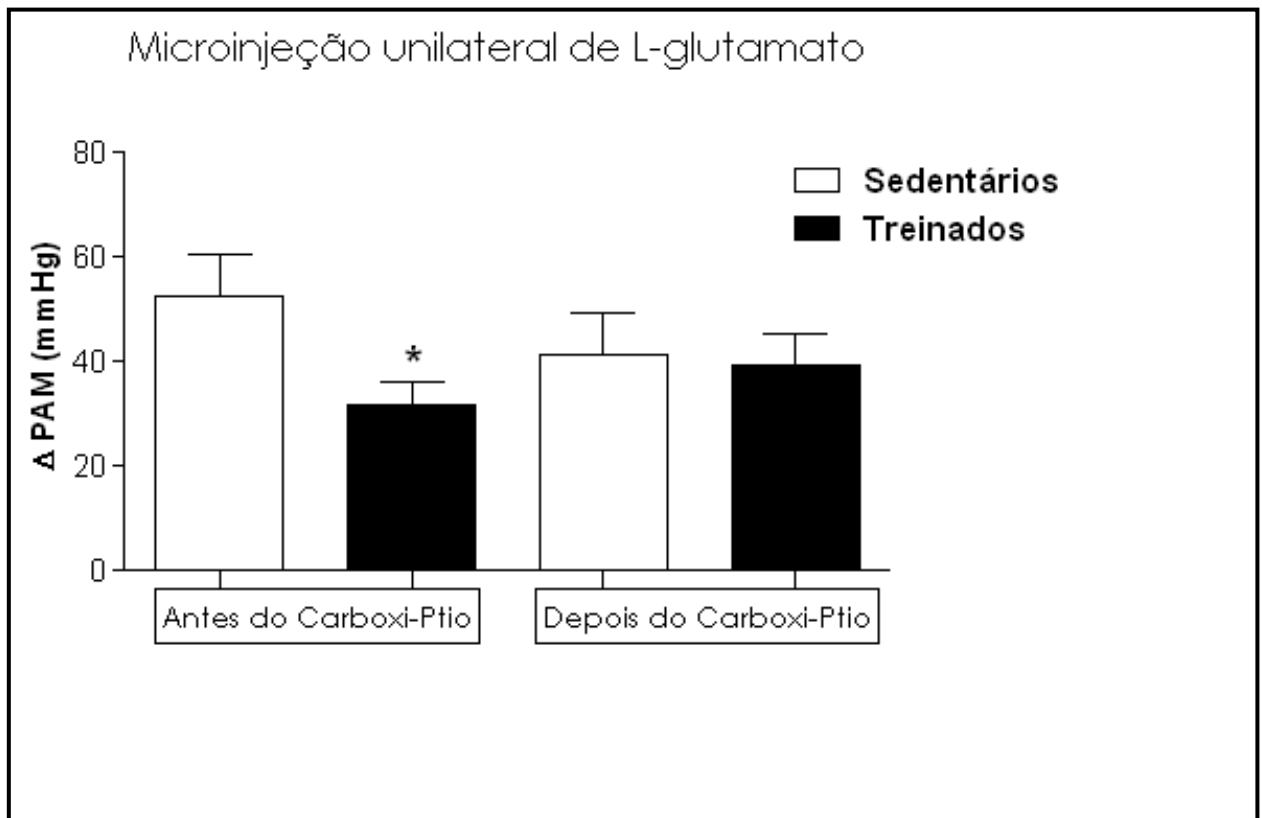
Figura 7 – Alterações da PAM induzidas por microinjeção unilateral de L-glutamato antes e depois da microinjeção de salina 0,9% estéril na RVLM. (* p $\leq 0,05$ vs. Gsed antes e Gsed depois).



Microinjeção de L-glutamato e "Scavenger" de NO

Em relação à PAM, não foi observada diferença estatística entre os grupos sedentários (n= 8) e treinados (n= 10) imediatamente antes da primeira (Gsed: $126 \pm 1,9$ mmHg vs. Gtr: $125 \pm 2,1$ mmHg) e segunda (Gsed: $124 \pm 2,3$ mmHg vs. Gtr: $125 \pm 1,8$ mmHg) microinjeção unilateral de L-glutamato. No momento da primeira microinjeção de L-glutamato, observou-se aumento imediato de PAM nos animais de ambos os grupos, porém, nos animais treinados o aumento foi menor (Δ PAM: Gsed: $53 \pm 7,7$ mmHg vs. Gtr: $32 \pm 4,2$ mmHg, $p < 0,05$). Por outro lado, quando foi realizada a segunda microinjeção de L-glutamato, após a microinjeção do “Scavenger” de NO, não foi observada diferença estatística entre os grupos avaliados (Δ PAM: Gsed: $41 \pm 7,7$ mmHg vs. GTr: $39 \pm 5,9$ mmHg) (Figura 8).

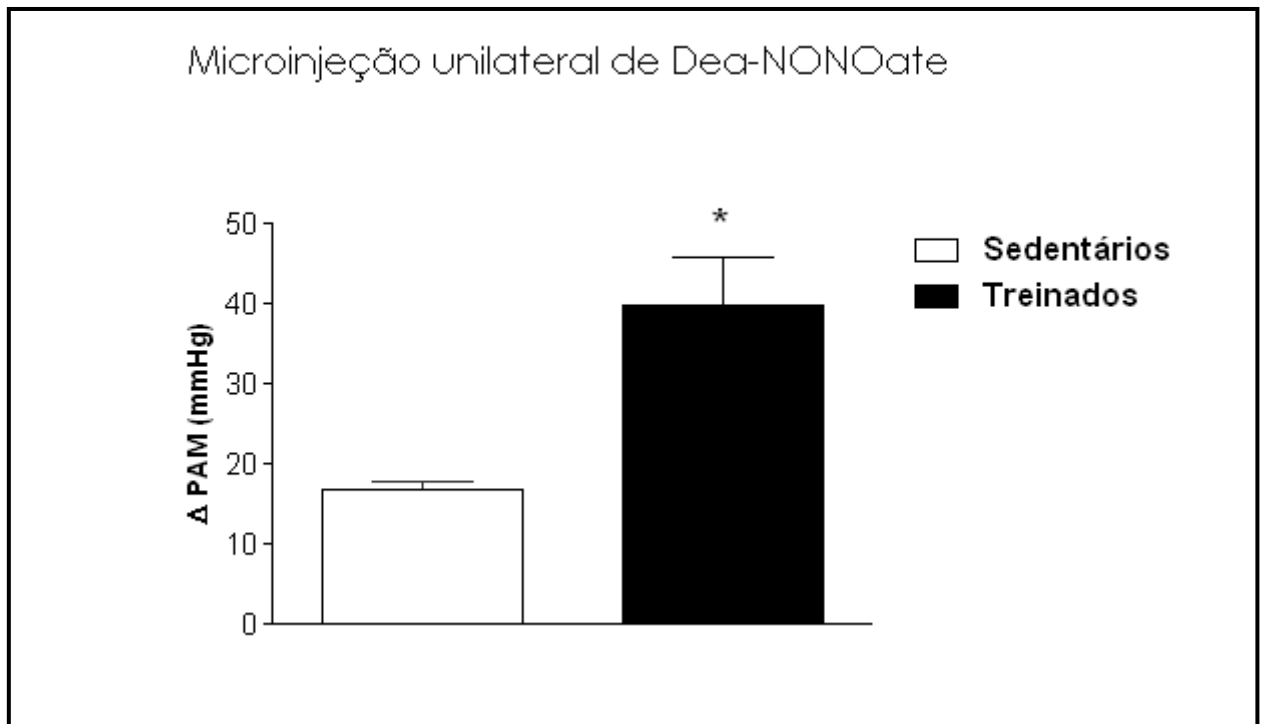
Figura 8 – Alterações da PAM induzidas por microinjeção unilateral de L-glutamato antes e depois da microinjeção de Carboxi-Ptio (1nmol/100nl) na RVLM. (* $p \leq 0,05$ vs. Gsed antes do Carboxi-Ptio).



Microinjeção de doador de NO

Imediatamente antes da microinjeção de doador de NO, não houve diferença nos valores de PAM para os animais sedentários (n= 8) e treinados (n= 7) (Gsed: 118 ± 2 mmHg vs. GTr: $123 \pm 1,7$ mmHg). A microinjeção unilateral de Dea-NONOate na RVLM causou aumento imediato na PAM de ambos os grupos, sendo que nos animais treinados esse aumento foi estatisticamente maior (Δ PAM: Gsed: $16 \pm 1,1$ mmHg vs. GTr: $39 \pm 6,1$ mmHg) (Figura 9).

Figura 9 – Alterações da PAM induzidas por microinjeção unilateral de Dea-NONOate (50 nmol/100nl) na RVLM de ratos sedentários e treinados. (* $p \leq 0,05$ vs. sedentários).

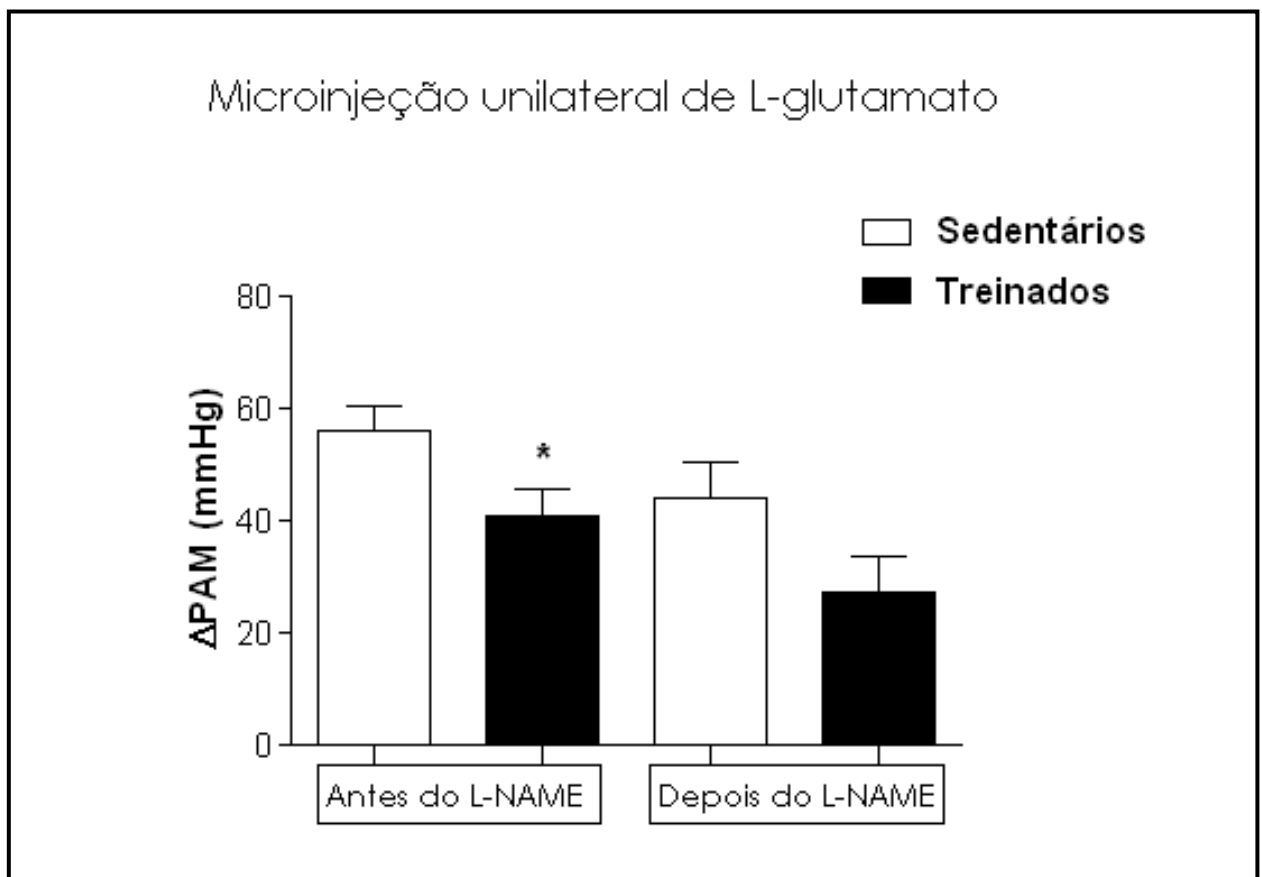


Microinjeção de L-glutamato e inibidor não seletivo da NOS

Em relação à PAM, não foi observada diferença estatística entre os animais sedentários (n=8) e treinados (n=7) imediatamente antes da primeira (Gsed: 119 ± 2 mmHg vs. Gtr: $116 \pm 2,2$ mmHg) e segunda (Gsed: 121 ± 3 mmHg vs. Gtr: $116 \pm 2,8$ mmHg) microinjeção unilateral de L-glutamato. A microinjeção de L-glutamato na RVLM antes da microinjeção do inibidor não seletivo da NOS, o L-NAME, produziu maior variação pressórica nos animais sedentários (Δ PAM: Gsed:

56 ± 4,5 mmHg) comparados aos treinados (Δ PAM: Gtr: 41 ± 5 mmHg). Após a microinjeção de L-NAME não foi observada diferença estatística para a microinjeção de L-glutamato entre os animais (Δ PAM: Gsed: 44 ± 6,2 mmHg vs. Gtr: 28 ± 6,3 mmHg) (Figura 10).

Figura 10 – Alterações da PAM induzidas por microinjeção unilateral de L-glutamato antes e depois da microinjeção de L-NAME (15 nmol/100nl) na RVLM de ratos sedentários e treinados. (* p ≤ 0,05 vs. Gsed antes do L-NAME).

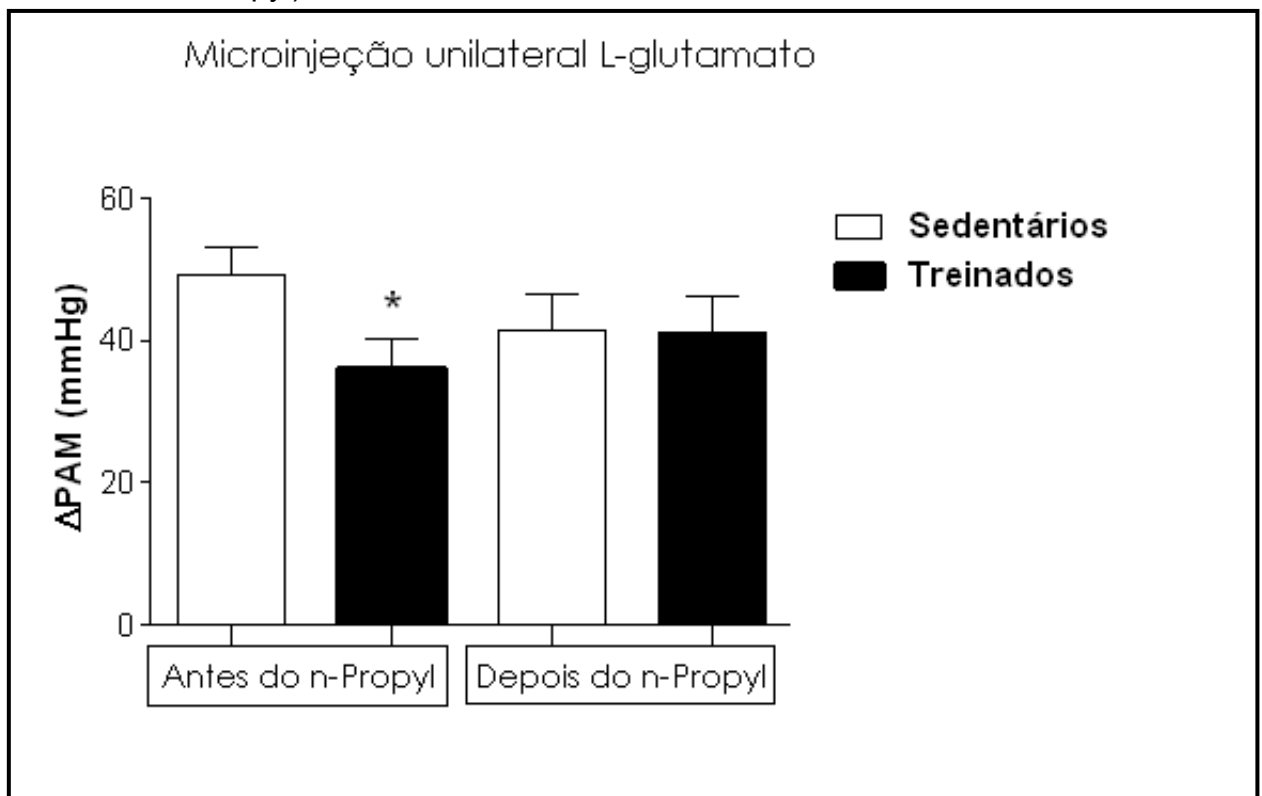


Microinjeção de L-glutamato e inibidor da nNOS

Respostas semelhantes às encontradas com o “Scavenger” de NO foram observadas com o inibidor da nNOS. Não foi encontrada diferença estatística para os valores de PAM entre os animais sedentários (n= 8) e treinados (n= 10) imediatamente antes da primeira (Gsed: 129 ± 2,6 mmHg vs. Gtr: 123 ± 1,2 mmHg) e segunda (Gsed: 130 ± 2,6 mmHg vs. Gtr: 128 ± 2 mmHg) microinjeção de L-glutamato. A primeira microinjeção unilateral de L-glutamato provocou aumento de PAM em ambos os grupos, porém, menor resposta pressora foi observada nos

animais treinados (Δ PAM: Gsed: $49 \pm 3,8$ mmHg vs. GTr: $36 \pm 3,9$ mmHg). Após a microinjeção do inibidor da nNOS, a microinjeção de L-glutamato provocou novamente aumento na PAM em ambos os grupos, porém, sem diferença estatística entre eles (Δ PAM: Gsed: 42 ± 5 mmHg vs. GTr: $41 \pm 5,2$ mmHg) (Figura 11).

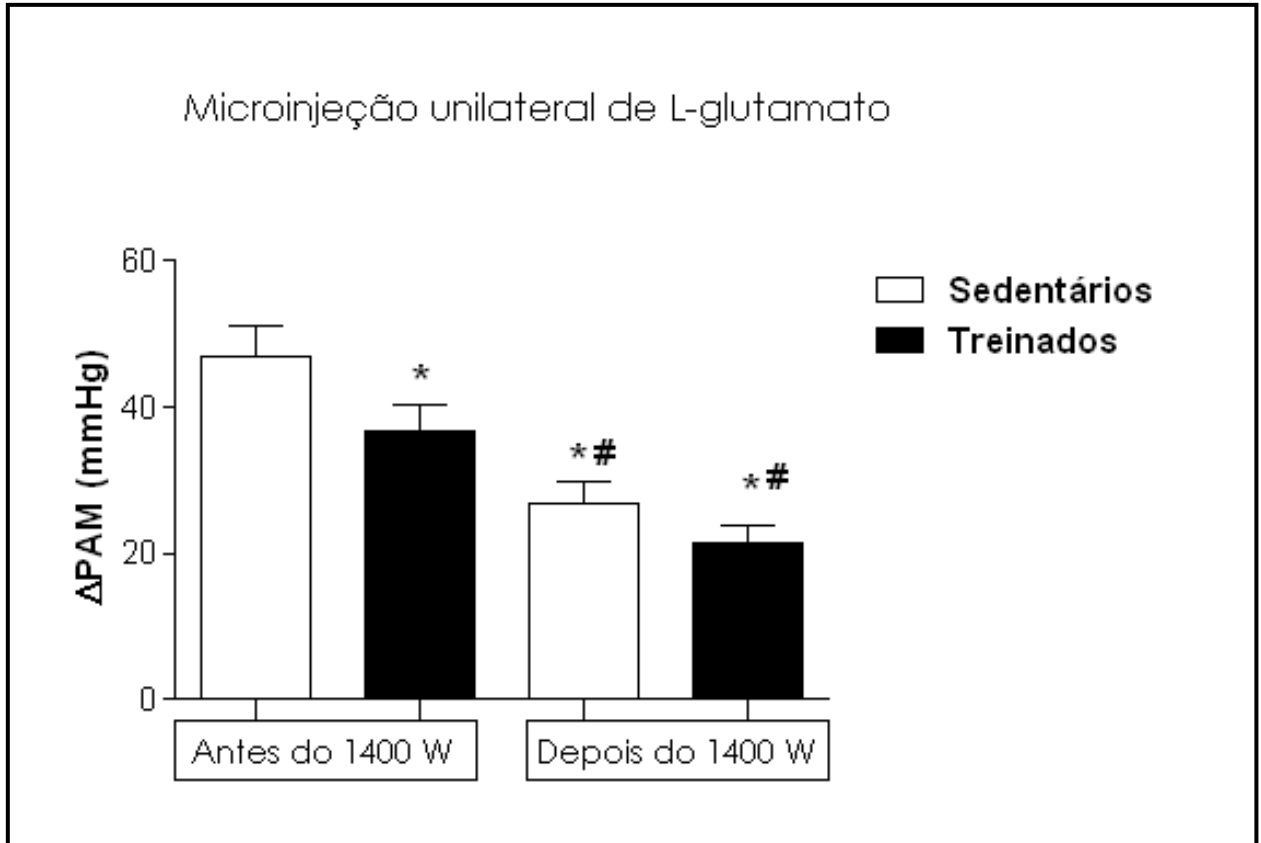
Figura 11 – Alterações da PAM induzidas por microinjeção unilateral de L-glutamato antes e depois da microinjeção de n-Propyl (4nmol/100nl) na RVLM de ratos sedentários e treinados. (* $p \leq 0,05$ vs. Gsed antes do n-Propyl).



Microinjeção de L-glutamato e inibidor da iNOS

Não houve diferença entre os valores de PAM imediatamente antes da primeira (Gsed: $123 \pm 3,6$ vs. Gtr: $117 \pm 3,2$) e segunda (Gsed: $126 \pm 5,3$ vs. Gtr: $118 \pm 3,4$) microinjeção de L-glutamato entre os animais sedentários (n= 11) e treinados (n= 16), porém, a microinjeção de L-glutamato antes do inibidor seletivo da iNOS provocou menor aumento da PAM em animais treinados comparados aos sedentários (Δ PAM: Gsed: $47 \pm 4,1$ vs. Gtr: $37 \pm 3,7$) sendo que após a microinjeção de 1400 W essas respostas ao glutamato foram estatisticamente menores (Δ PAM: Gsed: 27 ± 3 vs. Gtr: $21 \pm 2,5$) para ambos os grupos (Figura 12).

Figura 12 – Alterações da PAM induzidas por microinjeção unilateral de L-glutamato antes e depois da microinjeção de 1400W (2nmol/100nl) na RVLM de ratos sedentários e treinados. (* $p \leq 0,05$ vs. Gsed antes do 1400 W; # $p \leq 0,05$ vs. Gtr antes do 1400 W).



Análise dos valores de FC durante os protocolos experimentais de microinjeção na RVLM

As variações da FC durante as respostas pressoras com microinjeções de glutamato e Dea-NONOate na RVLM foram distintas. Alguns animais responderam com aumento de FC (taquicardia) com a microinjeção de L-glutamato antes ou depois do Carboxi-ptio, L-NAME, n-Propyl e iNOS. Por outro lado, alguns animais responderam com diminuição da FC (bradicardia) em reflexo as alterações de PA. (Tabela 2 e 3).

A microinjeção de doador de NO também apresentou respostas de FC divergentes. Alguns animais responderam com taquicardia ao doador de NO, enquanto outros, responderam com bradicardia (Tabela 4).

Tabela 2 – Valores das alterações de FC durante microinjeção de L-glutamato antes (1^a) e depois (2^a) da salina ou das drogas moduladoras do NO em animais sedentários.

Δ FC (bpm)	Bradicardia 1 ^a	Taquicardia 1 ^a	Bradicardia 2 ^a	Taquicardia 2 ^a
Gsed				
Salina 0,9 %	-23±6 (n=4)	27±3 (n=2)	-24±4 (n=5)	28±0 (n=1)
Carboxi-ptio	-40±2 (n=2)	95±6 (n=6)	-71± 0 (n=1)	47±10 (n=7)
n-Propyl	-43±0,8 (n=4)	55±0,9 (n=4)	-26±1 (n=4)	40±8 (n=4)
L-NAME	-46±5 (n=4)	66±14 (n=4)	-42±2 (n=6)	19±4 (n=2)
1400W	-63±18 (n=5)	83±18 (n=6)	-40±7 (n=6)	60±6 (n=5)

Tabela 3 – Valores das alterações de FC durante microinjeção de L-glutamato antes (1^a) e depois (2^a) da salina ou das drogas moduladoras do NO em animais treinados.

Δ FC (bpm)	Bradicardia 1 ^a	Taquicardi a 1 ^a	Bradicardia 2 ^a	Taquicardia 2 ^a
Gtr				
Salina 0,9 %	-29±5 (n=3)	45±12 (n=4)	-29±5 (n=3)	45±11 (n=4)
Carboxi-ptio	-47±7 (n=6)	52±1 (n=2)	-71±11 (n=5)	24±5 (n=3)
n-Propyl	-33±38 (n=3)	57±10 (n=4)	-54±2 (n=3)	51±9 (n=4)
L-NAME	-50±10 (n=4)	59±8 (n=3)	-42±12 (n=4)	30±13 (n=3)
1400W	-22±2 (n=8)	53±7 (n=8)	-31±4 (n=4)	36±4 (n=12)

Tabela 4 – Valores das alterações de FC durante microinjeção de doador de NO em animais sedentários e treinados.

Δ FC (bpm)	Bradycardia	Taquicardia
Dea-NONOate Gsed	-43±5 (n=5)	41±8 (n=3)
Dea-NONOate Gtr	-36±8 (n=5)	34±7 (n=2)

5.4 EXPRESSÃO GÊNICA DAS ISOFORMAS DE NOS NA ÁREA RVLM

As análises de expressão gênica das isoformas de NOS na RVLM também foram avaliadas em ambos os grupos (sedentários: n= 7 e treinados: n= 9). Foram encontrados os seguintes valores: Fold increase: eNOS: (Gsed: $1,2 \pm 0,25$ vs. Gtr: $0,41 \pm 0,08$), iNOS: (Gsed: $3,38 \pm 1,6$ vs. Gtr: $0,64 \pm 0,21$) e nNOS: (Gsed: $1,46 \pm 0,42$ vs. Gtr: $1,04 \pm 0,27$). Das três isoformas avaliadas (endotelial, induzível e neuronal), apenas a expressão gênica de eNOS apresentou diferença estatística significativa entre os grupos sedentário e treinado ($p < 0,05$) (Figura 13).

Além disso, foi realizada a análise de co-relação dos valores de expressão gênica das isoformas de NOS com os valores de FC de repouso dos animais. Foi encontrada diferença estatística ($p \leq 0,05$) para as isoformas de eNOS (r : 0,52) e iNOS (r : 0,51) (Figura 14).

Figura 13 – Expressão gênica das isoformas da NOS na RVLM de ratos sedentários e treinados. (* $p \leq 0,05$ vs. Sedentários).

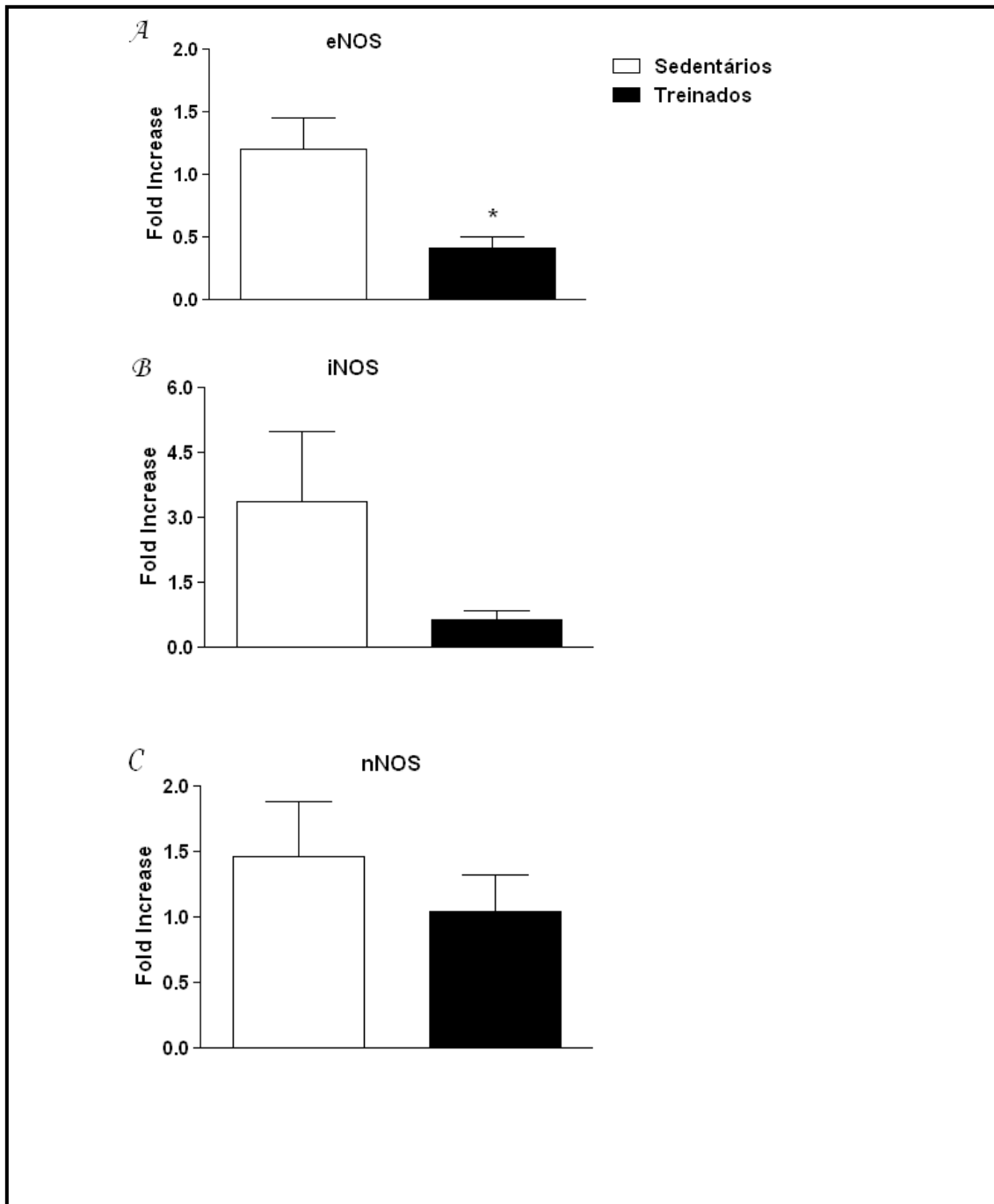
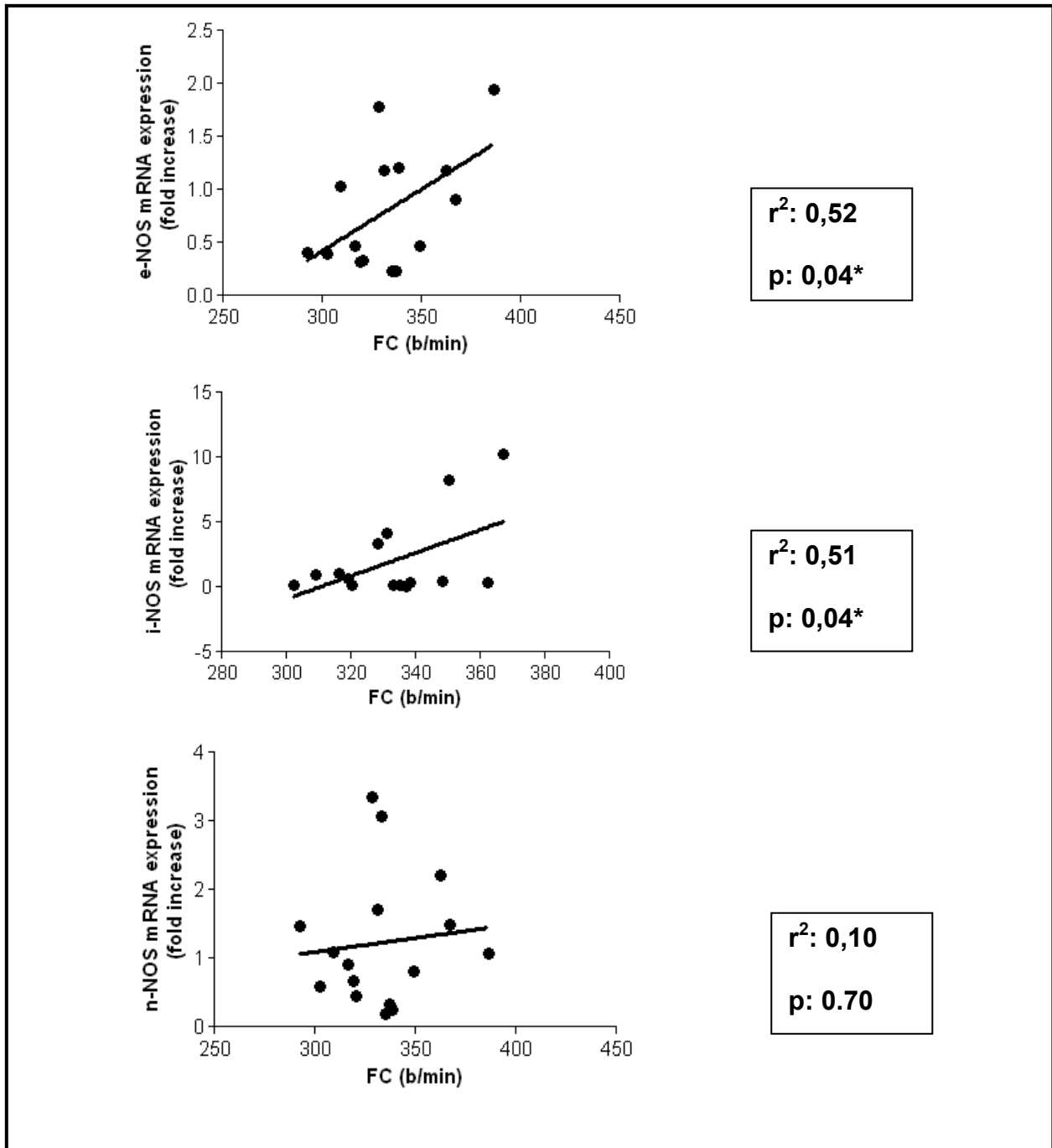


Figura 14 – Co-relação dos valores de expressão gênica das isoformas da NOS com os valores de FC de repouso de ratos sedentários e treinados. (* $p \leq 0,05$).



6 DISCUSSÃO

Neste estudo, foi proposto um protocolo de treinamento físico de natação para ratos, o qual possibilitou caracterizar um modelo eficiente de exercício aeróbio para animais levando em consideração parâmetros bioquímicos plasmáticos e alterações do NO controle da modulação autonômica cardiovascular. Através desse modelo de natação, foram observados nos animais treinados: menores valores de ganho de peso corporal, menores valores relativos de gorduras viscerais, maior peso relativo do coração e menores níveis de lactato, o que provavelmente contribuiu para maiores valores de glicemia plasmática avaliados logo após a última sessão de natação. Os achados demonstraram níveis adequados de corticosterona em repouso e, além disso, peso relativo normal para glândulas adrenais, evidenciando então, efeitos positivos do treinamento físico aeróbio proposto para alterações de parâmetros metabólicos, bioquímicos e de composição corporal. Somado a isso, o treinamento realizado também promoveu importantes alterações na modulação autonômica do sistema cardiovascular. Em animais fisicamente ativos, foi observado bradicardia de repouso, níveis normais de PA e aumento da sensibilidade e ganho baroreflexo. Neste estudo, ficou evidente também, que o treinamento físico favoreceu um menor aumento da resposta pressora ao L-glutamato na área RVLM e que, além disso, o NO de fato parece estar agindo na modulação da saída simpática desta área cerebral, considerando que a expressão gênica de eNOS estava diminuída nesses animais. Sendo assim, os dados indicaram que a natação foi eficiente como método de treinamento físico aeróbio para ratos nas análises de parâmetros autonômicos e cardiovasculares.

A primeira parte deste estudo objetivou caracterizar alguns importantes parâmetros bioquímicos plasmáticos que poderiam estar alterados pelo treinamento físico como glicose, lactato, corticosterona e somado a isso, possíveis alterações na composição corporal de animais sedentários e treinados por natação. Os dados demonstraram que o protocolo de treinamento proposto aos animais provocou menor ganho de peso corporal e menores valores para gorduras viscerais, corroborando com dados prévios (Wilterdink et al., 1993). Não foram encontradas alterações nas glândulas adrenais e músculos sóleos entre os grupos, no entanto, maiores valores de peso relativo para o coração foram observados nos animais treinados, confirmando outros dados da literatura (Medeiros et al., 2004) que

sugerem que o treinamento por natação promove hipertrofia cardíaca devido provavelmente ao aumento do volume sanguíneo ejetado pelo coração, o que demonstra uma associação com melhores parâmetros cardiovasculares para os ratos treinados comparado aos sedentários.

Níveis de glicose somente estavam modificados quando avaliados entre treinados e sedentários imediatamente após a última sessão de treinamento físico (0 hora). Tais achados, provavelmente se relacionam com a contribuição do lactato como precursor de glicose na via da gliconeogênese durante o exercício, tendo em vista que, os níveis lactato, estavam diminuídos nos animais treinados tanto em repouso (24h) como imediatamente após a última sessão de natação (0h). Sendo assim, acredita-se que o protocolo de treinamento sugerido aos animais, foi válido para promover efeitos benéficos nos aspectos metabólicos e de composição corporal, mesmo tendo duração de apenas 4 semanas.

Nós também observamos que os níveis de corticosterona não foram alterados depois do treinamento por natação (24 horas após a última sessão). Os efeitos do treinamento de natação nos níveis de corticosterona foram investigados também por Cox e colaboradores (1985). Os autores observaram que animais submetidos previamente a treinamento de natação quando comparados a sedentários apresentavam menores aumentos nos níveis plasmáticos de corticosterona quando submetidos a 20 minutos de natação, sugerindo assim que os animais treinados previamente estavam mais adaptados a esta situação de estímulo simpatoadrenal. Nesse sentido, como não foi encontrada diferença nos níveis de corticosterona entre os animais treinados e sedentários no presente estudo, assume-se que as respostas cardiovasculares obtidas aqui se devem aos efeitos do treinamento físico e não ao “stress” que o protocolo de natação eventualmente ofereceu aos animais. Portanto, os dados sugerem que o protocolo de treinamento usado em ratos é eficiente em promover importantes alterações em parâmetros bioquímicos e de composição corporal, que associados atuam na melhora da condição física e saúde dos animais.

Na segunda parte do trabalho, nós objetivamos estudar os efeitos do treinamento físico na regulação neural cardiovascular, tendo em vista a importância do NO para a modulação do controle autonômico da PA em áreas específicas do SNC (Hirooka et al., 1996; Morimoto et al., 2000; Patel et al., 2001), e que a prática de exercício físico aeróbio tem demonstrado influenciar a neuromodulação simpática

da RVLM (Martins-Pinge et al., 2005; Mueller, 2007). Foi proposto para este estudo, a análise da influência do NO na neurotransmissão glutamatérgica na área RVLM em animais sedentários e submetidos a treinamento físico, já que foi observado alteração na sensibilidade glutamatérgica após este mesmo protocolo de treinamento físico (Martins-Pinge et al., 2005).

Estudos farmacológicos em gatos e outras espécies mostraram que o NO interage com ambos os neurotransmissores, GABA na inibição e glutamato na excitação (Chen et al., 2001; Tseng et al., 1996). Por outro lado, a biodisponibilidade de NO endógeno na RVLM também parece modular o tônus simpático da área. Tal hipótese foi confirmada por Chan e colaboradores (2001) em estudo realizado em ratos anestesiados, que através da administração bilateral de scavenger de NO na RVLM demonstraram significativa hipotensão e bradicardia, evidenciando um possível papel simpatoexcitatório para o NO na RVLM sobre os parâmetros de PA sistólica (PAS) e FC.

No presente estudo, também foi utilizado um “Scavenger” de NO na RVLM, porém em ratos acordados. Examinamos através da microinjeção do Carboxi-Ptio os efeitos da retirada do NO endógeno localmente sobre a neurotransmissão glutamatérgica da RVLM de animais sedentários e treinados. Antes da microinjeção unilateral do scavenger de NO, foi realizada a microinjeção de L-glutamato e observou-se aumento da PAM em ambos os grupos avaliados, porém, menor resposta pressora nos animais treinados, corroborando com dados prévios do laboratório (Martins-Pinge et al., 2005). Após a microinjeção do “Scavenger” de NO repetiu-se a administração de L-glutamato e novamente foi observado aumento imediato na PAM, porém, sem diferenças entre os grupos analisados. Esses dados sugerem inicialmente que as alterações na resposta glutamatérgica pelo treinamento físico podem ser decorrentes do NO, já que as alterações encontradas desapareceram após a retirada do mesmo. Além disso, deve ser ressaltado que embora não tenha sido estatisticamente significativa, após a microinjeção do “Scavenger” o aumento da PA pelo glutamato teve uma tendência a ser menor nos animais sedentários e uma tendência a ser maior nos animais treinados. Essa tendência no grupo sedentário faz sentido já que foi observado em outro estudo hipotensão e bradicardia após microinjeção de scavenger de NO na RVLM de ratos (Chan et al., 2001). Apesar disto, os resultados de tendência para o grupo treinado, ainda carece de possíveis explicações.

O acréscimo de NO através de drogas doadoras de NO, por si só, também interfere na neuromodulação da RVLM. Um estudo demonstrou que a microinjeção bilateral de baixas doses de doador de NO, foi capaz de promover hipertensão e taquicardia e por outro lado, doses mais altas, produziram significativa hipotensão e bradicardia (Chen et al., 2001). Outros autores (Zhu et al., 2004) evidenciaram que tanto em ratos anestesiados com falência cardíaca como em controles (Sham), a microinjeção de doador de NO na RVLM foi capaz de diminuir a PAM basal e a atividade do nervo simpático renal. Estes autores defendem que NO endógeno da RVLM inicia importante papel na regulação da saída simpática e sugerem que ele promova inibição. No entanto, dados utilizando animais acordados mostraram que usando outros doadores de NO na RVLM também obtem-se aumentos de PA (Martins-Pinge et al., 1997; 1999).

Em nosso estudo, a microinjeção unilateral de um doador de NO, o DeaNONOate causou aumento imediato na resposta pressora, tanto nos animais treinados como nos sedentários, corroborando dados prévios do laboratório utilizando outros doadores de NO (Martins-Pinge et al., 1997; 1999). Esse aumento da resposta pressórica pode ser devido a uma liberação de glutamato ou inibição GABAérgica. Dados prévios de Wu et al., (2001) em gatos, também indicaram efeitos excitatórios via glutamato através de microinjeção de NMDA e formação de NO na RVLM. Já os ratos submetidos à natação tiveram maior resposta pressora mediante a microinjeção do doador de NO na RVLM. Este dado sugere que o treinamento físico parece levar a um aumento na sensibilidade ao NO na área RVLM, no entanto, os mecanismos pelos quais esse efeito ocorreu ainda não são conhecidos.

A inibição da enzima NOS também parece influenciar na modulação autonômica da RVLM. Considerando isso, utilizamos o L-NAME para inibir tanto as vias de produção da eNOS como da nNOS, sendo considerado um inibidor da via constitutiva. Neste estudo, foi observado que a microinjeção de L-glutamato na RVLM de ratos treinados antes da microinjeção de L-NAME provocou menor resposta pressora comparado aos sedentários e que após o L-NAME, os aumentos da pressão arterial não foram diferentes entre os grupos. Estudo prévio de Martins-Pinge e colaboradores (2007) evidenciou respostas similares com glutamato na RVLM de ratos sedentários, com aumentos de PAM e bradicardia ou taquicardia, todavia em seu estudo, após o L-NAME tais respostas foram praticamente abolidas.

Em animais acordados (Martins-Pinge et al., 2007) o bloqueio unilateral da nNOS diminuiu a PAM e FC, o que sugere, uma possível ação simpatoexcitatória para a nNOS na RVLM. Somado a isso, nesse mesmo estudo, a resposta pressora ao glutamato depois do inibidor da nNOS foi atenuada em quase 50% comparada a primeira microinjeção, sendo que os valores de FC foram praticamente abolidos. Nossos dados corroboram com essa hipótese, pois, a microinjeção de L-glutamato nos animais sedentários após a administração de N-propyl causou uma tendência a menor variação pressórica, o que sugere que a nNOS deve estar colaborando com a excitação simpática na RVLM em animais acordados. Os resultados obtidos após a microinjeção do inibidor da nNOS em animais treinados são semelhantes aos obtidos com o scavenger, onde as diferenças ocorridas nas respostas pressóricas do glutamato entre sedentários e treinados, desaparecem com o bloqueio da nNOS, sugerindo que o NO produzido pela nNOS parece ter um papel relevante na modulação da resposta pressora ao glutamato na RVLM após treinamento físico.

Em relação à iNOS na RVLM, os dados encontrados na literatura apresentam-se contraditórios. Estudo de Chan e colaboradores (2003) demonstrou que em ratos anestesiados a microinjeção bilateral de inibidor da iNOS (S-methylisothiourea) na RVLM produziu aumentos na PAM, FC e análise espectral da pressão arterial sistólica, sugerindo um papel inibitório para a iNOS na RVLM. No trabalho de Ally e colaboradores de 2006 os autores observaram que após o bloqueio da iNOS com Aminoguanidina os aumentos da PAM, FC e níveis de glutamato locais foram atenuados durante a contração muscular estática, sugerindo que a iNOS possua um papel excitatório na RVLM. No entanto, esses estudos foram realizados em animais anestesiados e sabe-se bem que o efeito da anestesia é fator limitante na análise dos parâmetros cardiovasculares, pois, interfere diretamente na transmissão dos sinais neurais (Bachelard et al., 1990).

Neste sentido, estudo de Martins-Pinge e colaboradores (2007) realizaram experimentos com animais acordados na tentativa de mimetizar os efeitos da anestesia nos parâmetros cardiovasculares. Foi observado aumento da resposta pressora ao glutamato acompanhado de taquicardia após a microinjeção de inibidor da iNOS (Aminoguanidina) na RVLM. Os autores sugerem que o NO endógeno produzido pela isoforma iNOS pode interagir com a neurotransmissão glutamatérgica da RVLM inibindo as respostas cardiovasculares. Essa informação vai contra os

achados do presente estudo, no qual se observou menor resposta pressora ao glutamato após inibidor da iNOS. No entanto, o inibidor utilizado no presente estudo (1400W) é diferente do estudo anterior e trabalhos que tenham utilizado a mesma substância não existem na literatura para possíveis comparações.

Os dados de qPCR mostraram que a isoforma eNOS na RVLM estava diminuída após o treinamento físico, e que embora não tenha sido observado diferença estatisticamente significante, a expressão da iNOS apresentou uma tendência a ser menor também nos animais treinados comparado com os sedentários. Em relação a nNOS no entanto, não observamos alterações significantes na expressão entre sedentários e treinados. Esses achados foram inesperados ao nosso ponto de vista, já que a literatura tem sugerido que a produção de NO na periferia aumenta com o treinamento físico aeróbico. Somado a isso, os dados de expressão gênica de eNOS e iNOS apresentaram co-relação significativa com os dados de FC basal para os animais de ambos os grupos. Nesse sentido, embora não haja dados a respeito da expressão da NOS comparativos na literatura e nem tão pouco sobre a influencia da eNOS e iNOS na FC de repouso, podemos especular a hipótese que, o treinamento físico favorece aumento da produção e liberação de NO pelo endotélio dos vasos, e que este aumento ao nível da RVLM, possa levar a um “downregulation” da NOS por um mecanismo de autoregulação, sendo que, ao final das 4 semanas de natação, fase onde realizamos as medidas de sua produção, essa expressão gênica estaria menor. Se de fato essa hipótese puder ser comprovada, talvez explique a menor atividade simpática (devido a menor resposta pressora pelo glutamato) pela RVLM nos animais treinados e a co-relação com os valores de bradicardia de repouso para os animais treinados. Assim, esses achados nos sugerem que o NO derivado dessas enzimas (eNOS e iNOS) podem de fato ser alterados pelo treinamento físico, influenciando na modulação de parâmetros autonômicos relacionados ao controle cardiovascular.

Além desses dados, no presente estudo também foi avaliado a sensibilidade baroreflexa em animais sedentários ou submetidos ao protocolo de treinamento por natação. Os animais treinados apresentaram maior bradicardia de repouso e uma maior sensibilidade baroreflexa, caracterizada pelo aumento do ganho. Esses achados corroboram com outros trabalhos da literatura que também avaliaram a sensibilidade baroreflexa utilizando diferentes protocolos de treinamento físico (Brum et al., 2000; Medeiros et al., 2004) e nos indica que o aumento do

ganho baroreflexo pelo treinamento físico conferiu aos animais uma habilidade de melhor responder aos aumentos e diminuições da PA, evidenciando os efeitos benéficos do treinamento físico para manutenção da homeostasia cardiovascular.

7 CONCLUSÃO

Em resumo, os dados aqui apresentados evidenciaram que o treinamento de natação proposto aos animais provocou importantes alterações em parâmetros relacionados á composição corporal e bioquímica plasmática, sendo considerado um eficiente protocolo de exercício aeróbio para ratos. Além disso, a natação parece ter contribuído para adaptações autonômicas do controle cardiovascular por meio da ação modulatória do óxido nítrico na área RVLM. Apesar disto, acreditamos que outras metodologias, como estudos de eletrofisiologia ou in vitro utilizando neurônios da RVLM, possam contribuir para elucidar os mecanismos envolvidos nesses fenômenos fisiológicos promovidos pelo exercício.

REFERÊNCIAS

- AFONSO, M.; de SOUZA, C.N.; ZAGATTO, A.M.; LUCIANO, E. Respostas metabólicas agudas ao exercício físico moderado em ratos Wistar, *Revista Motriz*, v.9, n.2, p.83-88, 2003.
- ALLY, A. Ventrolateral medullary control of cardiovascular activity during muscle contraction. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, v.23, p. 65-86, 1998.
- ALLY, A.; PHATTANARUDEE, S.; KABADI, S.; PATEL, M.; MAHER, T.J. Cardiovascular responses and neurotransmitter changes during static muscle contraction following blockade of inducible nitric oxide synthase (iNOS) within the ventrolateral medulla. *Brain Research*, v.1090, p.123-133, 2006.
- ALLY, A.; KABADIA, S.; PHATTANARUDEEA, S.; PATEL, M.; MAHERA, T.J. Neuronal Nitric Oxide Synthase (nNOS) blockade within the ventrolateral medulla differentially modulates cardiovascular responses and nNOS expression during static skeletal muscle contraction. *Brain Research*, v.1150, p. 21-31, 2007.
- ARAÚJO, C.G.S. Fisiologia do exercício físico e hipertensão arterial. Uma breve introdução. *Revista Hipertensão*, v.4, 2001.
- BACHELARD, H.; GARDINER S.M.; BENNETT, T. Cardiovascular responses elicited by chemical stimulation of the rostral ventrolateral medulla in conscious, unrestrained rats. *Journal Autonomic Nervous System*, v.31, p.185-90, 1990.
- BECKER, L.K.; SANTOS R.A.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M.J. Cardiovascular effects of angiotensin II and angiotensin-(1-7) at the RVLM of trained normotensive rats. *Brain Research*, v.1040, p.121-128, 2005.
- BERGMEYER, H.U.; BERNT, E. Determination of glucose with glucoseoxidase and peroxidase. In *Methods of Enzymatic Analysis, Bergmeyer*, p.1205-15, 1974.
- BREDT, D.S.; HWANG, P.M.; SNYDER, S.H. Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature*, v.347, n.6295, p. 768-70, 1990.
- BRUM, P.C.; FORJAZ, C.L.M.; TINUCCI, T., NEGRÃO, C.E. Adaptações agudas e crônicas do exercício físico no sistema cardiovascular. *Revista Paulista de Educação Física*, São Paulo, v.18, p.21-31, 2004.
- BUSNARDO, C.; CRESTANI, C.C.; TAVARES, R.F.; RESSTEL, L.B.M.; CORREA, F.M.A. Cardiovascular responses to L-glutamate microinjection into the hypothalamic paraventricular nucleus are mediated by a local nitric oxide-guanylate cyclase mechanism. *Brain Research*, v.1344, p.87-95, 2010.
- CARINGI, D.; MAHER, T.J.; CHAIYAKUL, P.; ASMUNDSSON, G.; ISHIDE, T.; ALLY, A. Extracellular glutamate increases in rostral ventrolateral medulla during static muscle contraction. *European Journal of Physiology*, v.435, n.4, p.465-71, 1998.

CHAN, S.H.H.; WANG, L-L.; WANG, S-H.; CHAN, J.Y.H. Differential cardiovascular responses to blockade of nNOS or iNOS in rostral ventrolateral medulla of the rat. ***British Journal of Pharmacology***, v.33, p.606-614, 2001.

CHAN, S.H.H.; WANG, L-L.; CHAN, J.Y.H. Differential engagements of glutamate and GABA receptors in cardiovascular actions of endogenous nNOS or iNOS at rostral ventrolateral medulla of rats. ***British Journal of Pharmacology***, v.138, 584-93, 2003.

CHEN, C.Y.; DICARLO, S.E. Daily exercise and gender influence arterial baroreflex regulation of heart rate and nerve activity. *American Journal of Physiology*, v.271, p.1840-48, 1996.

CHEN, S.Y.; MAO, S.P. CHAI, C.Y. Role of nitric oxide on pressor mechanisms within the Dorsomedial and rostral ventrolateral medulla in anaesthetized cats. ***Clinical and experimental pharmacology and physiology***, v. 28, p.155-63, 2001.

COX, R.H.; HUBBARD, J.W.; LAWLER, J.E.; SANDERS, B.J.; MITCHELL, V.P. Cardiovascular and sympathoadrenal responses to stress in swim-trained rats. *Journal Applied of Physiology*, v.58, n.4, p.1207-14, 1985.

DAMPNEY, R.A.L. Functional organization of central pathways regulating the cardiovascular system. ***Physiological Reviews***, v.74, n.2, p.323-64, 1994.

De ABREU, S.B.; LENHARD, A.; MEHANNA, A.; DE SOUZA, H.C.; CORREA, F.M.; HASSER, E.M.; MARTINS-PINGE, M.C. Role of paraventricular nucleus in exercise training-induced autonomic modulation in conscious rats. ***Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical***, v.148, n.1-2, p.28-35, 2009.

DE MELLO AIRES, M. ***Fisiologia***. Editora Guanabara Koogan S/A, Terceira Edição, 2008.

De Souza, C.G.; Michelini, L.C.; Fior-Chadi, D.R. Receptor changes in the nucleus tractus solitarii of the rat after exercise training. ***Medicine and Science in Sports and Exercise***, v.33, p.1471-76, 2001.

DI FRANCESCO MARINO, S.; SCIARTILLI, A.; DI VALERIO, V.; DI BALDASSARRE, A.; GALLINA, S. The effect of physical exercise on endothelial function. ***Sports in Medicine***, v.39, n.10, p.797-812, 2009.

DICARLO, S.E.; BISHOP, V.S. Exercise training enhances cardiac afferent inhibition of baroreflex function. ***American Journal of Physiology***, v.258, p.212-20, 1990.

DUN, N.J.; DUN, S.L.; FORSTERMANN, U. Nitric oxide synthase immunoreactivity in rat pontine medullary neurons. ***Neuroscience***, v.59, p.429-445, 1994.

FÖRSTERMANN, U.; GATH, I.; SCHWARZ, P.; CLOSS, E.I.; KLEINERT, H. Isoforms of nitric oxide synthase. Properties, cellular distribution and expressional control. ***Biochemical Pharmacology***, v.50, n.9, p.1321-32, 1995.

GREEN, D.J.; MAIORANA, A.; O'DRISCOLL, G.; TAYLOR, R. Effect of exercise training on endothelium-derived nitric oxide function in humans. *The Journal of Physiology*, v. 561, p.1-25, 2004.

GUERTZENSTEIN, P.G. Silver A. Fall in blood pressure produced from discrete regions of the ventral surface of the medulla by glycine and lesions. *Journal of Physiology*, v. 242, p.489-503, 1974.

GUILLEMIN, R.; CLAYTON, G.W.; LIPSCOMB, H.S.; SMITH, J.D. Fluorometric measurement of rat plasma and adrenal corticosterone concentration a note on technical details. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*; v.53, n.5, 1959.

GUTMANN, I.; WAHLEFELD, W. L-(+)-Lactate. Determination with lactate dehydrogenase and NAD. In *Methods of Enzymatic Analysis Bergmeyer*, v.1464-72, 1974.

HEAD, G.A.; MCCARTY, R. Vagal and sympathetic components of the heart rate range and gain of the baroreceptor-heart rate reflex in conscious rats. *Journal of Autonomic Nervous System*, v.21, p.203-13, 1987.

.HIGA, K.T.; MORI, E.; VIANA, F.F.; MORRIS, M.; MICHELINI, L.C. Baroreflex control of heart rate by oxytocin in the solitary-vagal complex. *American Journal of Physiology and Regulatory, Comparative and Integrative Physiology*, v.282, n.2, p.537-45, 2002.

HIROOKA, Y.; POLSON, J.W.; DAMPNEY, R.A.L. Pressor and sympathoexcitatory effects of nitric oxide in the rostral ventrolateral medulla. *Journal of Hypertension*, v.14, p.1317-24, 1996.

HUANG, C-C.; CHAN, S.H.H.; HSU, K-S. GMPc/Protein Kinase G-Dependent Potentiation of Glutamatergic Transmission Induced by Nitric Oxide in Immature Rat Rostral Ventrolateral Medulla Neurons in Vitro. *Molecular Pharmacology*, v.64, n.2, 2003.

ICHIYAMA, R.; GILBERT, A.; WALDROP, G.; IWAMOTO, A. Changes in exercise activation of diencephalic and brainstem cardiorespiratory areas after training. *Brain Research*, v.947, p.225-233, 2002.

IRIGOYEN, M.C.; ANGELIS, K.D.; SCHAAN, B.D.A.; FIORINO, P.; MICHELINI, L.C. Exercício físico no diabetes melito associado à hipertensão arterial sistêmica. *Revista Brasileira de Hipertensão*, v.10, p.109-17, 2003.

ISHIDE, T.; HARA, Y.; MAHER, T.J.; ALLY, A. Glutamate neurotransmission and nitric oxide interaction within the ventrolateral medulla during cardiovascular responses to muscle contraction. *Brain Research*, v.874, p.107-115, 2000.

ISHIDE, T.; NAULIB, S.M.; MAHERC, T.J.; ALLYA, A. Cardiovascular responses and neurotransmitter changes following blockade of nNOS within the ventrolateral medulla during static contraction muscle. *Brain Research*, v.977, p.80-89, 2003.

ISHIDE, T.; PREUSSA, C.V.; MAHERB, T.J.; ALLYA, A. Neurochemistry within ventrolateral medulla and cardiovascular effects during static exercise following eNOS antagonism. **Neuroscience Research**, v.52, p.21-30, 2005.

KAGIYAMA, S.; TSUCHIHASHI, T.; ABE, I.; FUJISHIMA, M. Cardiovascular effects of nitric oxide in the rostral ventrolateral medulla of rats. **Brain Research**, v.757, n.1, p.155-58, 1997.

KENT, B.B.; DRANE, J.W.; BLUMENSTEIN, B.; MANNING, J.W. A mathematical model to assess changes in the baroreceptor reflex. **Cardiology**, v.57, p.295-310, 1972.

KISHI, T., HIROOKA, Y.; SAKAI, K.; SHIGEMATSU, H.; SHIMOKAWA, H.; TAKESHITA, A. Over expression of eNOS in the RVLM causes hypotension and bradycardia via GABA release. **Hypertension**, v.38, p.896-901, 2001.

KISHI, T.; HIROOKA, Y.; ITO, K.; I SAKAI, K.; SHIMOKAWA, H.; TAKESHITA, A. Cardiovascular Effects of Overexpression of Endothelial Nitric Oxide Synthase in the Rostral Ventrolateral Medulla in Stroke-Prone Spontaneously Hypertensive Rats. **Hypertension**, v.39, p.264-268, 2002.

KISHI, T.; HIROOKA, Y.; KIMURA, Y.; SAKAI, K.; ITO, K.; SHIMOKAWA, H.; TAKESHITA, A. Overexpression of eNOS in RVLM Improves Impaired Baroreflex Control of Heart Rate in SHRSP. **Hypertension**, v.41, p.255-260, 2003.

KIELY, J.M.; GORDON, F.J. Role of rostral ventrolateral medulla in centrally mediated pressor responses. *American Journal of Physiology*, v.267, p.1549-56, 1994.

KNOWLES, R.G.; PALACIOS, M.; PALMER, R.M.J.; MONCADA, S. Kinetic characteristics of nitric oxide synthase from rat brain. **Biochemical Journal**, v.269, p.207-210, 1990.

KRIEGER, E.M.; DA SILVA, G.J.; NEGRÃO, C.E. Effects of exercise training on baroreflex control of the cardiovascular system. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.940, p.338-47, 2001.

LILLANEY, R.; MAHER, T.J.; CHAIYAKUL, P.; ALLY, A. Changes in extracellular glutamate and pressor response during muscle contraction following AMPA-receptor blockade in the RVLM and CVLM. **Brain Research**, v.844, n.1-2, p.164-73, 1999.

MACK, G.W.; THOMPSON, C.A.; DOERR, D.F.; NADEL, E.R.; CONVERTINO, V.A. Diminished baroreflex control of forearm vascular resistance following training. **Medicine and science in sports and exercise**, v.23, p.1367-74, 1991.

MACMICKING, J.; XIE, Q.W.; NATHAN, C. Nitric oxide and macrophage function. **Annual Review of Immunology**, v.15, p.323-50, 1997.

MARTINS-PINGE, M.C.; BARALDI-PASSY, I.; LOPES, O.U. Excitatory effects of nitric oxide within the rostral ventrolateral medulla of free moving rats. **Hypertension**, v.30, n.2, p.704-707, 1997.

MARTINS-PINGE, M.C.; ARAÚJO, G.C.; LOPES, O.U. Nitric oxide-dependent guanylyl cyclase participates in the glutamatergic neurotransmission within the rostral ventrolateral medulla of awake rats. *Hypertension*, v.34, n.2, p.748-751, 1999.

MARTINS-PINGE, M.C.; BECKER, L.K.; LUCCIZANO, G.M.R.; ZOCCAL, D. B.; R. VASCONCELOS NETO, R.; BASSO, L.S; DE SOUZA, H.C.D.; LOPES, O.U. Attenuated pressor responses to amino acids in the rostral ventrolateral medulla after swimming training in conscious rats. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical* v.122, p. 21-28, 2005.

MARTINS-PINGE, M.C.; GARCIA, M.R.; ZOCCAL, D.B.; CRESTANI, C.C.; PINGE-FILHO, P. 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. Cardiovascular and autonomic modulation by the central nervous system after aerobic exercise training. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v.44, n.9, p.848-54, 2011.

MASTELARI, R.B.; DE SOUZA, H.C.; LENHARD, A.; DE AGUIAR CORREA, F.M.; MARTINS-PINGE, M.C. Nitric oxide inhibition in paraventricular nucleus on cardiovascular and autonomic modulation after exercise training in unanesthetized rats. *Brain Research*, v.1375, p.68-76, 2011.

MCALLEN, R.M.; NEIL, J.J.; LOEWY, A.D. Effects of kainic acid applied to the ventral surface of the medulla oblongata on vasomotor tone, the baroreceptor reflex and hypothalamic autonomic responses. *Brain Research*, v.238, p.65-76, 1982.

MCALLISTER, R.M.; LAUGHLIN, M.H. Vascular nitric oxide: effects of physical activity, importance for health. *Essays Biochemicals*, v.42, p.119-31, 2006.

MEDEIROS, A.; OLIVEIRA, E.M.; GIANOLLA, R.; CASARINI, D.E.; NEGRÃO, C.E; BRUM, P.C. Swimming training increases cardiac vagal activity and induces cardiac hypertrophy in rats. *Brazilian Journal of Medicine and Biological Research*, v.37, n.12, p.1909-17, 2004.

MICHELINI, L.C.; STERN, J.E. Exercise-induced neuronal plasticity in central autonomic networks: role in cardiovascular control. *Experimental Physiology*, v.94, n.9, p.947-60, 2009.

MITCHELL, J.; VICTOR, G. *Neural control of the cardiovascular system: insights from muscle sympathetic nerve recordings in humans. Medicine and Science in Sports and Exercise*, v.28, n.10, p.60-69, 1996.

MITCHELL, J.H.; KAUFMAN, M.P.; IWAMOTO, G.A. The exercise pressor reflex: its cardiovascular effects, afferent mechanisms, and central pathways. *Annual Reviews of Physiology*, v.45, p.229-42, 1983.

MORIMOTO, S.; SASAKI, S.; MIKI, S.; KAWA, T.; NAKAMURA, K.; ITOH, H.; NAKATA, T.; TAKEDA, K.; NAKAGAWA, M.; FUSHIKI, S. Nitric oxide is an excitatory modulator in the rostral ventrolateral medulla in rats. *American Journal of Hypertension*, v.13, p.1125-34, 2000.

MUELLER, P. J. Exercise training attenuates increases in lumbar sympathetic nerve activity produced by stimulation of the rostral ventrolateral medulla. ***Journal Applied Physiology***, v.102, p.803-813, 2007.

NEGRÃO, C.E.; MOREIRA, E.D.; BRUM, P.C.; DENADAI, M.L.D.R.; KRIEGER, E.M. Vagal and sympathetic controls of the heart rate during exercise in sedentary and trained rats. ***Brazilian Journal of Medical and Biological Research***, v.25, p. 1045-52, 1992.

NEGRAO, C.E.; IRIGOYEN, M.C.; MOREIRA, E.D.; BRUM, P.C.; FREIRE, P.M.; KRIEGER, E.M. Effect of exercise training on RSNA, baroreflex control, and blood pressure responsiveness. ***American Journal of Physiology***, v.265, p.365-370, 1993.

PAXINOS, G.; WATSON, C. ***The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates***, Fourth edition. Academic Press, New York, 1998.

PFÄFFL, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time-RT-PCR. ***Nucleic Acids Research***, v.29, n.900, 2001.

RAVEN, P.B.; PAWELCZYK, J.A. Chronic endurance exercise training: a condition of inadequate blood pressure regulation and reduced tolerance to LBNP. ***Medicine and Science in Sports and Exercise***, v.25, p.713-21, 1993.

REIS, D.J.; GOLANOV, E.V.; RUGGIERO, D.A.; SUN, M.K. Sympatho-excitatory neurons of the rostral ventrolateral medulla are oxygen sensors and essential elements in the tonic and reflex control of the systemic and cerebral circulations. ***Journal of Hypertension***, v.12, p.159-180, 1994.

RODRIGUES, B.; JORGE, L.; MOSTARDA, C.T.; ROSA, K.T.; MEDEIROS, A.; MALFITANO, C.; DE SOUZA A.L.J.; VIEGAS, K.A.; LACCHINI, S.; CURI, R.; BRUM, P.C.; DE ANGELIS, K.; IRIGOYEN, M.C. Aerobic exercise training delays cardiac dysfunction and improves autonomic control of circulation in diabetic rats undergoing myocardial infarction. ***Journal of Cardiac Failure***, v.18, n.9, p.734-44, 2012.

RONDON, M.U.P.B.; BRUM, P.C. Exercício físico como tratamento não farmacológico da hipertensão arterial. ***Revista Brasileira de Hipertensão***, v.10, p.134-7, 2003.

SANT'ANA, J.E.; PEREIRA, M.G.A.G.; SILVA, V.J.D.; DAMBRÓS, C.; COSTA-NETO, C.M.; SOUZA, H.C.D. Effect of the duration of daily aerobic physical training on cardiac autonomic adaptations. ***Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical***, n.159, p.32-37, 2011.

SILVA, G.J.J.; BRUM, P.C.; NEGRÃO, C.E.; KRIEGER, E.M. Acute and chronic effects of exercise on baroreflexes in spontaneously hypertensive rats. ***Hypertension***, v.30, p.714-9, 1997.

SILVERTHORN, D.U. ***Fisiologia integrada. Fisiologia humana. Uma abordagem integrada***. 2a ed. 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, 1994.

- SHAPOVAL, L.N.; SAGACH, V.F.; POBEGAILO, L.S. Nitric oxide influences ventrolateral medullary mechanisms of vasomotor control in the cat. **Neuroscience**, v.86, p.9030-33, 1991.
- SPERETTA, G. F.F.; ROSANTE, M.C.; DUARTE, F.O.; LEITE, R.D.; LINO, A.D.S.; ANDRE R. A., SILVESTRE, J.G.O.; ARAÚJO, H.S.S.; DUARTE, A. C.G.O. The effects of exercise modalities on adiposity in obese rats. **Clinics**, v.67, n12, p.1469-77, 2012.
- SZABÓ, C.; THIEMERMANN, C. Regulation of the expression of the inducible isoform of nitric oxide synthase. **Advances in Pharmacology**, v. 34, p.113-53, 1995.
- TABRIZIAN, K.; NAJAFI, S.; BELARAN, M.; HOSSEINI-SHARIFABAD, A.; AZAMI, K; HOSSEINI, A.; SOODI, A.; KAZEMI, A.; KEBRIAEEZADEH, A.; SHARIFZADEH, M. Effects of Selective iNOS Inhibitor on Spatial Memory in Recovered and Non-recovered Ketamine Induced-anesthesia in Wistar Rats, **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v.9, n.3, p.313-20, 2010.
- TALMAN, W.T.; PERRONE, M.H.; REIS, D.J. Evidence for L-glutamate as the neurotransmitter of baroreceptor afferent nerve fibers. **Science**, v.209, p.813-15, 1980.
- TROMBETTA, I.C.; BATALHA, L.T.; RONDON, M.U.P.B.; LATERZA, M.C.; KUNIYOSHI, F.H.S.; BARRETTO, A.C.P.; HALPERN, A.; VILLARES, S.M.F.; NEGRÃO, C.E. Weight loss improves muscle metaboreflex control in obesity. **American Journal of Physiology, Heart and Circulatory Physiology**, v.285, p.974-82, 2003.
- TSENG, C.J.; LIU, H.Y.; LIN, H.C.; GER, L.P.; TUNG, C.S.; YEN, M.H. Cardiovascular effects of nitric oxide in the brain stem nuclei of rats. **Hypertension**, v.27, p.36-42, 1996.
- VÉRAS-SILVA, A.S.; MATTOS, K.C.; GAVA, N.S.; BRUM, P.C.; NEGRÃO, C.E.; KRIEGER, E.M. Low-intensity exercise training decreases cardiac output and hypertension in spontaneously hypertensive rats. **American Journal of Physiology: Heart and Circulatory Physiology**, v.273, n. 42, p.2627-31, 1997.
- WILTERDINK, E.J.; BALLOR, D.L.; KEESEY, R.E. Changes in body composition and daily energy expenditure induced in rats during eight weeks of daily swim training. **International Journal of Obesity and Relatives Metabolics Disorders**, v.17, n.3, p.139-43, 1993.
- WU, W.C.; WANG, Y.; SU, C.K.; CHAI, C.Y. The nNOS / cGMP signal transducing system is involved in the cardiovascular response induced by activation of NMDA receptors in the rostral ventrolateral medulla of cats. **Neuroscience Letters**, v. 310, p.121-124, 2001.
- YAO, S.T.; ANTUNES, VAGNER R.; PATON, J.F.R.; MURPHY, D. Osmotic regulation of neuronal nitric oxide synthase expression in the rat amygdala: Functional role for nitric oxide in adaptive responses? **Journal of Neuroscience Research**, v.85, n.2, p.410-22, 2007.

ZANZINGER, J.; CZACHURSKI, J.; SELLER, H. Inhibition of basal and reflexmediated sympathetic activity in the RVLM by nitric oxide. ***American Journal of Physiology***, v.268, p.958-62, 1995.

ZHU, G.Q.; GAO, X.Y.; ZHANG, F.; WANG, W. Reduced nitric oxide in the rostral ventrolateral medulla enhances cardiac sympathetic afferent reflex in rats with chronic heart failure, ***Acta Physiologica Sinica***, , v.56, n.1, p.47-53, 2004.

ANEXOS

ANEXO A

Biochemical characterization and body composition of a model of physical training by swimming in rats.

2839 – First Version – Full Paper**Biochemical characterization and body composition of a model of physical training by swimming in rats**

H. A. Raquel, H.M. de Souza, C.T.B.V. Zaia, M.C. Martins-Pinge

Running title: body composition and swimming training in rats

From the Department of Physiological Sciences, State University of Londrina, Londrina, PR; Brazil

Correspondence to: Marli Cardoso Martins-Pinge, PhD, Departamento de Ciências Fisiológicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina; Rodovia Celso Garcia Cid, Km 380, Campus Universitário, CEP 86055-900 Londrina, PR, Brazil.

FAX - 55-43-3371.4407

PHONE - 55-43-3371.5927

E-MAIL - martinspinge@uel.br

Acknowledgment: To Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for the fellowship to Hiviny de Ataídes Raquel and Marli Cardoso Martins Pingue

ABSTRACT: Our laboratory has been studied cardiovascular aspects using a protocol of physical training by swimming in rats. However this protocol had not been yet characterized in biochemical and body composition aspects, which could better support previous findings and validate the model. To this end Wistar rats were submitted to swimming training (Gtr) for four weeks or made sedentary (Gsed). After training the blood was collected for corticosterone, lactate and glucose analysis, and the visceral and gonadal fat, soleus muscle, adrenal glands and heart were removed to be weighted. The body mass index was also estimated. Our data showed that this protocol of swimming promoted less body weight gain, lower values for retroperitoneal and perigonadal fat, higher heart weight and no changes in the weights of the adrenal glands and soleus muscle between trained and sedentary rats. Furthermore, it was observed that the levels of corticosterone were not altered after exercise training (Gsed: 5.31 ± 0.38 mg / dL vs. Gtr: 5.09 ± 0.50 mg / dL) and glucose, only changed when it was evaluated immediately after training, been increased compared to sedentary (Gsed: 124.14 ± 2.56 mg / dL vs. Gtr: 140.26 ± 04.01 mg / dL). Already lactate decreased in animals trained in both conditions (0h: Gsed: 3.74 ± 0.15 mM vs. Gtr/0h: 3.22 ± 0.25 mM, and 24 h: Gsed: 3.74 ± 0.15 mM vs. Gtr/24h: 2.96 ± 0.13 mM). Thus, we believe that this protocol of physical training is valid to provide changes that benefit health promotion.

Key words: Corticosterone. Lactate. Glucose. Fat tissue. Body weight. Exercise

Introduction

Physical exercise is characterized by a situation that alters bodily homeostasis, and leads to various physiological adaptations to the cardiovascular system (1), respiratory and metabolic (2) for energy maintenance either during or after physical exertion. The increase in cardiac output, heart rate (3), ventilation, releasing hormones (4) and increased sympathetic activity (5) are some examples of adaptations to meet the acute triggered new metabolic demand. Chronic changes in physiological and metabolic parameters such as decrease in blood pressure, heart rate (6), glucose, lactate, loss of fat and muscle mass gain (2,4) are some of the beneficial effects of physical training to the body and therefore, the low-intensity aerobic training have demonstrated strong ally in the treatment of degenerative diseases such as hypertension (7), Diabetes Mellitus (8), obesity (9) and heart failure (10).

Many studies with aerobic exercise protocols for rats have been developed in the last decades (1-3). These investigations seek to highlight the different mechanisms by which exercise training causes changes in the body and how it improves the survival of animals and physical ability, plus reverse pathophysiological aspects. Swimming has been an important methodological tool to

investigate changes in body composition, energy metabolism, cardiovascular and respiratory function in animals, therefore, presents itself as an efficient intervention on different physiological parameters (11,12). Our laboratory has been studied the cardiovascular aspects of a protocol of physical training by swimming in rats and observed that this protocol promotes resting bradycardia (13-17), lower pressor response to Lglutamate in RVLM (13), decreased sympathetic and increased parasympathetic autonomic modulation to the heart (15) and tonic effects on blood pressure and heart rate changed by the paraventricular nucleus of the hypothalamus (15,16). However, this protocol of physical training by swimming in rat had not yet been characterized in the biochemical aspects and body composition, which could better support previous findings and validate the model.

Therefore, in view of the swimming protocol used by our group was effective in altering peripheral and central cardiovascular parameters, the objective of this study was to characterize this model of physical training for swimming in rats on the aspects of body composition and corticosterone, lactate and glucose plasma levels.

Materials and methods

Animals

All experiments were performed in adult male Wistar rats (n=55), weighting 220 to 240 g (start training), supplied by the central animal house of the State University of Londrina in Brazil. The animals were housed in Perspex cages in a room with a 12:12 h light/dark cycle. Food and water were always available except during the experiments. All experimental protocols were performed in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and the Ethical Principles for Animal Experimentation established by the Brazilian Committee for Animal Experimentation (COBEA) and were approved by the animal experimentation Ethics Committee of the State University of Londrina (process no. 3524.2011.45).

Swimming training protocol

The swimming training (ST) protocol was performed in a glass tank with vertical sides filled with lukewarm water (31 ± 1 °C) with 4000 cm² surface area and 60 cm deep and occurred at the same time every day (between 11:00 a.m. and 1:00 p.m.). The ST consisted of twenty swimming sessions (5 days/week, 4 weeks) of 60 min, according to previous study (13). The animals submitted to swimming training were denominated Gtr and the sedentary were Gsed.

Body composition

Body weight

The body weight of the animals was assessed from the first day they arrived from Central Animal Facility of the State University of Londrina, until the last day of the experimental protocol. Body weight was measured before exercise training, using a digital scale and annotated data in a spreadsheet for further analysis of the growth curve and weight gain of the animals.

Lee index and naso-anal length

The body mass index for rats was estimated by calculating the Lee index [$\sqrt[3]{\text{body weight} / \text{naso-anal distance} \times 1000}$]. The naso-anal length was obtained by tape measure, in the final moment of the experiment, when the animals were anesthetized for subsequent euthanasia and tissue collection.

Tissues collection

The animals were anesthetized with sodium pentobarbital (40 mg / kg, ip) to measure nasoanal length and then were sacrificed by guillotine for removal of tissues: visceral and gonadal fat; soleus muscle, adrenal glands and heart to be weighted.

Biochemical analysis

Corticosterone

Twenty-four hours after the last exercise session the animals were housed in a silent environment, where they remained at rest and fed for 30 minutes. Then, euthanasia was performed by guillotine for withdrawing of blood and plasma separation. Serum samples were transferred to heparinized glass tubes and kept at 4 ° C until centrifugation at 2000 rpm (4 ° C, 15 minutes). The plasma obtained was stored at -20 ° C and used for biochemical determination.

The plasma concentration of corticosterone was determined by fluorimetric method modified of Guillemin (17), using standard corticosterone (1mg corticosterone in 10mL of anhydrous ethyl alcohol), dichloromethane, concentrated sulfuric acid, 0.1 M NaOH distilled water, anhydrous ethyl alcohol and 100 mL of plasma. Fluorescence was determined in a microplate reader Victor ®, with level of excitation 477, emission of 520 and sensitivity of 11. The concentration of corticosterone was obtained in µg/dL.

Lactate and glucose

In animals from Gtr and Gsed plasma lactate concentrations were analyzed at rest (24 hours after the last exercise session) and Gtr immediately after the last swimming session (0 h). Blood collection of animals at rest (24) was performed by decapitation whereas previously they were fed and housed in a quiet environment. The collecting blood after exercise (0 hours) was made in animals immediately after 60 minutes of swimming training.

Analysis of lactate was performed by an enzymatic method, using the technique of Gutman e Wahlefeld (18). The test consisted of 150 µ l of diluted plasma (20 µ L plasma + 1.0 ml H₂O) + 300 µ L of the reactive mixture. The specimens were 30 minutes in water bath and used 150 µL of distilled H₂O for reading (white 340nm). The equation used to calculate the concentration of lactate in the blood (mM) was: $[Lac] = 3.0 \times Abs \text{ (dilution dosage)} \times 51 \text{ (dilution sample)} \div 6.22 = 24.6 \times Abs$.

Glucose was also performed by an enzymatic method, using the technique of Bergmeyer e Bernt (19).

Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using the statistical program InStat (GraphPad, CA). The results were expressed as mean \pm SEM. The differences between the experimental and control groups were analyzed with the analysis of variance (ANOVA) test for multiple comparisons, followed by the Newman Keuls post hoc ($P < 0.05$ indicated significant differences between the rat groups).

Results

The weight gain of the animals was modified through physical training. The animals began the experimental protocol with similar body weight (Gsed: vs 264.30 \pm 3.91g. Gtr: 265.30 \pm 2.95g) and after the second week of swimming, trained animals already had values of less weight gain than sedentary individuals (Gsed : 295 \pm 2.20g vs. Gtr: 286.22 \pm 0.99g), and this was repeated within two weeks of training / sedentary lifestyle, and at the end of the fourth week the variation in weight gain was: (Gsed: 328.34 \pm 16.02 vs. Gtr : 309.22 \pm 1.11) (Fig. 1).

Changes in visceral fat followed the changes in body weight of the animals. At the end of four weeks of training, the trained animals showed lower values of relative retroperitoneal (Gsed: 0.90 \pm 0.09g vs. Gtr: 0.60 \pm 0.06) and perigonadal fat (Gsed: 0.82 \pm 0.05 vs. Gtr: 0.61 \pm 0.03) compared to inactive rats (Table 1). We also evaluated the relative weight of some organs and muscle. The relative weight of the heart of Gtr was statistically higher than the sedentary animals (Gsed: 0.33 \pm 0.01 vs. Gtr: 0.37 \pm 0.01, $p < 0,05$). Moreover, there was no difference in the relative weight of the adrenal glands: (Gsed: 0.019 \pm 0.002 vs. Gtr: 0.016 \pm 0.002) and soleus muscle (Gtr: 0109 \pm 0005 \pm 0106 \pm 0004) between sedentary and trained animals.

Regarding the biochemical variables there was no difference between the values of plasma corticosterone in the animals evaluated at rest, 24 hours after the last swimming session (Gsed: 5.31 \pm 0.38 mg / dL vs. Gtr: 5.09 \pm 0.50 mg / dL) (Table 2).

Plasma levels of glucose and lactate were assessed in two different situations: at rest (24 hours after exercise) and immediately after 60 minutes of swimming (0horas). It was observed that after swimming the glycemia of trained animals was greater than sedentary animals (Gsed: 124.14 ± 2.56 mg / dL vs. Gtr: 140.26 ± 04.01 mg / dL). However, at rest and 24hours after swimming, glucose levels of trained and sedentary rats were not different anymore (Gsed: 124.14 ± 2.56 mg / dL vs. Gtr: 121.93 ± 3.74 mg / dL). However, when compared the glucose levels of Gtr/0h with Gtr/24h we observed lower blood glucose for Gtr/24h (Gtr/24h: 121.93 ± 3.74 mg / dL vs. Gtr/0h: 140.26 ± 01.04 mg / dL) (Table 2).

The blood lactate levels were also analyzed in two stages as glucose. The animals of Gtr/0h had lower blood lactate values when compared to sedentary (Gsed: 3.74 ± 0.15 mM vs. Gtr/0h: 3.22 ± 0.25 mM), however, when compared to animals Gtr/24h these values were not different (Gtr/24h: 2.96 ± 0.13 vs. Gtr/0h: 3.22 ± 0.25 mM) (Table 2).

Discussion

The present study aimed to characterize some blood biochemical parameters important and possible to be changed by physical training as glucose, lactate and corticosterone, besides the comparison of body composition between sedentary animals and undergoing training protocol by swimming already used in prior studies of the group. Our data showed that this protocol of swimming promoted less body weight gain, lower values for retroperitoneal and perigonadal fat, higher heart weight and no changes in the weights of the adrenal glands and soleus muscle between trained and sedentary rats. Furthermore, it was observed that the levels of corticosterone were not altered after exercise training and glucose, only changed when it was evaluated immediately after training, been increased compared to sedentary. Already lactate decreased in animals trained in both conditions (0 and 24 h). Thus, we believe that this protocol of physical training is valid to provide changes that benefit health promotion.

The aspects with body composition in the sedentary rats in comparison with the swimming exercised rats have been observed by other researchers (20). Rats that swam daily weighed less than sedentary controls and had smaller adipose and lean tissue masses. The authors evaluated 1, 2, 4, 6 or 8 weeks

of daily (1 h) swim training and observed that the size of these body weight and composition changes grew as daily training progressed. Although we did not study the exercise training with longer duration, those effects were observed in our protocol of four weeks of swimming.

Heart weight was enhanced in our swimming trained rats, corroborating data from the literature (11). Cardiac hypertrophy is a well known characteristic of swimming training in response to various stimuli such as pressure and volume overload. It is denominated eccentric cardiac hypertrophy and it is associated with improved cardiac performance during exercise. On the other hand, strength-trained subjects, characterized by static isometric anaerobic exercise, show increased left ventricle wall thickness with a pattern of concentric geometry caused by pressure overload during exercise.

The effects of exercise training by swimming on plasma corticosterone and lactate have been also observed by other investigators. In the study of Cox and collaborators (12), untrained rats showed increased levels of lactate and corticosterone than did the trained rats when submitted to a swim test for 20 minutes. The authors addressed this effect to the element novelty, which has itself a potent effect on sympathoadrenal responses and may be, the trained rats were adapted to the situation. As we did not observe differences in the corticosterone level between groups we assume that the differences we have observed in the cardiovascular function in the other studies are not related with stress. Our data also showed that adrenal glands are not increased in trained rats, what confirms that the exercise protocol by swimming are not a promoter of chronic stress at rest, although we believe that during the exercise those parameters must be increased. The level of corticosterone may increase during swimming without overload in the beginning of training which appears to trigger factors stressful to the animals, activated by hypothalamic-pituitary-axis, as observed in other study after one single swim session (2). But with training, the adaptation occurs with this intensity of exercise performed, minimizing the effect of this stressor, and it may justify why it may increase less in the swimming trained animals.

It is known that the secretion of glucocorticoid hormones is stimulated during exercise, being dependent on its release the amount of ACTH released by the anterior pituitary. In the exercise, cortisol stimulates the production of glucose by the liver by activating gluconeogenesis and decreases its use, enhancing

the release of glucagon by pancreatic islets. Considering this, it explains why in our study glucose is increased after the last session of swimming training, on 0 h time. Although we did not measure, it may be possible that corticosterone could be also enhanced in this same time after swimming.

In conclusion, our data suggest that the protocol of swimming training we have been used may be useful to promote rehabilitation of pathological aspects in chronic degenerative diseases, like obesity and hypertension.

References

1. Brum, P.C.; Forjaz, C.L.M.; Tinucci, T., Negrão, C.E. Adaptações agudas e crônicas do exercício físico no sistema cardiovascular. *Revista Paulista de Educação Física* 2004; 18: 21-31.
2. Afonso, M., De Souza, C.N. Zagatto, A.M., Luciano, E. Respostas metabólicas agudas ao exercício físico moderado em ratos Wistar, *Revista Motriz* 2003; 9 (2): 83-88.
3. Negrão, C.E.; Moreira, E.D.; Brum, P.C.; Denadai, M.L.D.R.; Krieger, E.M. Vagal and sympathetic controls of the heart rate during exercise in sedentary and trained rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 1992; 25: 1045-52.
4. Thompson, P. D.; Crouse, S. F.; Goodpaster, B.; Kelley, D.; Moyna, N.; Pescatello, L. The acute versus chronic response to exercise. *Medicine and Science in Sports and Exercise* 2001; 33: 438-45.
5. Mitchell, J.; Victor, G. Neural control of the cardiovascular system: insights from muscle sympathetic nerve recordings in humans. *Medicine and Science in Sports Exercise* 1996; 28:60-9.
6. Higa , K.T.; Mori, E.; Viana, F.F.; Morris, M.; Michelini, L.C. Baroreflex control of heart rate by oxytocin in the solitary-vagal complex. *American Journal of Physiology and Regulatory, Comparative and Integrative Physiology* 2002; 282(2): 537-45.
7. Vêras-Silva, A.S.; Mattos, K.C.; Gava, N.S.; Brum, P.C.; Negrão, C.E.; Krieger, E.M. Lowintensity exercise training decreases cardiac output and hypertension in spontaneously hypertensive rats. *American Journal of Physiology: Heart and Circulatory Physiology* 1997; 273(42): 2627-31.
8. Rodrigues, B.; Jorge, L.; Mostarda, C.T.; Rosa, K.T.; Medeiros, A.; Malfitano, C.; De Souza A.L.J.; Viegas, K.A.; Lacchini, S.; Curi, R.; Brum, P.C.; De Angelis, K.; Irigoyen, M.C. Aerobic exercise training delays cardiac dysfunction and improves autonomic control of circulation in diabetic rats undergoing myocardial infarction. *Journal of Cardiac Failure* 2012; 18(9): 734-44.

9. Trombetta, I.C.; Batalha, L.T.; Rondon, M.U.P.B.; Laterza, M.C.; Kuniyoshi, F.H.S.; Barretto, A.C.P.; Halpern, A.; Villares, S.M.F.; Negrão, C.E. Weight loss improves muscle metaboreflex control in obesity. *American Journal of Physiology, Heart and Circulatory Physiology* 2003; 285: 974-82.
10. Brum, P.C.; Bacurau, A.V.; Medeiros, A. Ferreira, J.C.; Vanzelli, A.S.; Negrão, C.E. Aerobic exercise training in heart failure: impact on sympathetic hyperactivity and cardiac and skeletal muscle function. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v.44, n.9, p.827-35, 2011.
11. Medeiros A, Oliveira EM, Gianolla R, Casarini DE, Negrão CE, Brum PC. Swimming training increases cardiac vagal activity and induces cardiac hypertrophy in rats. *Braz J Med Biol Res*. 2004;37(12):1909-17.
12. Cox RH, Hubbard JW, Lawler JE, Sanders BJ, Mitchell VP. Cardiovascular and sympathoadrenal responses to stress in swim-trained rats. *J Appl Physiol*. 1985; 58(4):1207-14.
13. Martins-Pinge, M.C.; Becker, L.K.; Garcia, M.R.L.; Zoccal, D.B.; Neto, R.V.; Basso, L.S.; Souza, H.C.; Lopes, O.U. Attenuated pressor responses to amino acids in the rostral ventrolateral medulla after swimming training in conscious rats. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical* 2005; 122: 21-28.
14. Mehanna A, Vitorino DC, Panis C, Blanco EE, Pinge Filho P, Martins-Pinge M C. Cardiovascular and pulmonary effects of NOS inhibition in endotoxemic conscious rats subjected to swimming training. *Life Sciences* 2007; 81(16): 1301-1308.
15. De Abreu, S.B., Lenhard, A., Mehanna, A., de Souza, H.C., Correa, F.M., Hasser, E.M., Martins-Pinge, M.C. Role of paraventricular nucleus in exercise training-induced autonomic modulation in conscious rats. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical* 2009; 148(1-2): 28-35.
16. Mastelari, R.B., de Souza, H.C., Lenhard, A., de Aguiar Corrêa, F.M., Martins-Pinge MC. Nitric oxide inhibition in paraventricular nucleus on cardiovascular and autonomic modulation after exercise training in unanesthetized rats. *Brain Res* 2011; 1375:68-76.
17. Guillemin, R.; Clayton, G.W.; Lipscomb, H.S.; Smith, J.D. Fluorometric measurement of rat plasma and adrenal corticosterone concentration a note on technical details. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 1959; 53:5.
18. Gutmann I, Wahlefeld W. L-(+)-Lactate. Determination with lactate dehydrogenase and NAD. In *Methods of Enzymatic Analysis* Bergmeyer HU (ed.). Academic Press: New York, 1974; 1464–1472. ISBN: 0120913010.
19. Bergmeyer HU, Bernt E. Determination of glucose with glucoseoxidase and peroxidase. In *Methods of Enzymatic Analysis*, Bergmeyer HU (ed.). Academic Press: New York, 1974; 1205–1215. ISBN: 0120913010.
20. Wilterdink EJ, Ballor DL, Keeseey RE. Changes in body composition and daily energy expenditure induced in rats during eight weeks of daily swim training. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 1993 17(3):139-43.

Figure 1 – Body weight gain (g) during the period of training or sedentarism. (* $p \leq 0.05$ vs. Sedentary Group).

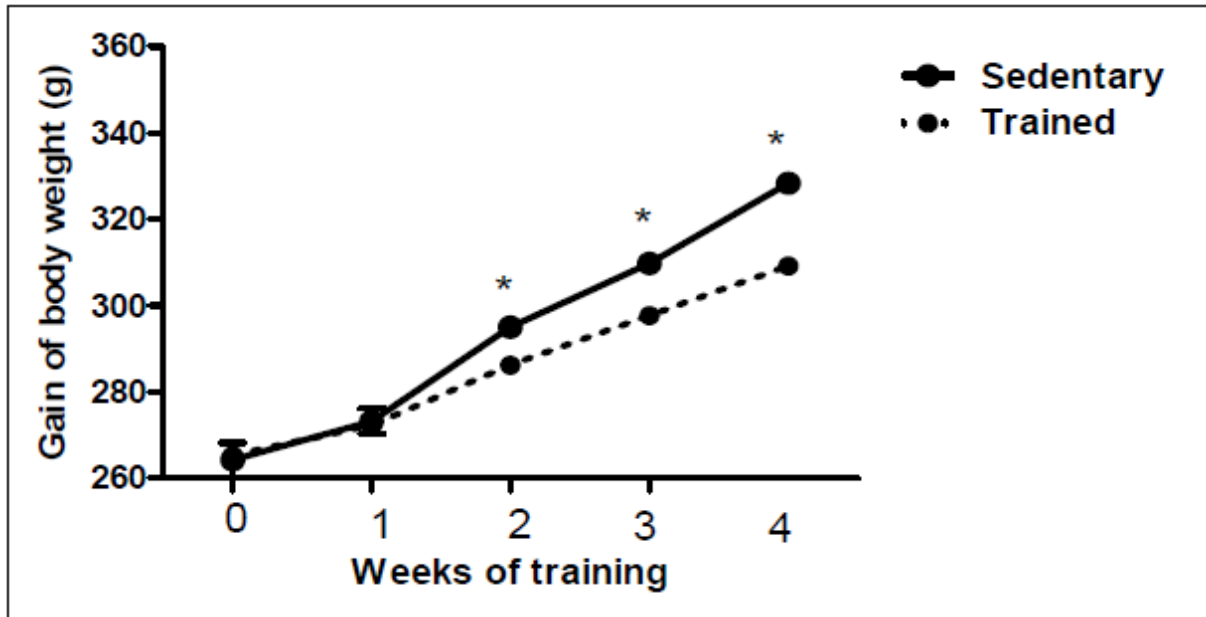


Table 1 – Body composition of sedentary Wistar rats and trained with swimming.

Relative Weight (g)	Sedentary Group	Trained Group
Retroperitoneal Fat	0.90 ± 0.09	0.60 ± 0.06*
Perigonadal Fat	0.82 ± 0.05	0.61 ± 0.03*
Heart	0.33 ± 0.01	0.37 ± 0.01*
Adrenal Gland	0.019 ± 0.002	0.016 ± 0.002
Soleus Muscle	0.106 ± 0.004	0.109 ± 0.005
Body Weight (g)	328.3 ± 2.16	309.2 ± 1.11*
Naso-anal Distance (cm)	23.10 ± 0.31	22.55 ± 0.26
Index of Lee	0.30 ± 0.002	0.30 ± 0.003

Values obtained after 4 weeks of training or sedentarism, expressed as means ± SE.

Relative weight = absolute weight of the organ or muscle / body weight x 100;

Lee Index = $\sqrt[3]{\text{body weight} / \text{naso-anal distance}} \times 1000$.

Significant differences: (* $p \leq 0.05$ vs. Sedentary Group).

Table 2 – Plasma levels of glucose (mg / dL), lactate (umol / L) and corticosterone (ug / dL) in sedentary and swimming trained Wistar rats.

Plasmatic Levels	Sedentary Group	Trained Group (24h)	Trained Group (0h)
Glucose (mg/dL)	124.14 ± 2.56	121.93 ± 3.74	140.26 ± 4.01* #
Lactate (umol/L)	3.74 ± 0.15	2.96 ± 0.13*	3.22 ± 0.25*
Corticosterone (ug/dL)	5.31 ± 0.38	5.09 ± 0.50	

Values obtained after 4 weeks of training or sedentarism, expressed as means ± SE.
Significant differences: (* p≤ 0.05 vs. Sedentary Group); (# p≤ 0.05 vs. Trained Group (24h)).