

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Fisiologia e Biofísica
Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia

**Participação do óxido nítrico central nos ajustes termorregulatórios
durante o exercício físico em ratos espontaneamente hipertensos:
efeitos do treinamento físico**

Lucas Rios Drummond

Orientador: Cândido Celso Coimbra

Belo Horizonte, MG

2018

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Fisiologia e Biofísica
Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia

Participação do óxido nítrico central nos ajustes termorregulatórios durante o exercício físico em ratos espontaneamente hipertensos: efeitos do treinamento físico

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas: Fisiologia
Orientador: Dr. Cândido Celso Coimbra.

Lucas Rios Drummond

Belo Horizonte, MG

2018

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Endocrinologia e Metabolismo do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, na vigência dos auxílios concedidos pelo Conselho Nacional e Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Aos meus pais, Eduardo (*in memoriam*) e Giselle, pilares da minha formação.

À Bárbara, por todo amor e cumplicidade.

Aos meus irmãos, Filipe e André, pela força e torcida.

A toda minha família, pelo apoio.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a Deus, por iluminar o meu caminho.

Ao professor Cândido Celso Coimbra pela oportunidade, pela orientação sempre presente, pela confiança e pelo estímulo constante para a minha formação. Agradeço também por me ensinar a nunca me acomodar.

Ao professor Samuel Penna Wanner por sua disponibilidade em me ajudar sempre, desde os experimentos do mestrado até às revisões minuciosas das publicações e questionamentos científicos. Agradeço também por aceitar a participar do seminário de defesa.

Aos professores do Laboratório de Endocrinologia e Metabolismo, Adelina Martha dos Reis, Maristela de Oliveira Poletini e Raphael Escorsim Szawka, por incentivarem o meu crescimento profissional.

Aos professores Andrea Siqueira Haibara, Ana Cristina Rodrigues Lacerda, Washington Pires e Glauber dos Santos Ferreira da Silva pela importante presença no seminário de defesa.

Ao professor Thales Nicolau Prímola Gomes pelo apoio para condução dos experimentos.

Ao grande amigo Helton Oliveira Campos pelo trabalho em conjunto, troca de conhecimento e por participar de todas as etapas do meu trabalho sempre com bom humor e empenho.

A amiga Quezia Teixeira Rodrigues pelo grande apoio nos momentos difíceis.

Aos amigos e colegas de trabalho Diego César Borges, Gleisy Kelly Neves Gonçalves, Mateus da Costa Monteiro, Nayara Abreu Coelho Horta e Paulo Marcelo de Andrade Lima que estiveram envolvidos nos experimentos do Doutorado.

Aos amigos do Laboratório de Endocrinologia e Metabolismo: Ana Clara Campideli, Daniela Gusmão, Fernanda Machado, Flávia Araújo, Flávia Ribeiro, Frederico Machado, Kaoma Silva, Laísa Hipólito, Nayara Aquino, Mateus Monteiro, Paola Fernandes, Patrícia Henriques, Roberta Lopes, Thais Santana e Washington Pires por todos os momentos de alegria, trabalho e desespero compartilhados.

À técnica do Laboratório de Endocrinologia e Metabolismo, Simone Pio, pelo auxílio e disponibilidade durante os experimentos.

Ao sr. Adão, do Biotério do Centro de Ciências Biológicas e a Saúde da Universidade Federal de Viçosa, pela grande disponibilidade em ajudar, e pelo seu bom humor todos os dias.

Ao Sílvio e ao Claudiomar pelo auxílio essencial nos cuidados aos animais.

À secretaria do programa de pós-graduação.

À população brasileira, que através da CAPES, CNPq e FAPEMIG financiaram a realização do projeto e mais um período da minha formação profissional e científica.

Enfim, a todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE ABREVIATURAS.....	12
RESUMO	15
ABSTRACT	17
1. INTRODUÇÃO.....	19
2. REVISÃO DE LITERATURA	21
2.1 Termorregulação.....	21
2.2 Termorregulação durante o exercício físico	23
2.3 Óxido Nítrico	26
2.4 Hipertensão arterial.....	27
2.5 Treinamento Físico	29
3. OBJETIVOS.....	32
3.1 Objetivo geral	32
3.2 Objetivos específicos	32
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	33
4.1 Cuidados éticos	33
4.2 Animais.....	33
4.3 Amostra.....	33
4.4 Delineamento experimental	34
4.4.1 Protocolo experimental 1	35
4.4.2 Protocolo experimental 2	36
4.4.3 Protocolo experimental 3	37
4.4.4 Protocolo experimental 4	38
4.5 Medida da pressão arterial por pletismografia de cauda.....	39
4.6 Procedimentos cirúrgicos.....	39

4.6.1 Implante de cânula guia no sistema nervoso central	39
4.6.2 Implante do sensor de temperatura abdominal.....	40
4.7 Injeção intracerebroventricular de NPS	41
4.8 Familiarização à corrida em esteira rolante	41
4.9 Protocolo de exercício progressivo	42
4.10 Protocolo de exercício constante	42
4.11 Treinamento físico	43
4.12 Eutanásia.....	44
4.13 Imunohistoquímica	45
4.14 Análise da expressão proteica por <i>Western Blot</i>	48
4.14.1 Retirada e armazenamento das amostras.....	48
4.14.2 Extração e quantificação de proteínas.....	48
4.14.3 Western Blot.....	49
4.15 Variáveis	50
4.15.1 Variáveis medidas	50
4.15.1.1 Temperatura abdominal (T_{abd}).....	50
4.15.1.2 Temperatura da pele da cauda (T_{pele})	50
4.15.1.3 Tempo de exercício (TE).....	51
4.15.1.4 Consumo de oxigênio pico (VO_{2pico})	51
4.15.2 Variáveis de controle.....	51
4.15.2.1 Massa Corporal	51
4.15.2.2 Temperatura ambiente no interior da esteira (T_a)	52
4.15.3 Variáveis calculadas	52
4.15.3.1 Velocidade máxima atingida durante a corrida ($V_{máx}$).....	52
4.15.3.2 Trabalho (W)	53
4.15.3.3 Limiar térmico para dissipação de calor (H_{thr}).....	53
4.15.3.4 Sensibilidade para dissipação de calor (H_{sen}).....	53

4.15.3.5 Eficiência termorregulatória.....	54
4.16 Análise estatística	54
5. RESULTADOS	56
5.1 Resultados protocolo experimental 1	56
5.1.1 Características dos animais	56
5.1.2 Balanço térmico durante o exercício.....	57
5.1.3 Ativação neuronal das áreas hipotalâmicas envolvidas com a termorregulação durante o exercício	59
5.2 Resultados do protocolo experimental 2.....	64
5.2.1 Balanço térmico durante o exercício.....	64
5.2.1 Desempenho físico	65
5.3 Resultados protocolo experimental 3.....	66
5.3.1 Características dos animais	66
5.3.2 Balanço térmico durante o exercício.....	68
5.3.3 Desempenho físico	70
5.4 Resultados protocolo experimental 4.....	73
5.4.1 Características dos animais	73
6. DISCUSSÃO	82
6. CONCLUSÃO.....	94
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	95

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 Termorregulação em ratos durante a corrida em esteira rolante.....	25
Figura 4.1. Linha do tempo referente ao protocolo experimental 1.....	35
Figura 4.2. Linha do tempo referente ao protocolo experimental 2.....	36
Figura 4.3. Linha do tempo referente ao protocolo experimental 3.....	37
Figura 4.4. Linha do tempo referente ao protocolo experimental 4.....	38
Figura 4.5. Cargas de treinamento.....	43
Figura 4.6 Imagens representativas das regiões de interesse analisadas (mPOA, PVN e SON).....	47
Figura 5.1. Pressão arterial média (A), sistólica (B) e diastólica (C) de ratos dos grupos NWR e SHR.....	56
Figura 5.2. Massa corporal de ratos dos grupos NWR e SHR.....	57
Figura 5.3. Temperaturas abdominal (A) e da pele da cauda (B) dos animais NWRs e SHRs submetidos ao exercício constante.....	58
Figura 5.4. Relação entre a temperatura abdominal e a temperatura da pele da cauda (A). Limiar térmico (B) e sensibilidade (C) para dissipação de calor durante o exercício constante.....	59
Figura 5.5. Imagens representativas da mPOA mostrando imunorreatividade à c-FOS (núcleos cinza/pretos) dos grupos NWR Branco (A), SHR Branco (B), NWR Exercício (C), SHR Exercício (D). Número de neurônios imunorreativos a c-Fos/secção na mPOA (E). Correlação entre H_{thr} e o número de neurônios imunorreativos a c-Fos na mPOA (F).....	61
Figura 5.6. Imagens representativas do PVN mostrando imunorreatividade à c-FOS (núcleos cinza/pretos) dos grupos NWR Branco (A), SHR Branco (B), NWR Exercício (C), SHR Exercício (D). Número de neurônios imunorreativos a c-Fos/secção no PVN (E). Correlação entre H_{thr} e o número de neurônios imunorreativos a c-Fos no PVN (F)..	62
Figura 5.7. Imagens representativas do SON mostrando imunorreatividade à c-FOS (núcleos cinza/pretos) dos grupos NWR Branco (A), SHR Branco (B), NWR Exercício (C), SHR Exercício (D). Número de neurônios imunorreativos a c-Fos/secção no SON (E). Correlação entre H_{thr} e o número de neurônios imunorreativos a c-Fos no SON (F)..	63
Figura 5.8. Efeitos da injeção i.c.v. de NPS na variação da temperatura abdominal (A) e da pele da cauda (C) de animais NWRs submetidos ao exercício constante. AUC da variação da temperatura abdominal (B) e da temperatura da pele da cauda (D).....	65

Figura 5.9. Efeitos da injeção i.c.v. de NPS no tempo de exercício de animais NWRs submetidos ao exercício constante.....	66
Figura 5.10. Pressão arterial sistólica de ratos dos grupos NWR e SHR.....	67
Figura 5.11. Massa corporal de ratos dos grupos NWR e SHR.....	67
Figura 5.12. Efeitos da injeção i.c.v. de NPS na variação das temperaturas abdominal (painéis A e B) e da pele da cauda (painéis C e D) de animais NWRs (painéis A e C) e SHRs (painéis B e D) submetidos ao exercício constante.....	69
Figura 5.13. Relação entre temperatura da pele da cauda e temperatura abdominal em animais NWRs (A) e SHRs (B) após a injeção i.c.v. de NPS ou SAL. Efeitos da injeção i.c.v. de NPS no limiar (C) e sensibilidade (D) para dissipação de calor durante o exercício constante.....	70
Figura 5.14. Efeitos da injeção i.c.v. de NPS no tempo de exercício (A), e trabalho (B) de animais NWRs e SHRs.....	72
Figura 5.15. Massa corporal de ratos dos grupos NWR NT, NWR T, SHR NT e SHR T.73	
Figura 5.16. Pressão arterial sistólica de ratos dos grupos NWR NT, NWR T, SHR NT e SHR T.....	74
Figura 5.17. Desempenho físico de ratos dos grupos NWR NT, NWR T, SHR NT e SHR T.....	75
Figura 5.18. Efeitos do treinamento físico na variação das temperaturas abdominal (painéis A e B) e da pele da cauda (painéis C e D) de animais NWRs (painéis A e C) e SHRs (painéis B e D) submetidos ao exercício constante.....	76
Figura 5.19. Relação entre temperatura da pele da cauda e temperatura abdominal em animais NWRs (A) e SHRs (B) treinados e não treinados. Efeitos do treinamento físico no limiar (C) e sensibilidade (D) para dissipação de calor durante o exercício constante.78	
Figura 5.20. Eficiência termorregulatória durante o exercício constante em animais NWRs e SHRs treinados e não treinados.....	79
Figura 5.21. Expressão proteica da p-nNOS(ser852) na APO de animais NWRs e SHRs treinados e não treinados.....	80
Figura 5.22. Expressão proteica da p-nNOS(ser852) no PVN de animais NWRs e SHRs treinados e não treinados.....	81

LISTA DE ABREVIATURAS

APO	Área pré-óptica
ANOVA	Análise de variância
ATP	Adenosina trifosfato
BSA	Albumina sérica bovina
Ca ²⁺	Cálcio
CEUA	Comissão de ética no uso de animais
cGMP	Monofosfato cíclico de guanosina
eNOS	Sintase de óxido nítrico endotelial
EPM	Erro padrão da média
FC	Frequência cardíaca
g	Aceleração da gravidade
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GMP	Monofosfato de guanosina
h	Horas
H _{sen}	Sensibilidade para a dissipação de calor
H _{thr}	Limiar térmico para a dissipação de calor
i.c.v.	Intracerebroventricular
iNOS	Sintase de óxido nítrico induzível
L-NAME	L-NG-nitro-arginina metil éster
mc	Massa corporal
mPOA	Área pré-óptica medial
NOS	Sintase de óxido nítrico
NWR	Ratos <i>Wistar</i> normotensos

NWR-NT	Ratos <i>Wistar</i> normotensos não treinados
NWR-T	Ratos <i>Wistar</i> normotensos treinados
NOS	Sintase de óxido nítrico
NPS	Nitroprussiato de sódio
O ₂	Oxigênio
ON	Óxido Nítrico
PA	Pressão arterial
PAD	Pressão arterial diastólica
PAM	Pressão arterial média
PAS	Pressão arterial sistólica
PBS	Tampão fosfato salina
p-nNOS	Sintase de óxido nítrico neuronal fosforilada
PVDF	Fluoreto de polivilidene
PVN	Núcleo paraventricular do hipotálamo
s	Segundos
Ser	Serina
SHR	Ratos espontaneamente hipertensos
SHR-NT	Ratos espontaneamente hipertensos não treinados
SHR-T	Ratos espontaneamente hipertensos treinados
SON	Núcleo supra-óptico
T _a	Temperatura ambiente
T _{abd}	Temperatura corporal interna
T _{pele}	Temperatura da pele da cauda
TRP	Receptor de potencial transiente

TE	Tempo de exercício
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UFV	Universidade Federal de Viçosa
v	Velocidade da esteira
$V_{\text{máx}}$	Velocidade máxima
$VO_{2\text{pico}}$	Consumo de oxigênio pico
W	Trabalho

RESUMO

A termorregulação ocorre por um equilíbrio entre os mecanismos de produção e de dissipação de calor do organismo. O aumento da disponibilidade de óxido nítrico (NO) parece aumentar a dissipação de calor e diminuir o acúmulo de calor durante o exercício físico. Ratos espontaneamente hipertensos (SHR) apresentam um desequilíbrio na regulação da temperatura corporal durante o exercício físico que pode estar relacionado com o nível de ativação de vias neurais moduladas pelo NO. Uma vez que o treinamento físico poderia corrigir o desequilíbrio termorregulatório em SHRs via modulação de vias oxinitrégicas centrais, este estudo teve como objetivo verificar se o déficit termorregulatório apresentado por animais hipertensos durante o exercício, envolve a ativação de vias neurais moduladas pelo óxido nítrico e quais seriam os possíveis efeitos do treinamento físico sobre esse controle termorregulatório. Foram utilizados 38 ratos *Wistar* normotensos (NWRs) e 30 SHRs divididos em 4 protocolos experimentais. No primeiro protocolo experimental o objetivo foi verificar se o déficit termorregulatório apresentado por animais hipertensos durante o exercício envolveria alterações no sistema nervoso central. No segundo protocolo experimental o objetivo foi determinar a dose de injeção central de nitroprussiato de sódio (NPS; um doador de óxido nítrico) mais adequada para os experimentos envolvendo termorregulação durante o exercício. No terceiro protocolo experimental o objetivo foi estudar os efeitos do aumento da disponibilidade de NO no sistema nervoso central sobre o balanço térmico durante o exercício e sobre o desempenho físico em ratos normotensos e hipertensos. No quarto protocolo experimental o objetivo foi avaliar os efeitos do treinamento físico em ratos hipertensos e normotensos sobre o balanço térmico durante o exercício, sobre a expressão proteica da sintase de óxido nítrico neuronal em áreas do sistema nervoso central envolvidas na termorregulação durante o exercício. Os resultados do trabalho indicam que animais hipertensos possuem menor dissipação de calor durante o exercício, o que gera maiores aumentos na temperatura interna desses animais. A dificuldade de animais hipertensos em dissipar calor durante o exercício está, ao menos em parte, relacionada a mecanismos centrais. Menores ativações de núcleos cerebrais envolvidos com a termorregulação estão relacionadas ao maior limiar para dissipação de calor encontrados em animais hipertensos. A dose de 8,4 mmol mostrou-se a dose mais adequada entre as testadas para avaliação dos efeitos do NPS sobre a termorregulação durante o exercício. O aumento da disponibilidade de NO central aumenta a dissipação de calor e diminui o

aumento da temperatura interna durante o exercício em ratos normotensos e hipertensos. Além disso, o treinamento físico aumenta a eficiência do controle termorregulatório durante o exercício em animais normotensos e hipertensos e o aumento dessa eficiência pode ser explicado pelo aumento da atividade da sintase de óxido nítrico neuronal nos animais treinados. Os resultados do presente trabalho permitem concluir que as alterações termorregulatórias encontradas entre animais hipertensos e normotensos durante o exercício tem origem no sistema nervoso central. O treinamento físico, por sua vez, aumenta a eficiência do controle termorregulatório durante o exercício em animais normotensos e hipertensos através do aumento da disponibilidade de NO no sistema nervoso central.

Palavras-chave: termorregulação, hipertensão arterial, sistema nervoso central.

ABSTRACT

Thermoregulation occurs by a balance between the mechanisms of heat production and dissipation of the body. The increased availability of nitric oxide (NO) appears to increase heat dissipation and decrease heat storage during exercise. Spontaneously hypertensive rats (SHR) present an imbalance in the regulation of body temperature during physical exercise that may be related to the level of activation of NO-modulated neural pathways. Since physical training could correct thermoregulatory imbalance in SHRs via modulation of central oxynitrogenic pathways, this study aimed to verify if the thermoregulatory deficit presented by hypertensive animals during exercise involves the activation of neural pathways modulated by nitric oxide and which would be the possible effects of physical training on this thermoregulatory control. We used 38 normotensive Wistar rats (NWRs) and 30 SHRs divided into 4 experimental protocols. In the first experimental protocol, the objective was to verify if thermoregulatory deficit presented by hypertensive animals during the exercise would involve changes in the central nervous system. In the second experimental protocol, the objective was to determine the central injection dose of sodium nitroprusside (NPS, a nitric oxide donor) more suitable for the experiments involving thermoregulation during exercise. In the third experimental protocol, the objective was to study the effects of increased NO availability in the central nervous system on the thermal balance during exercise and on physical performance in normotensive and hypertensive rats. In the fourth experimental protocol, the objective was to evaluate the effects of physical training in hypertensive and normotensive rats on the thermal balance during exercise, on the protein expression of neuronal nitric oxide synthase in central nervous system areas involved in thermoregulation during exercise. The results of the study indicate that hypertensive animals present a lower heat dissipation during exercise, which generates greater increases in internal temperature. The difficulty of hypertensive animals in dissipating heat during exercise is, at least in part, related to central mechanisms. Reduced activations of brain nuclei involved in thermoregulation are related to a high threshold for heat dissipation found in hypertensive animals. The dose of 8.4 mmol showed the most adequate dose among those tested to evaluate the effects of NPS on thermoregulation during exercise. Increased central NO availability increases heat dissipation and decreases hyperthermia during exercise in normotensive and hypertensive rats. In addition, physical training increases the efficiency of

thermoregulatory control during exercise in normotensive and hypertensive animals and the increase in this efficiency can be explained by an increase in the activity of neuronal nitric oxide synthase in trained animals. The results of present study allow us to conclude that the thermoregulatory changes found between hypertensive and normotensive animals during exercise originated in the central nervous system. In addition, physical training increases the efficiency of thermoregulatory control during exercise in normotensive and hypertensive animals by increasing the availability of NO in the central nervous system.

Key words: thermoregulation, arterial hypertension, central nervous system.

1. INTRODUÇÃO

A hipertensão arterial sistêmica é uma condição clínica caracterizada por níveis elevados e sustentados de pressão arterial (SBC, 2010) . Possui diferentes origens, alta prevalência, baixas taxas de controle, sendo considerada um problema de saúde pública (Chobanian *et al.*, 2003).

Estudos epidemiológicos observaram que, durante ondas de calor nos Estados Unidos e Europa, a incidência de doenças relacionadas ao calor, como o choque hipertérmico, foi maior em indivíduos que apresentavam um quadro de hipertensão arterial (Ellis, 1972; Tucker *et al.*, 1985; Argaud *et al.*, 2007). Esses dados epidemiológicos indicam que a hipertensão arterial pode comprometer a capacidade termorregulatória e, conseqüentemente, a tolerância térmica do indivíduo acometido pela doença.

Ratos espontaneamente hipertensos (SHRs) tem sido extensivamente utilizados como um modelo animal para o estudo da hipertensão arterial essencial humana (Okamoto e Aoki, 1963; Trippodo e Frohlich, 1981). Estudos com SHRs já demonstraram que esses animais apresentam hipertermia exacerbada quando expostos a um ambiente quente (Berkey *et al.*, 1990) ou durante o exercício em ambiente temperado ou quente (Campos *et al.*, 2014; Drummond *et al.*, 2016). Essa hipertermia parece estar relacionada a uma maior latência para o início da dissipação de calor cutânea nesses animais (Drummond *et al.*, 2016). Porém, os mecanismos responsáveis por esse atraso na dissipação de calor ainda não foram demonstrados e necessitam maiores investigações.

O óxido nítrico (NO) é um radical livre gasoso altamente difusível e tem a função de molécula mensageira com diversos papéis fisiológicos. Os efeitos do NO central na termorregulação durante o exercício já foram demonstrados (Lacerda *et al.*, 2005; Lacerda *et al.*, 2006; Wanner, Leite, *et al.*, 2015). A inibição não seletiva das sintases de óxido nítrico (NOS) prejudica a dissipação de calor e aumenta o acúmulo de calor em ratos normotensos durante o exercício (Lacerda *et al.*, 2005), quadro semelhante ao encontrado em animais SHR durante o exercício (Campos *et al.*, 2014; Drummond *et al.*, 2016). Além disso, já foi demonstrado que SHRs apresentam maior expressão da sintase de óxido nítrico neuronal (nNOS) no hipotálamo (Plochocka-Zulinska e Krukoff, 1997), porém a atividade das NOS no hipotálamo desses animais é menor, reduzindo a síntese

de NO (Alaghband-Zadeh *et al.*, 1996). Portanto, seria a via central mediada por NO a responsável pelas alterações na termorregulação em SHRs durante o exercício? Essa é uma das hipóteses testadas no presente estudo.

Os efeitos do treinamento físico no balanço térmico durante o exercício em animais hipertensos também já foram avaliados (Campos, 2017). O treinamento físico previne os aumentos exacerbados da temperatura interna durante o exercício em animais hipertensos. Os principais achados do estudo indicam que adaptações periféricas seriam as responsáveis pelo controle termorregulatório mais eficiente encontrado em animais hipertensos submetidos ao treinamento físico em esteira rolante (Campos, 2017). Porém, estariam as alterações centrais também envolvidas nos efeitos do treinamento físico em animais hipertensos? O treinamento físico provocaria uma maior ativação da via modulada pelo NO em animais hipertensos? E ainda, o treinamento físico seria capaz de corrigir a termorregulação durante o exercício em SHRs com a hipertensão arterial já estabelecida? Essas serão algumas questões respondidas no presente trabalho.

As hipóteses do presente trabalho são: (1) As alterações termorregulatórias encontradas em animais hipertensos durante o exercício são geradas por alterações no sistema nervoso central desses animais. (2) A maior disponibilidade de óxido nítrico central facilita a dissipação de calor e diminui a hipertermia em animais hipertensos durante o exercício. (3) O treinamento físico utilizado como um tratamento não farmacológico corrige as alterações termorregulatórias encontradas em animais hipertensos durante o exercício por modulação na via central modulada pelo NO.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Termorregulação

Grande parte dos mamíferos são animais homeotérmicos, pois são capazes de manter sua temperatura corporal interna relativamente constante, mesmo quando expostos a diferentes temperaturas ambientais (IUPS Thermal Commission, 2001). Essa regulação da temperatura interna se dá através de mecanismos autonômicos e comportamentais que modificam as taxas de produção e dissipação de calor. Em condições de repouso, grandes variações da temperatura interna sugerem a existência de uma condição patológica (Kiyatkin, 2007; Romanovsky, 2007).

Em ratos, os mecanismos autonômicos responsáveis pela produção de calor são a termogênese associada ao tremor e o metabolismo do tecido adiposo marrom, enquanto os responsáveis pela dissipação de calor são a vasodilatação cutânea e a evaporação de fluidos corporais (evaporação de saliva que o animal dispersa sobre o próprio corpo ou de água nas vias respiratórias) (Gordon, 1990). Dentre as reações comportamentais, estão a dispersão de saliva pelo corpo (Schwimmer *et al.*, 2004), a seleção de temperatura ambiente mais confortável (Romanovsky *et al.*, 2002; Wanner *et al.*, 2017) e os ajustes posturais que alteram a área de superfície corporal exposta ao ambiente (Nagashima *et al.*, 2000).

A organização funcional do sistema termorregulatório é um tema que permanece em debate na literatura. O modelo atual (Boulant, 2006; Romanovsky, 2007; Romanovsky *et al.*, 2009) sugere que o sistema termorregulatório funciona como uma associação de alças efetoras relativamente independentes, contrapondo a ideia de existência de um único controlador ou um único “*set point*” (Wener, 1979). Cada alça termoefetora inclui uma única via neural que controla a resposta efetora correspondente (Nagashima *et al.*, 2000; Morrison *et al.*, 2008). Além disso, cada alça termoefetora utiliza informações aferentes por meio de retroalimentação negativa a partir da principal variável de controle, a temperatura interna, e por meio de retroalimentação positiva ou negativa a partir da variável auxiliar, a temperatura da pele (Romanovsky, 2014). O uso da variável auxiliar permite um controle mais estável da temperatura interna, possibilitando respostas mais rápidas às alterações que ocorrem no ambiente. Além disso, cada termoefetor é

sensível a uma única combinação de temperatura interna e da pele, e por isso, os termorreceptores estão distribuídos em diferentes locais pelo corpo (Ootsuka e Mcallen, 2006; Romanovsky, 2007).

Segundo este modelo teórico sobre a organização funcional do sistema termorregulatório, um neurônio termossensível não codifica sua temperatura local em sinais elétricos para serem processados pela rede de controle central. Ao invés disso, o sinal elétrico é gerado quando a temperatura local atinge o limiar de despolarização desse termorreceptor e este sinal se espalha por uma via neural para conduzir a resposta efetora (Kobayashi, 1989; Okazawa *et al.*, 2002). Essa forma de organização enfatiza a importância de elementos termorreceptivos de neurônios que funcionam como sensores e confere a esses elementos o papel principal na determinação da ativação de uma resposta efetora (Romanovsky *et al.*, 2009).

Dentre os elementos termossensíveis estão os canais iônicos sensíveis à variação de temperatura, também chamados receptores de potencial transiente (TRP). Dentre os canais TRP, onze são altamente sensíveis à variação de temperatura, desses oito ativados pelo calor (TRPV1, TRPV2, TRPV3, TRPV4, TRPM2, TRPM3, TRPM4 e TRPM 5) e dois ativados pelo frio (TRPA1, TRPM8 e TRPC5). Em conjunto, esses canais são capazes de perceber variações de temperatura desde o frio nocivo ao calor nocivo, e cada um é ativado em uma faixa estreita de temperatura local (Romanovsky, 2007; Wang e Siemens, 2015).

Apesar do controle independente dos termoefetores, o hipotálamo anterior e principalmente a área pré-óptica (APO) têm sido considerados os centros primários de integração dos sinais térmicos. O controle da temperatura corporal pode ser dividido em três etapas: aferência, integração e eferência. As informações térmicas são percebidas pelos termosensores presentes na pele, nas vísceras e no cérebro, e são transmitidas ao centro termorregulador (APO), por meio da medula espinhal. Na APO, as informações térmicas são integradas e através das vias eferentes o controle da temperatura interna é realizado (Boulant, 2000; Romanovsky *et al.*, 2009; Nakamura, 2011).

O controle homeostático da temperatura interna também pode ser ajustado em outras áreas além da APO. A APO emite projeções neurais para outras regiões cerebrais como o núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) (Nagashima, 2006; Romanovsky, 2007). O PVN desempenha a função de núcleo integrador da atividade simpática que

regula a função cardiovascular (Patel e Zheng, 2012), mas também possui papel na termorregulação, e inclusive possui neurônios termossensíveis (Bratincsak e Palkovits, 2004; Cham *et al.*, 2006). O PVN, participa da termorregulação por meio de projeções diretas para a coluna intermédia lateral da medula espinhal (Cham *et al.*, 2006), controlando a atividade simpática para vários órgãos efetores envolvidos na termorregulação, como o tecido adiposo marrom, a glândula salivar e o leito vascular cutâneo da cauda de ratos (Smith *et al.*, 1998; Cham e Badoer, 2008; Madden e Morrison, 2009; Leite *et al.*, 2012). O núcleo supra-óptico (SON) também é um núcleo central importante para o controle da temperatura corporal (Takahashi *et al.*, 2001a; b). Acredita-se que a função fisiológica primária do SON seja a secreção de hormônios osmorregulatórios em resposta a vários estímulos relacionados com a mudança osmótica e o equilíbrio de fluidos (Takahashi *et al.*, 2001a). Também já foi demonstrado que a estimulação do SON através de estímulo elétrico (Holt *et al.*, 1987) e microinjeção de glutamato (Amir e De Blasio, 1991) aumenta a temperatura interna.

2.2 Termorregulação durante o exercício físico

Durante o exercício físico, a taxa de produção de calor aumenta proporcionalmente à intensidade do exercício, resultando na maioria das situações em hipertermia. Em função desse aumento da produção de calor, há um aumento consequente na dissipação de calor (Galloway e Maughan, 1997).

A contração muscular requerida durante o exercício físico aumenta a demanda energética dos músculos ativos (Galbo, 1985; Coyle, 2000), sendo que esta contração converte apenas 20-27% da energia química presente nas moléculas de adenosina trifosfato (ATP) em trabalho mecânico (Brooks *et al.*, 1984). A energia restante na molécula de ATP é convertida em calor que pode se acumular no organismo.

Em ratos, a dissipação de calor durante a corrida em esteira rolante ocorre principalmente pela vasodilatação cutânea da cauda. Nessa espécie, a cauda é a principal estrutura responsável pela dissipação de calor. A cauda dos ratos é caracterizada pela elevada razão entre área de superfície e o volume, pela ausência de pelos e por possuir uma rede densa de vasos sanguíneos e anastomoses artério-venosas (Romanovsky *et al.*, 2002). A perda de calor por meio da evaporação de água a partir do trato respiratório

também é uma via de dissipação de calor durante o exercício em ratos (Tanaka, 1988). Porém, é importante ressaltar que, a perda evaporativa de calor é limitada nessas condições experimentais, pois a realização do exercício impossibilita o comportamento de dispersão da saliva sobre a superfície corporal (Wilson *et al.*, 1978).

O controle termorregulatório durante o exercício físico em esteira com intensidade constante (Figura 1.1A) e em ambiente temperado pode ser dividido em duas fases: a dinâmica e a estável (Lacerda *et al.*, 2005; Pires *et al.*, 2007). Durante os minutos iniciais do exercício, a temperatura interna aumenta de forma abrupta (fase dinâmica), sendo esse aumento gerado por um desequilíbrio momentâneo entre a produção e dissipação de calor (Briese, 1998). Nessa fase, há um aumento rápido da taxa metabólica, devido à baixa eficiência das reações metabólicas envolvidas no fornecimento de energia para as contrações musculares (Gleeson, 1998; Soares *et al.*, 2003), associado à vasoconstrição periférica mediada pelo sistema nervoso simpático, o que reduz a dissipação cutânea de calor. Após alguns minutos de exercício, o limiar térmico para vasodilatação da cauda é atingido e, a partir de então, ocorre vasodilatação na cauda e o consequente aumento da dissipação de calor, cujos valores se aproximam da produção de calor, atenuando o aumento da temperatura interna (fase estável) (Hartley *et al.*, 1972; Mcallister *et al.*, 1995; Gleeson, 1998).

Durante o exercício físico com aumentos progressivos da intensidade (Figura 1.1B), a temperatura interna aumenta de forma rápida e praticamente linear, acompanhando o aumento do consumo de O₂, até a interrupção do exercício. Mesmo após o aumento da dissipação de calor através da pele da cauda, a temperatura interna continua aumentando em função do aumento da intensidade do exercício (Balthazar *et al.*, 2009). Essa característica de variação de intensidade desse protocolo de exercício também dificulta o controle da temperatura, já que os aumentos da intensidade do exercício em pequenos intervalos de tempo não favorecem o equilíbrio entre a produção e a dissipação de calor. Dessa forma, a fase estável nesse tipo de protocolo é menos evidente.

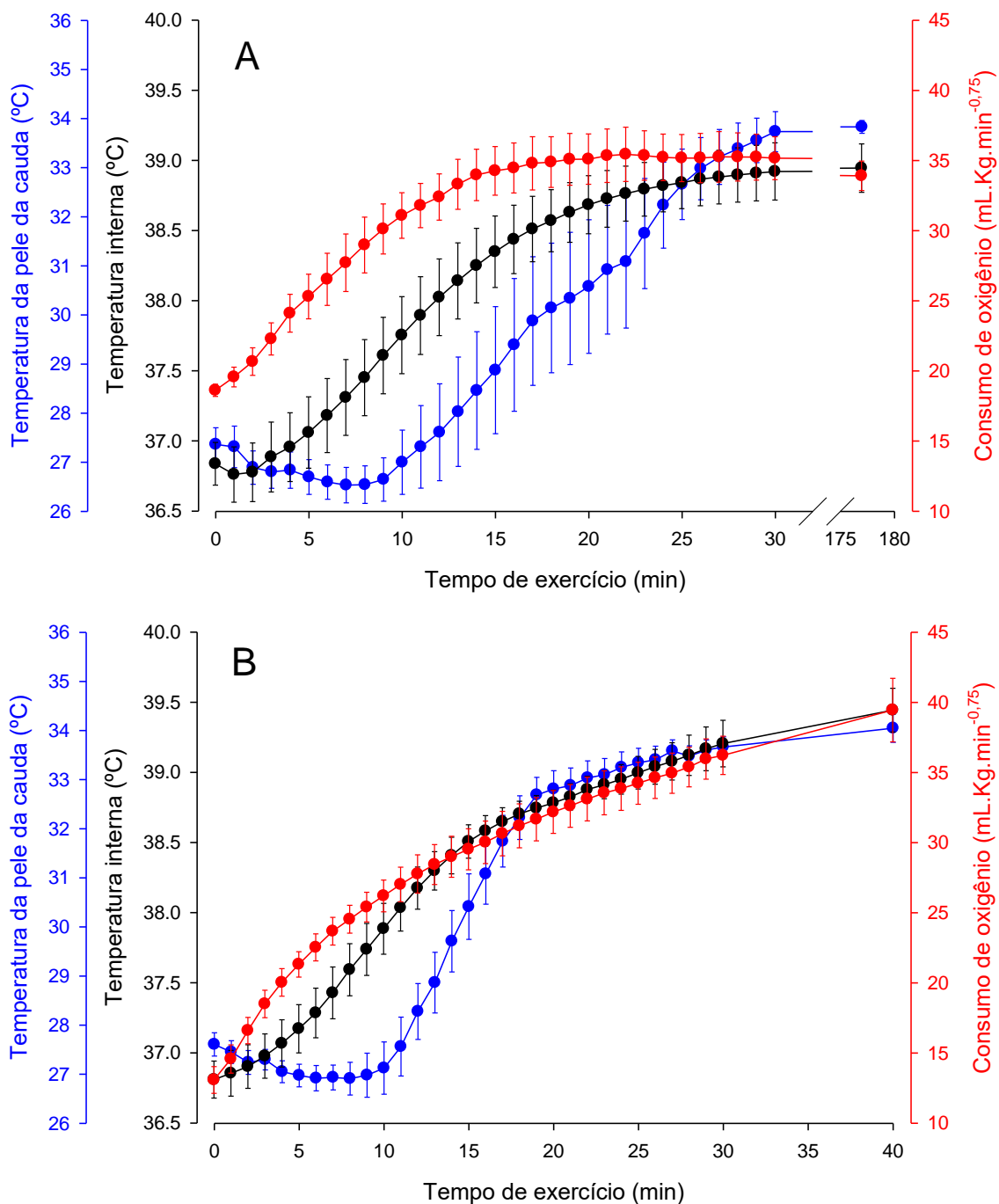


Figura 1.1 Termorregulação em ratos durante a corrida em esteira rolante. Dinâmica da temperatura interna (símbolo preto), temperatura da pele da cauda (símbolo azul; usado como um índice da dissipação de calor) e do consumo de oxigênio (símbolo vermelho, usado como um índice da produção de calor) durante o exercício com intensidade constante (painel A; 60% da velocidade máxima de corrida) e exercício com aumentos progressivos da intensidade (painel B; velocidade inicial de 10 m·min⁻¹ e aumentos de 1 m·min⁻¹ a cada 3 minutos) (Dados não publicados).

2.3 Óxido Nítrico

Nas últimas décadas milhares de trabalhos foram publicados demonstrando as funções biológicas do NO. O papel do NO é tão importante que, em 1992, ele foi considerado a molécula do ano. Em 1998, Robert Furchgott, Louis Ignarro e Ferid Murad receberam o prêmio Nobel de Fisiologia e Medicina por seus trabalhos envolvendo o NO (Calabrese *et al.*, 2007).

O NO é um radical livre gasoso altamente difusível e tem a função de molécula mensageira com diversos papéis fisiológicos. A sua produção é catalisada pela enzima denominada sintase de óxido nítrico (NOS) durante a conversão de L-arginina para L-citrulina. O NO exerce a maior parte de suas ações ativando a guanilato ciclase solúvel e aumentando conseqüentemente os níveis do mediador cíclico intracelular GMP (cGMP) em vários tecidos, incluindo o sistema nervoso central (Moncada *et al.*, 1991; Dawson e Snyder, 1994; Traystman *et al.*, 1995).

Existem duas diferentes classes das NOS: a forma induzível e a constitutiva. As isoformas endotelial (eNOS) e neuronal (nNOS) são classificadas como constitutivas. Elas se expressam respectivamente em células endoteliais vasculares e células do sistema nervoso central e periférico. A isoforma induzível (iNOS) torna-se expressa em macrófagos e presumivelmente em outros tipos celulares nucleados, em resposta a citocinas e pirogênicos exógenos (Bredt, Hwang, *et al.*, 1991). A produção de NO a partir da iNOS tem um papel importante na vasodilatação em condições patológicas, incluindo a hipertensão (Chou *et al.*, 1998). As isoformas constitutivas requerem a formação do complexo Ca^{2+} -calmodulina para sua ativação, já a isoforma induzível exerce sua função independentemente de Ca^{2+} (Bredt, 1999).

Estudos em roedores e primatas já demonstraram a localização das nNOS em diferentes áreas cerebrais como: córtex cerebral, hipotálamo, núcleo endopiriforme ventral, bulbo olfatório, núcleo olfatório, núcleo accumbens, amígdala, hipocampo, núcleo do trato solitário e cerebelo (Bredt, Glatt, *et al.*, 1991; Vincent e Kimura, 1992; Dawson e Snyder, 1994; Rodrigo *et al.*, 1994). No cérebro, as eNOS estão localizadas principalmente nas células endoteliais cerebrais (Calabrese *et al.*, 2006). Já a iNOS, possui expressão baixa no sistema nervoso central, mas pode ser induzida em astrócitos

e células da micróglia durante eventos como inflamações, infecções virais e traumas (Bredt, 1999; Calabrese *et al.*, 2006).

Uma das principais funções conhecidas do NO está relacionada ao sistema vascular. Células endoteliais controlam o relaxamento vascular pela produção de NO. O NO age sobre as células da musculatura lisa vascular provocando seu relaxamento (Huang, 1999). No sistema nervoso central, o NO é um neurotransmissor e/ou neuromodulador por mecanismos dependentes de cGMP (Guix *et al.*, 2005). Várias ações do NO no sistema nervoso central já foram demonstradas, dentre elas, percepção de dor (Yamamoto *et al.*, 1993), controle do sono, do apetite, da temperatura corporal (Monti e Jantos, 2004), desenvolvimento neural (Cheng *et al.*, 2003) e plasticidade sináptica (Dinerman *et al.*, 1994).

Os efeitos do NO central na termorregulação durante o exercício também já foram demonstrados (Lacerda *et al.*, 2005; Lacerda *et al.*, 2006; Lima *et al.*, 2014; Wanner, Leite, *et al.*, 2015). A inibição não seletiva das NOS diminui a dissipação de calor e aumenta o acúmulo de calor em ratos normotensos durante o exercício (Lacerda *et al.*, 2005; Lacerda *et al.*, 2006). Já a injeção central de L-arginina, um doador de NO, aumenta a dissipação de calor e provoca um aumento atenuado da temperatura interna durante o exercício (Wanner, Leite, *et al.*, 2015). Portanto, o NO central aumenta a dissipação de calor, o que provoca menor acúmulo de calor durante a realização do exercício.

2.4 Hipertensão arterial

A hipertensão arterial sistêmica é uma condição clínica caracterizada por níveis elevados e sustentados de pressão arterial (PA). Frequentemente a hipertensão arterial está associada a alterações funcionais e/ou estruturais dos órgãos-alvo (coração, cérebro, rins e vasos sanguíneos) e alterações metabólicas, com consequente aumento do risco de eventos cardiovasculares fatais e não fatais (SBC, 2010). Possui alta prevalência, baixas taxas de controle, sendo considerado um dos principais fatores de risco modificáveis e um problema de saúde pública (Chobanian *et al.*, 2003; Sbc, 2010). Uma revisão sistemática que englobou 44 estudos de 35 países no período de 2003 a 2008, revelou uma prevalência global de hipertensão arterial sistêmica de 37,8% em homens e 32,1% em mulheres (Pereira *et al.*, 2009).

Estudos epidemiológicos observaram que, durante ondas de calor nos Estados Unidos e Europa, a incidência de doenças relacionadas ao calor, como o choque hipertérmico, foi maior em indivíduos que apresentavam um quadro de hipertensão arterial (Ellis, 1972; Tucker *et al.*, 1985; Argaud *et al.*, 2007). Esses dados epidemiológicos indicam que a hipertensão arterial pode comprometer a capacidade termorregulatória e, conseqüentemente, a tolerância térmica do indivíduo acometido pela doença.

Para melhor compreensão da fisiopatologia da hipertensão, principalmente na medida de alguns parâmetros que apresentam limitações para serem analisados em seres humanos, iniciou-se o uso de modelos experimentais hipertensos. Existem vários modelos experimentais para o estudo da hipertensão, sendo o mais utilizado o do rato espontaneamente hipertenso (SHR – *Spontaneously Hypertensive Rat*), desenvolvido por Okamoto e Aoki (1963). A hipertensão nos SHRs apresenta uma evolução parecida com a hipertensão arterial essencial humana, com as fases pré-hipertensiva, de desenvolvimento e hipertensão sustentada (Folkow, 1993; Doggrel e Brown, 1998).

Os SHRs apresentam elevação da PA a partir das primeiras semanas de vida e, por volta da 6ª semana, já são classificados como hipertensos, atingindo um platô de elevação da PA por volta da 16ª semana (Kokubo *et al.*, 2005). Na 16ª semana de vida, os SHRs apresentam PA elevada e sustentada, hipertrofia cardíaca e menores frações de ejeção e encurtamento do miocárdio (Kokubo *et al.*, 2005). Esses animais também apresentam elevação lenta e progressiva da resistência periférica total (Trippodo e Frohlich, 1981; Trippodo *et al.*, 1981), hiperatividade simpática (Judy *et al.*, 1976), e a disfunção endotelial, esta caracterizada por uma vasodilatação dependente do endotélio prejudicada e menor biodisponibilidade do óxido nítrico.

Devido à disfunção do sistema cardiovascular apresentada por animais SHR, e à grande importância desse sistema para a regulação da temperatura corporal, surgiram os primeiros estudos com o objetivo de investigar a termorregulação nesse modelo animal. Os primeiros trabalhos mostraram que os SHRs possuem a temperatura interna aproximadamente 1°C maior do que a de ratos normotensos (Wright *et al.*, 1977; Wright *et al.*, 1978; Collins *et al.*, 1987). Cabe ressaltar que o índice de temperatura interna medida nesses experimentos foi a colônica, o que exigia contenção dos animais. Porém estudos posteriores que mediram a temperatura abdominal através de biotelemetria, não encontraram diferenças entre a temperatura de animais SHR e normotensos (Berkey *et*

al., 1990; Morley *et al.*, 1990; Barney *et al.*, 1999). Tais estudos mostraram que o estresse causado pela contenção foi a causa da diferença na temperatura colônica encontrada nos estudos anteriores.

Outros estudos mostraram que os animais SHR apresentam maior hipertermia quando submetidos ao estresse por contenção (Berkey *et al.*, 1990), expostos ao ambiente quente (Berkey *et al.*, 1990), e submetidos à desidratação e exposição ao ambiente quente (Barney *et al.*, 1999). Além disso, os ratos hipertensos também apresentaram dificuldade na produção de calor quando expostos ao ambiente frio (Kirby *et al.*, 1999).

O exercício físico provoca um aumento exacerbado da temperatura abdominal (T_{abd}) e cerebral em animais hipertensos (Campos *et al.*, 2014; Drummond *et al.*, 2016) e esse aumento exacerbado está relacionado, ao menos em parte, ao atraso para vasodilatação da cauda e conseqüente aumento da dissipação de calor cutânea (Drummond *et al.*, 2016). Porém, os mecanismos responsáveis por essa menor dissipação de calor ainda não foram demonstrados. Drummond *et al.* (2016) demonstraram que animais hipertensos apresentam maior limiar para dissipação de calor. Alterações no limiar geralmente são geradas por alterações no sistema nervoso central (Gisolfi e Wenger, 1984).

2.5 Treinamento Físico

Repetições sistematizadas de sessões isoladas de exercício físico produzem adaptações aos sistemas fisiológicos, denominadas respostas crônicas ao exercício ou adaptações ao treinamento físico. Para que essas adaptações ocorram, o exercício deve gerar um estímulo desafiador à homeostase do organismo, ou seja, deve ser realizado em intensidades superiores às quais o indivíduo esteja habituado (Thompson *et al.*, 2001).

A terapêutica da hipertensão arterial inclui intervenções medicamentosas e não medicamentosas, com o objetivo de reduzir os níveis pressóricos e proteger os órgãos alvos. Dentre as estratégias não medicamentosas utilizadas para a prevenção e tratamento da hipertensão arterial estão a mudança no estilo de vida, controle ponderal e nutricional, cessação do tabagismo, controle do estresse e a prática regular de exercício físico (Mancia *et al.*, 2014; Malachias *et al.*, 2016).

Os efeitos do treinamento físico podem variar de acordo com a modalidade de exercício utilizada (treinamento aeróbico, treinamento resistido ou a combinação de ambos) e de parâmetros do treinamento, como a intensidade, volume e frequência. Dentre as modalidades de treinamento citadas acima o treinamento aeróbico é o mais eficiente para a redução dos níveis pressóricos de indivíduos hipertensos. Além disso, os exercícios aeróbicos de intensidade moderada e com duração entre 30 e 45 minutos produzem as maiores reduções da PA em indivíduos hipertensos (Cornelissen e Smart, 2013).

De fato, a recomendação geral para indivíduos hipertensos, é a realização de exercício de intensidade moderada (40-60% do volume máximo de oxigênio de reserva e/ou da frequência cardíaca máxima de reserva), preferencialmente todos os dias da semana, com duração mínima de 30 minutos de atividades aeróbicas que podem ser suplementadas com atividades de resistência muscular (Pescatello *et al.*, 2004; Pescatello *et al.*, 2015; Malachias *et al.*, 2016).

O treinamento físico produz elevações periódicas e frequentes na temperatura corporal durante cada sessão de exercício físico que o compõe. Dessa forma, é possível que o organismo gere adaptações que facilite os ajustes termorregulatórios necessários. Em humanos já foi demonstrado que o treinamento físico aumenta o calibre das artérias, melhora a função vasodilatadora de todo o organismo e diminui o tônus vasomotor (Green *et al.*, 2004). Essas alterações combinadas elevam a condutância vascular periférica e facilitam a dissipação de calor (Kondo *et al.*, 2009). Da mesma forma, o treinamento físico causa adaptações nas vias centrais de controle da termorregulação. Santiago *et al.* (2016) demonstraram que ratos normotensos treinados apresentam uma maior ativação neuronal, verificada pela marcação de c-Fos, na área preótica medial (mPOA) e no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) quando submetidos a uma sessão de exercício progressivo até a fadiga. Além disso, os animais treinados também apresentaram maior dissipação de calor com conseqüente redução no acúmulo de calor durante a realização do exercício (Santiago *et al.*, 2016).

Os efeitos do treinamento físico sobre a termorregulação de ratos hipertensos jovens já foram avaliados (Campos, 2017). Nesse estudo, o treinamento físico foi iniciado antes dos animais se tornarem hipertensos, e o treinamento físico se mostrou eficiente em prevenir os aumentos da pressão arterial. O treinamento físico também preveniu o desequilíbrio térmico encontrado em animais hipertensos durante o exercício físico (Campos, 2017). Segundo o autor, essas alterações no balanço térmico provocadas pelo

treinamento podem ser explicadas por alterações periféricas como o aumento da eficiência mecânica e da vasodilatação periférica.

Porém, é possível que o treinamento físico também provoque alterações centrais em animais hipertensos, e que essas alterações estejam envolvidas com o controle termorregulatório durante o exercício. Além disso, ainda não se sabe quais seriam os efeitos do treinamento físico em animais já considerados hipertensos, ou seja, o treinamento físico como um tratamento e não como prevenção da hipertensão arterial.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Verificar se o déficit termorregulatório apresentado por animais hipertensos durante o exercício envolve a ativação de vias neurais moduladas pelo óxido nítrico e quais seriam os possíveis efeitos do treinamento físico sobre esse controle neural da termorregulação.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar se a limitação para dissipação cutânea de calor apresentada por animais hipertensos durante o exercício tem origem no sistema nervoso central;
- Estudar os efeitos do aumento da disponibilidade de NO no sistema nervoso central sobre o balanço térmico durante o exercício e sobre o desempenho físico em ratos normotensos e hipertensos;
- Avaliar os efeitos do treinamento físico em ratos hipertensos e normotensos sobre o balanço térmico durante o exercício, sobre a expressão proteica da nNOS em áreas do sistema nervoso central envolvidas na termorregulação e sobre o desempenho físico.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Cuidados éticos

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG; protocolo nº 21/2015). Todos os procedimentos foram realizados de acordo com os princípios éticos na experimentação animal, elaborados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

4.2 Animais

Foram utilizados 38 ratos *Wistar* normotensos (NWRs) e 30 SHR. Os animais de ambos os grupos foram manejados identicamente, alojados em gaiolas com livre acesso à água e ração (PRESENCE[®], SP, Brasil), e mantidos em uma sala à temperatura de aproximadamente 24°C e em um ciclo de 12/12 luz/escuro. Antes da realização das cirurgias, os animais foram alojados em caixas coletivas de polipropileno (35x50x17 cm), com no máximo 3 animais por caixa. Após as cirurgias, os animais foram transferidos para caixas individuais (20x30x12 cm). Os animais foram provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

4.3 Amostra

O cálculo do tamanho amostral foi realizado a partir da fórmula proposta por Armitage e Berry (1987):

$$n = \left[\frac{(Z_{2\alpha} + Z_{2\beta})\sigma}{\delta_1} \right]^2$$

Onde:

2α = nível de significância

2β = 1 – poder do teste

$Z_{2\alpha}$ = quantil $\alpha/2$ da distribuição normal

$Z_{2\beta}$ = quantil $\beta/2$ da distribuição normal

σ = desvio padrão

δ = diferença a ser detectada

Portanto:

$$n = \left[\frac{(Z_{2\alpha} + Z_{2\beta})\sigma}{\delta_1} \right]^2 \rightarrow n = \left[\frac{(3,92 + 2,56)0,39}{0,65} \right]^2 \rightarrow n = \left[\frac{2,52}{0,65} \right]^2 \rightarrow n = 7,776$$

O número inteiro logo acima de 7,776 é 8. Portanto o n utilizado será de 8 animais por grupo.

Para realizar o cálculo, esses dados devem ser obtidos da variável mais importante do trabalho e retirados de um estudo piloto ou da literatura. Para esse delineamento a variável escolhida foi a temperatura abdominal. Foi utilizado como fonte dos dados o trabalho de Drummond *et al* (2016). O nível de significância adotado foi de 5%, o poder do teste de 90%, o desvio padrão de 0,39 °C e a diferença a ser detectada de 0,65 °C. Portanto, foram utilizados 8 animais em cada grupo experimental.

4.4 Delineamento experimental

O estudo foi dividido em quatro protocolos experimentais. No primeiro protocolo, foi avaliada a ativação neuronal em animais NWRs e SHRs submetidos ao exercício físico. No segundo protocolo, foi avaliada a curva dose-resposta dos efeitos da injeção central de NPS na termorregulação e desempenho físico de animais NWRs. No terceiro protocolo, foram avaliados os efeitos da injeção central de NPS em parâmetros termorregulatórios e de desempenho físico em animais NWRs e SHRs. No quarto protocolo, foram avaliados os efeitos do treinamento físico nos parâmetros termorregulatórios e de desempenho físico em animais NWRs e SHRs.

4.4.1 Protocolo experimental 1

No protocolo experimental 1 (Figura 4.1), na 16ª semana de idade dos animais foi realizada a medida da pressão arterial e, no dia seguinte, os animais passaram pela cirurgia para implante do sensor de temperatura abdominal. Em seguida, tiveram 5 dias para recuperação da cirurgia, seguidos de 5 dias de familiarização à corrida em esteira rolante. Após esse período, os animais foram submetidos a uma sessão de exercício progressivo até a fadiga. O objetivo dessa situação experimental foi determinar a velocidade máxima de corrida ($V_{m\acute{a}x}$) atingida pelos animais; nenhuma medida de temperatura corporal foi realizada durante esse exercício. A $V_{m\acute{a}x}$ foi usada para calcular a velocidade de corrida dos animais durante o exercício constante. No dia do experimento, os animais foram submetidos a um protocolo de exercício com velocidade constante a 60% da $V_{m\acute{a}x}$ (NWR: $14,0 \pm 0,5$ m/min; SHR: $13,3 \pm 0,4$ m/min) durante 30 minutos a $24,8 \pm 0,4^{\circ}\text{C}$. Durante o exercício, foram feitas as medidas da temperatura abdominal (T_{abd}) e temperatura da pele da cauda (T_{pele}). Na sequência, os animais foram submetidos aos procedimentos para perfusão do tecido cerebral (ver item 4.12). No protocolo experimental 1 foram usados os grupos normotensos e hipertensos Branco, que não foram submetidos ao exercício físico.

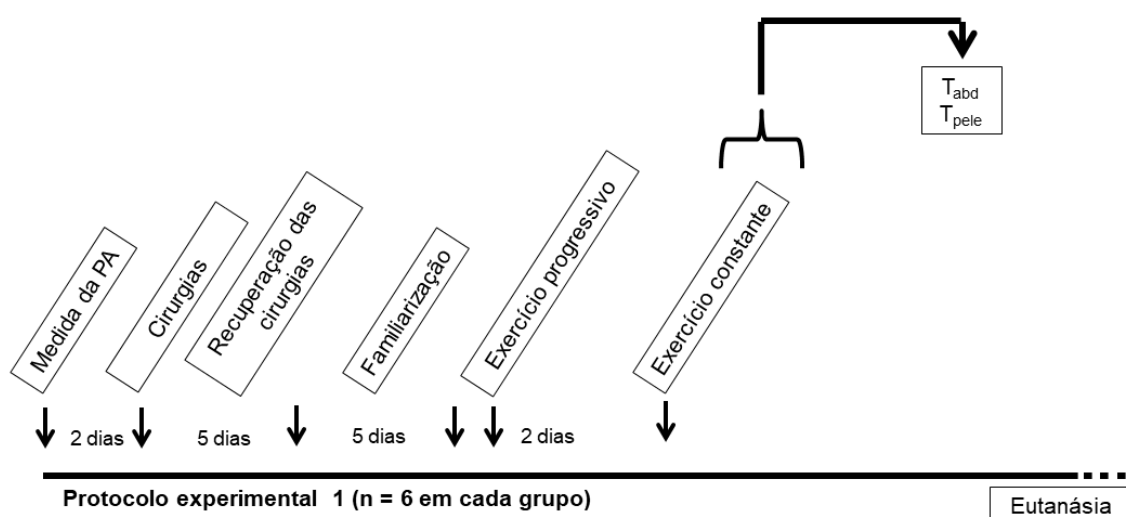


Figura 4.1. Linha do tempo referente ao protocolo experimental 1. T_{abd} , temperatura abdominal; T_{pele} , temperatura da pele da cauda.

4.4.2 Protocolo experimental 2

No protocolo experimental 2 (Figura 4.2), na 16ª semana de idade dos animais foi realizada a medida da pressão arterial e, no dia seguinte, os animais passaram pelas cirurgias para implante do sensor de temperatura abdominal e de uma cânula guia no ventrículo lateral cerebral direito. Em seguida, tiveram 5 dias para recuperação das cirurgias, seguidos de 5 dias de familiarização à corrida em esteira rolante. Após esse período, os animais foram submetidos a uma sessão de exercício progressivo até a fadiga para determinação da $V_{\text{máx}}$ de corrida. No dia dos experimentos, os animais passaram inicialmente por um período de repouso na esteira pelo tempo mínimo de 60 minutos e, em seguida, os animais foram submetidos a uma das quatro situações experimentais desse delineamento: exercício constante a 60% da $V_{\text{máx}}$ ($15,6 \pm 0,8$ m/min) em ambiente temperado (24°C) após a injeção de salina, NPS (8,4 mmol), NPS (4,2 mmol) e NPS (2,1 mmol). As quatro situações de exercício foram realizadas até a fadiga e em ordem randomizada. Durante o exercício foram feitas as medidas da T_{abd} , T_{pele} e do tempo de exercício (TE).

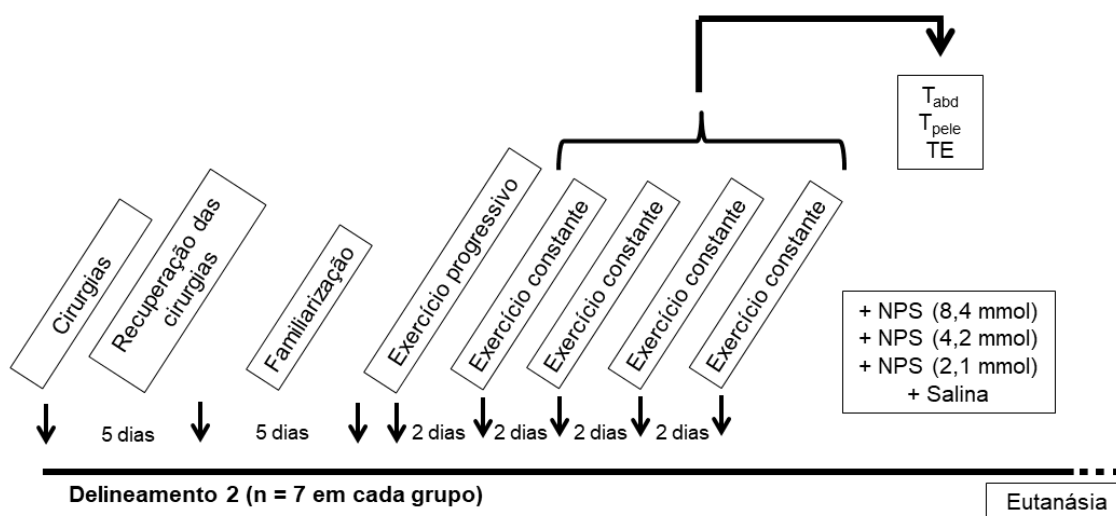


Figura 4.2. Linha do tempo referente ao protocolo experimental 2. NPS, nitroprussiato de sódio; T_{abd} , temperatura abdominal; TE, tempo de exercício; T_{pele} , temperatura da pele da cauda.

4.4.3 Protocolo experimental 3

No protocolo experimental 3 (Figura 4.3), na 16ª semana de idade dos animais foi realizada a medida da pressão arterial e, no dia seguinte, os animais passaram pelas cirurgias para implante do sensor de temperatura abdominal e de uma cânula guia no ventrículo cerebral lateral direito. Em seguida, tiveram 5 dias para recuperação das cirurgias, seguidos de 5 dias de familiarização à corrida em esteira rolante. Os animais foram então submetidos a uma sessão de exercício progressivo até a fadiga para determinação da $V_{máx}$ de corrida. No dia do experimento, os animais passaram inicialmente por um período de repouso na esteira pelo tempo mínimo de 60 minutos. Em seguida, os animais dos grupos NWR e SHR foram submetidos a uma das duas situações experimentais desse delineamento: exercício constante a 60% da $V_{máx}$ (NWR: $13,9 \pm 0,3$ m/min; SHR: $13,7 \pm 0,3$ m/min) em ambiente temperado (24°C) após a injeção de salina ou NPS (8,4 mmol). As duas situações de exercício foram realizadas até a fadiga e em ordem randomizada. Durante o exercício foram feitas as medidas da T_{abd} , T_{pele} e do TE.

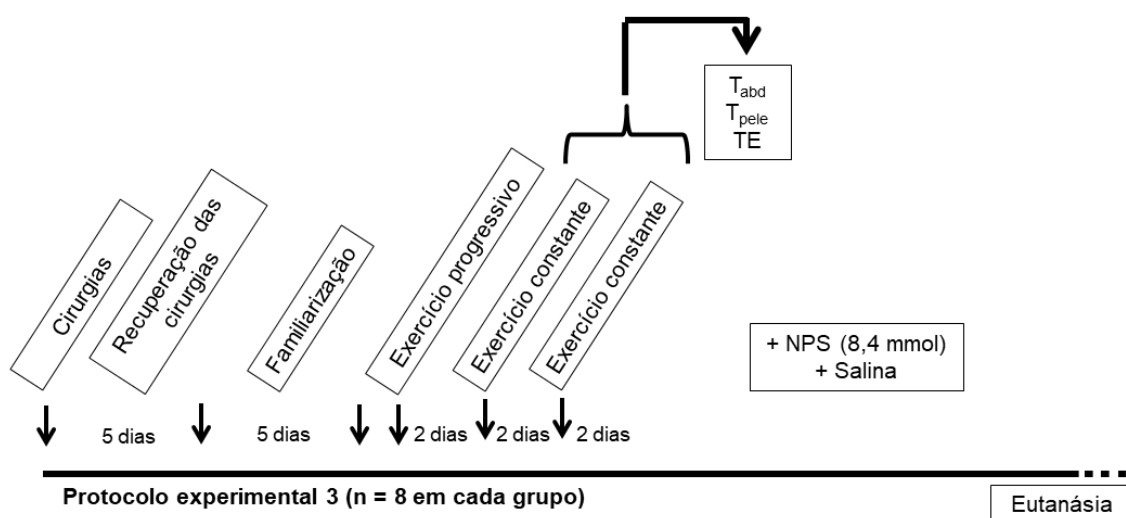


Figura 4.3. Linha do tempo referente ao protocolo experimental 3. NPS, nitroprussiato de sódio; T_{abd} , temperatura abdominal; TE, tempo de exercício; T_{pele} , temperatura da pele da cauda.

4.4.4 Protocolo experimental 4

No protocolo experimental 4 (Figura 4.4), na 8ª semana de idade foi realizado o primeiro teste para avaliação do desempenho físico. Em seguida, os animais realizaram oito semanas de treinamento físico (ou de período controle, sem treinamento). Ao final do treinamento físico, os animais foram submetidos a um procedimento cirúrgico para o implante de um sensor de temperatura intra-abdominal. Após 5 dias para recuperação das cirurgias, os animais foram submetidos a uma sessão de exercício progressivo até a fadiga para determinação da $V_{m\acute{a}x}$ de corrida. No dia do experimento (48 horas após o exercício progressivo), os animais passaram inicialmente por um período de repouso na esteira pelo tempo mínimo de 60 minutos. Em seguida, os animais realizaram um exercício constante a 60% da $V_{m\acute{a}x}$ (NWR NT: $13,9 \pm 0,3$ m/min; NWR T: $16,9 \pm 0,3$ m/min; SHR NT: $13,7 \pm 0,3$ m/min; SHR T: $16,3 \pm 0,6$ m/min) em ambiente temperado (24°C). Durante o exercício, foram realizadas as medidas da T_{abd} , T_{pele} e do TE. Quarenta e oito horas após a realização da última sessão de exercício, foi realizada a eutanásia dos animais para coleta dos cérebros utilizados para avaliar expressão proteica da nNOS.

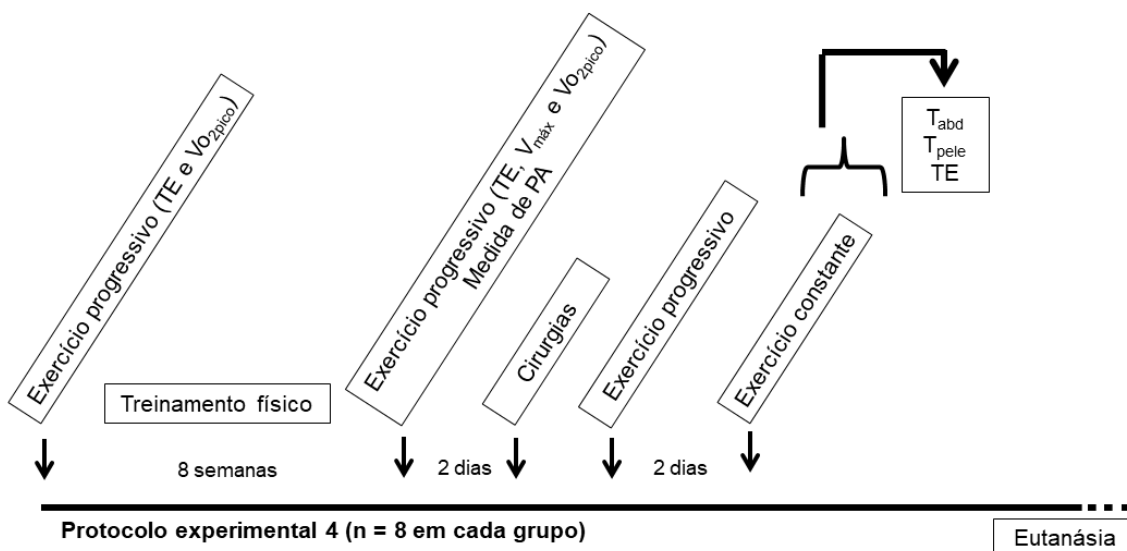


Figura 4.4. Linha do tempo referente ao protocolo experimental 4. NPS, nitroprussiato de sódio; PA, pressão arterial; T_{abd} , temperatura abdominal; TE, tempo de exercício; T_{pele} , temperatura da pele da cauda; Vo_{2pico} , consumo de oxigênio pico.

4.5 Medida da pressão arterial por pletismografia de cauda

A pressão arterial sistólica (PAS) e pressão arterial diastólica (PAD) foram aferidas no início dos experimentos para confirmação da hipertensão arterial nos SHRs. Todos os SHRs apresentaram $PAS \geq 150$ mmHg e, portanto, foram considerados hipertensos (Okamoto e Aoki, 1963). Sendo assim, não houve nenhuma exclusão de amostra por esse motivo. A pressão arterial (PA) foi mensurada através do método não invasivo de pletismografia (LE5001; Panlab[®], Barcelona, Espanha) de cauda (Malkoff, 2005).

Para a análise da pressão arterial, os animais foram familiarizados ao contensor durante 5 dias consecutivos, 5 minutos por dia. O contensor deveria ter um tamanho que proporcionasse conforto ao animal. No dia da medida da PA, os animais foram colocados no contensor em uma sala escura e sem ruídos, e foram passivamente aquecidos por meio de exposição a uma temperatura ambiente de 28-30°C durante 10 minutos. As medidas da PAS e PAD foram realizadas e a pressão arterial média (PAM) calculada a partir da seguinte fórmula:

$$PAM = PAD + \frac{1}{3} (PAS - PAD).$$

4.6 Procedimentos cirúrgicos

4.6.1 Implante de cânula guia no sistema nervoso central

No dia da cirurgia, os animais foram pesados em balança de precisão (Marte, MG, Brasil). No pré-operatório imediato, os animais foram anestesiados com cetamina (80 mg/kg i.p.) e xilazina (10,5 mg/kg i.p.), sendo os reflexos palpebral, interdigital dos membros pélvicos e da cauda verificados para avaliar se estavam anestesiados. Em seguida, foram realizadas duas cirurgias, descritas logo abaixo. Os procedimentos foram realizados em sequência aproveitando-se o mesmo plano anestésico. Após as cirurgias, os ratos receberam 0,1 mL de antibiótico em cada membro pélvico (48000 UI –

Pentabiótico veterinário, via intramuscular) e 0,1 mL de analgésico na região torácica dorsal (Flunixinina meglumina, 1,1 mg/kg, via subcutânea).

Após a indução anestésica, o rato foi imobilizado em decúbito ventral sobre uma plataforma e foi realizada a tricotomia da região superior da cabeça, seguida da aplicação tópica de iodopovidona tópica (10%) para antissepsia. Foi realizada uma incisão longitudinal na pele e no tecido subcutâneo. Uma injeção de xilocaína com vasoconstritor (solução de cloridrato de lidocaina 2% e de adrenalina 1:200000) foi aplicada no local e o perióstio foi afastado (Wanner, 2006), facilitando a exposição do bregma e lambda, referências anatômicas utilizadas na determinação das coordenadas estereotáxicas. Em seguida, o rato foi posicionado e fixado a um estereotáxico para pequenos animais (Insight Equipamentos - modelo ETX3/99, SP, Brasil), e uma cânula guia de aço inoxidável (16 mm de comprimento, 21 gauge) foi implantada, seguindo as coordenadas do atlas de Paxinos e Watson (2007) (ântero-posterior: -1,5 mm posterior ao bregma; médio-lateral: -2,5 mm à direita da linha média; dorso-ventral: -3,6 mm de profundidade a partir do crânio). Os orifícios para a inserção da cânula e dos parafusos que serviram de suporte para a cânula foram realizados com o auxílio de uma broca odontológica (Dremel série 300, WI, EUA). A cânula foi fixada aos parafusos e à calota craniana com cimento odontológico auto-polimerizável (Dental Vip, São Paulo, Brasil). Para evitar a obstrução da cânula, esta foi protegida com um mandril feito com tubo de polietileno e fio de nylon. A cânula foi usada como guia para a inserção da agulha para injeção de droga ou salina antes dos experimentos.

4.6.2 Implante do sensor de temperatura abdominal

Para inserção do sensor de temperatura abdominal, após a indução anestésica, o rato foi imobilizado em decúbito dorsal sobre uma plataforma e foi realizada ampla tricotomia da região abdominal, seguida da aplicação tópica de iodopovidona (10%) para antissepsia. Em seguida, foi efetuada uma incisão ventral mediana na pele de aproximadamente 2 cm, seguida de outra incisão na linha alba do músculo reto abdominal, possibilitando o acesso à cavidade abdominal. Após a inserção do sensor (G2 E-Mitter, modelo ER4000, Mini-Mitter) que foi ancorado à fáscia do músculo reto

abdominal, foram realizadas suturas de padrão interrompido simples para síntese do músculo abdominal e da pele.

4.7 Injeção intracerebroventricular de NPS

Após a recuperação das cirurgias, no dia do experimento, imediatamente antes do início do exercício, 2 μ L de NaCl, ou 2 μ L de NPS (8,4; 4,2 ou 2,1 mmol) foram injetados no ventrículo lateral cerebral direito durante 1 minuto. Para o protocolo dois, as três doses de NPS foram testadas. No terceiro protocolo, apenas a dose de 8,4 mmol de NPS foi usada nos experimentos. A escolha da dose foi baseada nos resultados do protocolo dois, onde foram observados maiores efeitos termorregulatórios com a injeção da dose de 8,4mmol.

4.8 Familiarização à corrida em esteira rolante

O período para recuperação após as cirurgias foi de 5 dias, tempo suficiente para que todos os animais recuperassem a massa corporal pré-cirúrgica. Após esse período, os ratos foram familiarizados a correr em uma esteira rolante para pequenos animais (Panlab, S.L.U, Barcelona, Espanha) por 5 dias consecutivos. Cada sessão diária teve duração de 10 minutos, sendo que, nos primeiros 5 minutos, a esteira permaneceu desligada e o rato pôde se movimentar livremente na esteira e explorar o ambiente. A esteira foi então ligada e, nos 5 minutos finais, o rato foi submetido ao exercício. A inclinação da esteira foi de 5°, o estímulo elétrico de 0,2 mA, e a velocidade da esteira foi ajustada diariamente (10, 10, 11, 13, 15 m/min).

A familiarização foi realizada a uma temperatura ambiente de 24°C. Nos três últimos dias do protocolo de familiarização, um termopar (modelo S-09K, Intrutherm, Brasil) foi preso à cauda do animal. O objetivo dessa familiarização foi ensinar os ratos em qual direção correr, sem ficarem entrelaçados ao fio do termopar, além de diminuir a exposição dos mesmos ao estímulo elétrico durante os experimentos (Wanner *et al.*, 2007).

4.9 Protocolo de exercício progressivo

Os animais foram submetidos ao protocolo de exercício progressivo. A inclinação da esteira foi sempre mantida em 5° e o estímulo elétrico em 0,2 mA. A velocidade inicial da esteira foi de 10 m/min, com incrementos de 1 m/min a cada 3 minutos, até o momento em que o rato não conseguisse manter o desempenho físico. O critério para determinar o momento da fadiga foi a permanência do animal por 10 s sobre a grade de estímulo elétrico. Esse protocolo de exercício serviu para determinar o desempenho aeróbico dos animais e a $V_{máx}$ de corrida, que serviu para definir a velocidade de corrida nos protocolos de exercício constante.

4.10 Protocolo de exercício constante

Os animais foram retirados do biotério, pesados e levados em sua caixa até o ambiente do experimento. Em seguida, a agulha de injeção foi inserida através da cânula guia para injeção da droga ou salina imediatamente antes do início do exercício, e um termopar foi fixado na cauda do rato para medida da temperatura da pele. Logo após, os animais passaram inicialmente por um período de repouso na esteira pelo tempo mínimo de 60 minutos. Terminando o repouso, foi realizada a injeção da droga ou salina e os animais foram submetidos ao protocolo de exercício constante até a fadiga.

A inclinação da esteira foi sempre mantida em 5°, e o estímulo elétrico em 0,2 mA. A velocidade da esteira utilizada nos experimentos correspondeu a 60% da velocidade máxima obtida no exercício progressivo. A intensidade do exercício (moderada) foi escolhida com base nos critérios de prescrição de exercício propostos pelo *American College of Sports Medicine* para seres humanos hipertensos (Pescatello *et al.*, 2004).

4.11 Treinamento físico

O treinamento físico aeróbio foi realizado em esteira durante 8 semanas, 5 dias por semana. O protocolo iniciou com velocidade de $8 \text{ m}\cdot\text{min}^{-1}$, com 5° de inclinação, durante 30 minutos. A intensidade e o volume foram aumentados gradualmente até atingirem a velocidade de $18 \text{ m}\cdot\text{min}^{-1}$, com 5° de inclinação da esteira, durante 60 minutos (Teixeira-Coelho *et al.*, 2017). A figura 4.5 e a Tabela 4.1 apresentam a evolução da carga de treinamento ao longo do treinamento. Para garantir manipulação semelhante aos grupos treinados, os grupos não-treinados realizaram o exercício físico em esteira rolante 2 vezes por semana com intensidade de $8 \text{ m}\cdot\text{min}^{-1}$, com 5° de inclinação da esteira, por 5 minutos.

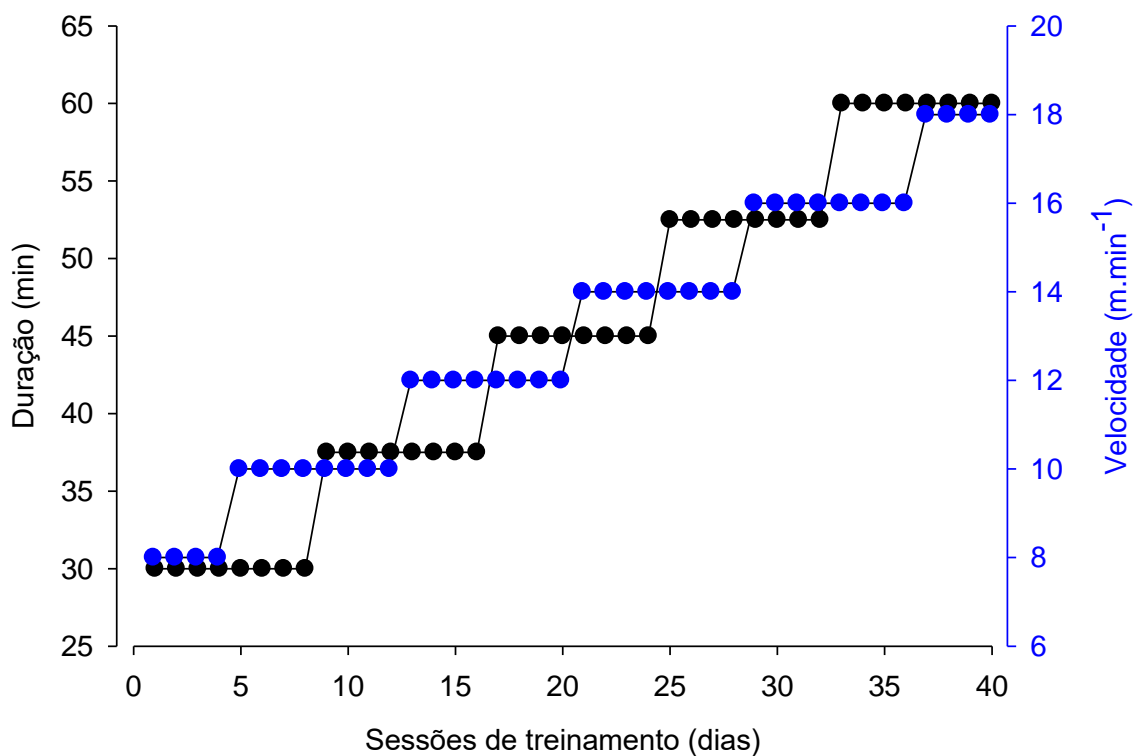


Figura 4.5. Cargas do treinamento físico aeróbio em esteira rolante. Descrição dos aumentos da velocidade da esteira (azul) e da duração da sessão de treinamento (preto) durante as 40 sessões de treinamento físico. Cada círculo representa uma sessão de treinamento.

Tabela 4.1. Protocolo de treinamento físico aeróbio em esteira rolante durante 8 semanas.

	Dia 1 V (m·min ⁻¹) D (min)	Dia 2 V (m·min ⁻¹) D (min)	Dia 3 V (m·min ⁻¹) D (min)	Dia 4 V (m·min ⁻¹) D (min)	Dia 5 V (m·min ⁻¹) D (min)
Semana 1	30,0 – 8	30,0 – 8	30,0 – 8	30,0 – 8	30,0 – 10
Semana 2	30,0 – 10	30,0 – 10	30,0 – 10	37,5 – 10	37,5 – 10
Semana 3	37,5 – 10	37,5 – 10	37,5 – 12	37,5 – 12	37,5 – 12
Semana 4	37,5 – 12	45,0 – 12	45,0 – 12	45,0 – 12	45,0 – 12
Semana 5	45,0 – 14	45,0 – 14	45,0 – 14	45,0 – 14	52,5 – 14
Semana 6	52,5 – 14	52,5 – 14	52,5 – 14	52,5 – 16	52,5 – 16
Semana 7	52,5 – 16	52,5 – 16	60,0 – 16	60,0 – 16	60,0 – 16
Semana 8	60,0 – 16	60,0 – 18	60,0 – 18	60,0 – 18	60,0 – 18

V, velocidade durante a sessão de treinamento; T, tempo da sessão de treinamento.

4.12 Eutanásia

No delineamento experimental 1, após a realização dos experimentos, os ratos foram submetidos à eutanásia, sob anestesia geral, por meio de exsanguinação induzida pelo método de perfusão transcardíaca. Para isso, foram anestesiados profundamente com cetamina (120 mg/kg i.p.) e xilazina (15 mg/kg i.p.). Em seguida, foi realizada a canulação da aorta ascendente, seguida de um corte no átrio direito para permitir a exsanguinação. Na sequência, os animais foram perfundidos com solução salina 0,9% (100 mL, fluxo de 10 mL/min), seguida de solução de paraformaldeído 4% (400 mL, fluxo de 10 mL/min), com auxílio de uma bomba dosadora peristáltica (Gilson, Middleton, WI, EUA). Os cérebros foram retirados e pós-fixados por 48 h em paraformaldeído 4% a 4°C, e então foram colocados em solução de sacarose (30%) por mais 48 h, também a 4°C. Após este procedimento, os cérebros foram congelados por imersão com duração de 1 minutos em isopentano a -50°C, enrolados em papel alumínio e imediatamente armazenados em um freezer a -80 °C.

Após o último dia de experimentos, os animais dos delineamentos 2 e 3 foram submetidos à eutanásia por meio de sobredose anestésica com cetamina (240 mg/kg i.p.) e xilazina (31,5 mg/kg i.p.).

No delineamento experimental 4, 48 horas após a última sessão de exercício, a eutanásia dos animais foi realizada por decapitação em guilhotina. Em seguida, os cérebros foram retirados e armazenados a -80°C para posterior análises.

4.13 Imunohistoquímica

Os cérebros congelados foram seccionados em cortes de $50\ \mu\text{m}$, com o auxílio de um criostato (Leica miicrosystems, Srt. Heidelberg, Alemanha). As secções contendo as regiões de interesse [área pré-óptica medial (mPOA), núcleo paraventricular (PVN) e núcleo supra-óptico (SON)] foram armazenadas em solução crioprotetora até a realização do ensaio imunohistoquímico. Os cortes foram submetidos a protocolo de marcação para a proteína c-Fos, marcador indireto da atividade neuronal, através da imunohistoquímica pelo método de free-floating (Hoffman *et al.*, 2008).

As fatias de cérebros foram lavadas com PBS (0,01 M) em 10 sessões de 5 min, seguido de incubação com glicina (0,1 M) em PBS (0,01 M) por 10 min e nova lavagem em PBS (0,01 M) por 5 min. Seguiu-se com a incubação em H_2O_2 1% em PBS (0,01 M) por 30 min e posterior lavagem com PBS (0,01 M) por 5 sessões de 5 min. Foi realizada incubação com Triton X-100 0,4% em PBS (0,01 M) por 30 min, seguido de 3 sessões de lavagem de 5 min com PBS (0,01 M). As fatias foram então incubadas com albumina sérica bovina (BSA) 2% em PBS (0,01 M) por 1 h e, ao término, com o anticorpo primário anti-c-Fos produzido em coelho (Ab5, Calbiochem, 1:10.000) diluído em PBS 0,01 M contendo Triton X-100 0,3%, BSA 1% (solução também utilizada para diluição do anticorpo secundário) por 48 h a 4°C . Esperado esse tempo, foi realizada lavagem das fatias com PBS (0,01M) por 10 sessões de 5 min, seguido de incubação com o anticorpo secundário biotilado anti-IgG produzido em cavalo (Vectastain ABC kit, Universal, 1:600, Vector Laboratories) por 2 h. As fatias foram lavadas com PBS (0,01 M) por mais 8 sessões de 5 min e incubados com complexo AB (Avidina DH e Peroxidase Biotilado, 1:400, Vectastain ABC kit, Vector Laboratories) diluído em PBS (0,01 M) por 1 h. Posteriormente, 3 sessões de 5 min de lavagem com PBS (0,01 M) foram feitas, seguidas de 3 sessões de 5 min de lavagem com tampão acetato de sódio 0,175 M. As fatias foram então tratadas com solução contendo $0,2\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de 3,3-diaminobenzidina (DAB), $25\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de sulfato de níquel e $0,083\ \mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ de H_2O_2 a 30% em tampão acetato (0,175 M) seguido de lavagem com tampão acetato por 3 sessões de 5 min cada e lavagem com

PBS (0,01 M) por 3 sessões de 5 min. Os cortes foram montados em lâminas gelatinizadas, que passaram pelo processo de secagem e colagem de lamínulas utilizando-se Entellan (Merck).

Os cortes foram fotografados em campo claro de iluminação com objetiva de 20X. Para a análise das estruturas encefálicas ativadas, foi quantificado o número de neurônios imunorreativos a c-Fos em cada região cerebral avaliada, bilateralmente. As coordenadas de cada região foram definidas segundo o atlas de Paxinos e Watson (2005), conforme as coordenadas ântero-posteriores (a partir do bregma) descritas abaixo:

- mPOA: -0,24 a -0,36 mm;
- PVN: -1,72 a -1,92 mm;
- SON: -0,60 a -1,08 mm.

A Figura 4.6 apresenta imagens representativas das regiões analisadas, As imagens foram realizadas em um aumento menor para permitir a visualização das estruturas.

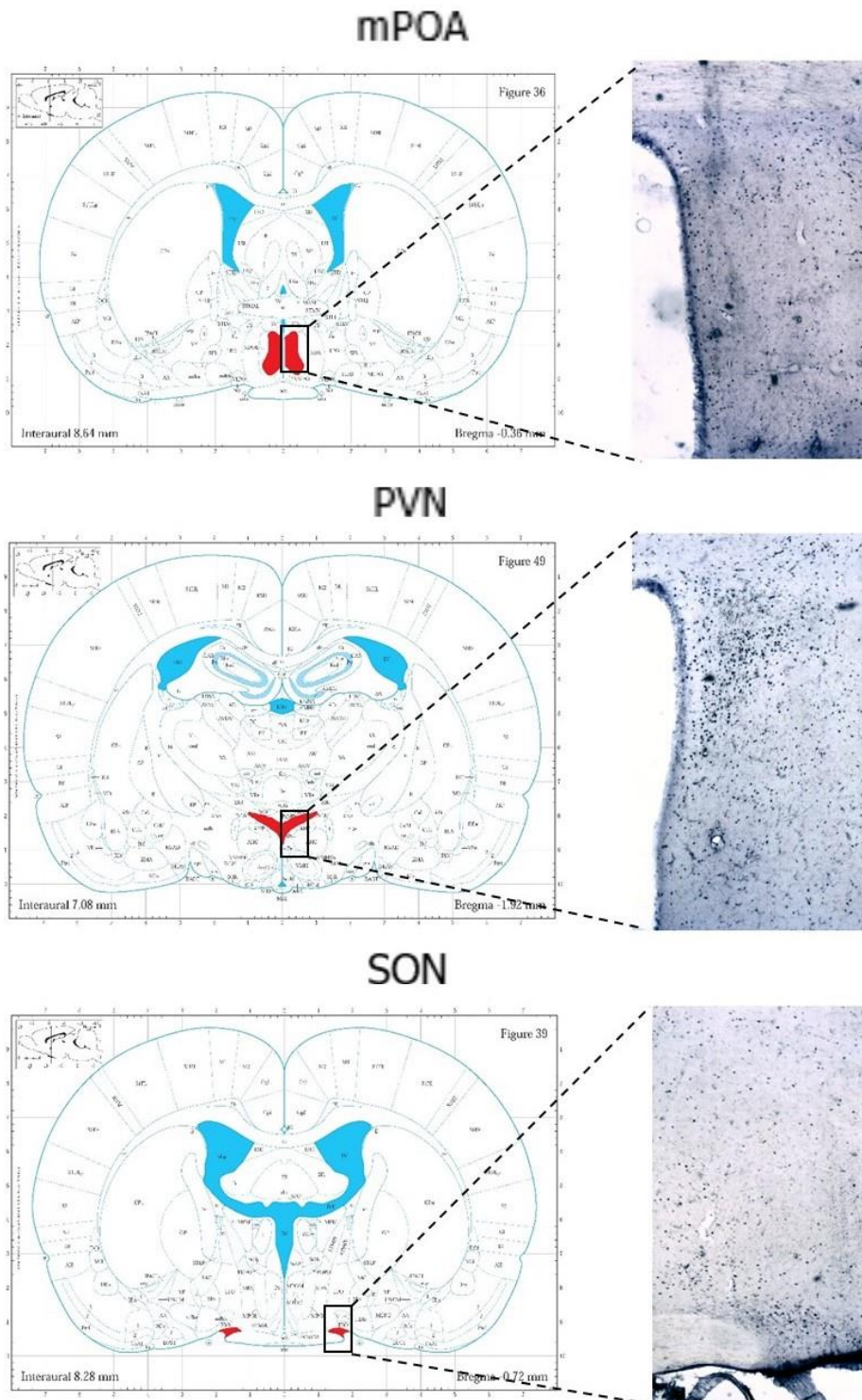


Figura 4.6 Imagens representativas das regiões de interesse analisadas (mPOA, PVN e SON). As imagens da foram realizadas com lente objetiva com aumento de 4 vezes. Nesse aumento foi possível observar as regiões de interesse e os pontos de referência.

4.14 Análise da expressão proteica por *Western Blot*

4.14.1 Retirada e armazenamento das amostras

A expressão proteica da phospho-nNOS (Ser 852) e da nNOS foi quantificada por meio de *Western blot* na APO e PVN. Para a realização dessa técnica, após a eutanásia dos animais, os cérebros foram removidos e imediatamente congelados em gelo seco e em seguida armazenados em freezer -80°C.

Os cérebros congelados foram seccionados de forma transversal com o auxílio de um criostato (Leica miicrosystems, Srt. Heidelberg, Alemanha) para obtenção das regiões de interesse: APO (480 µm de espessura) e PVN (360 µm de espessura). Optou-se por agulhas de 2,0 mm e 1,2 mm para a APO e o PVN, respectivamente, sendo que essas agulhas utilizadas de forma centralizada (em relação ao 3º ventrículo). Dessa maneira, foi possível extrair as regiões correspondentes aos núcleos/áreas de interesse (Palkovits, 1973).

Para as secções de cada uma das regiões de interesse, foram utilizadas as seguintes coordenadas ântero-posteriores como referência (em relação ao bregma):

- POA: 0,12 a -0,36 mm;
- PVN: -1,56 a -1,92 mm.

4.14.2 Extração e quantificação de proteínas

As proteínas das APO e PVN foram isoladas através da dissociação mecânica dos tecidos contendo tampão de lise (pH 8.0, Tris-Base a 50 mmol/l, NaCl a 100 mmol/l, EGTA a 5 mmol/l, Na₄P₂O₇ a 50 mmol/l, MgCl₂ a 1 M, Nonidet P/40 a 1%, Triton X-100 a 0,3%, deoxicolato de sódio a 0,5% e coquetel de inibidores de protease a 1%, Sigma-Aldrich). As proteínas foram quantificadas pelo método de Bradford (Bradford, 1976). Para a corrida de eletroforese, 40 µg de proteínas foram utilizadas para todas as amostras.

4.14.3 Western Blot

Amostras contendo 40 µg de proteínas foram desnaturadas a 95°C por 5 minutos com tampão contendo 5% de *2-mercaptoethanol* (Invitrogen). As amostras foram corridas em gel 10% SDS-PAGE a 120V (1 hora e 50 min) e transferidas por 40 minutos a 20V no sistema de transferência Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell (BioRad) para membranas de fluoreto de polivinilidene (PVDF). Após a transferência, as membranas foram coradas com o corante *Ponceau*, para a conferência da uniformidade da transferência. Os sítios inespecíficos de ligação nas membranas foram bloqueados com solução de 5% de leite desnatado ou 5% BSA diluído em TBS/Tween 0,05% por 1 hora em temperatura ambiente.

Em seguida, as membranas foram incubadas com anticorpo para: *phospho-nNOS* (1:1000, sc19826, Santa Cruz Biotechnology, Inc.) a 4 °C *overnight*. Após esse período, as membranas foram lavadas por 30 min e incubadas com anticorpo secundário anti-goat (1:5000, n. Cat. 1721034, Bio-Rad Laboratories, Inc.) por 1 hora, lavadas por 30 min e então reveladas. A imunodeteção foi feita através do ganho de quimioluminescência através da solução ECL conjugada à peroxidase (n. Cat. 170-5060, Bio-Rad Laboratories, Inc.) aplicada diretamente sobre a membrana. As imagens foram capturadas e analisadas através do *Software Image Quant* LAS 4000. Após a revelação da membrana, as mesmas passaram pelo processo de *stripping* (EMD Millipore Corp.) para remoção dos anticorpos ligados e foram novamente bloqueadas e incubadas com os anticorpos das proteínas normalizadoras. A normalização da densidade de pixels da proteína fosforilada foi feita pela correção dos valores da banda pela expressão de sua proteína total, utilizando o seguinte anticorpo: anti-nNOS (1:1000; n. Cat. ab76067, Abcam) e pelo gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH, 1:1000; n. Cat. sc365062, Santa Cruz Biotechnology, Inc.).

4.15 Variáveis

4.15.1 Variáveis medidas

4.15.1.1 Temperatura abdominal (T_{abd})

A T_{abd} foi mensurada por telemetria, por meio de um sensor de temperatura (G2 E-Mitter, modelo ER4000, Mini-Mitter, OR, EUA) implantado na cavidade abdominal. O sensor envia pulsos com diferentes frequências de acordo com a temperatura abdominal. As frequências das ondas de rádio foram captadas por uma placa receptora (modelo ER-4000 energizer/receiver, Respironics INC. Company, Mini) posicionada ao lado da esteira. A frequência das ondas de rádio, coletada a cada 10 s, foi convertida em valores de temperatura, e os dados foram enviados para o *software* Vital View (Mini-Mitter, OR, EUA).

4.15.1.2 Temperatura da pele da cauda (T_{pele})

A T_{pele} foi mensurada através de um termopar (modelo S-09K, Intrutherm, Brasil) acoplado a um teletermômetro (modelo THR-140, Intrutherm, Brasil). O termopar foi fixado na porção lateral, a aproximadamente 2 cm da base da cauda do rato utilizando-se um esparadrapo.

A posição de fixação do termopar foi escolhida com base nos resultados de Young e Dawson (1982). A maior proximidade da base da cauda permite a medida de alterações da temperatura da pele que ocorrem em função das alterações de fluxo sanguíneo local.

4.15.1.3 Tempo de exercício (TE)

Esta variável foi representada pelo tempo transcorrido (min) entre o início do exercício e o momento da fadiga. A medida foi realizada por meio de um cronômetro com precisão de 0,01 s.

4.15.1.4 Consumo de oxigênio pico ($VO_{2\text{pico}}$)

O $VO_{2\text{pico}}$ ($\text{ml.kg}^{-0,75}.\text{min}^{-1}$) foi determinado por meio de calorimetria indireta de circuito aberto (Panlab, Harvard Apparatus, Espanha) e os dados obtidos foram transmitidos para um sistema computadorizado (Metabolism, Panlab, Harvard Apparatus, Espanha). O $VO_{2\text{pico}}$ foi analisado nos animais do protocolo 4 e foi determinado durante protocolos de exercício progressivo, conforme descrito no item 4.9. A determinação do $VO_{2\text{pico}}$ foi realizada antes e após 8 semanas de treinamento físico (ou período sem treinamento nos grupos não treinados). O valor de $VO_{2\text{pico}}$ juntamente com o TE foram utilizados como parâmetros para avaliar a efetividade do treinamento físico para o aumento da capacidade aeróbica.

4.15.2 Variáveis de controle

4.15.2.1 Massa Corporal

A massa corporal dos ratos foi medida diariamente, antes das cirurgias e antes dos experimentos. A variação da massa corporal serviu como indicador do estado de saúde dos animais.

4.15.2.2 Temperatura ambiente no interior da esteira (T_a)

A T_a foi mensurada por meio de um termosensor (modelo S-09K, Intrutherm, Brasil) acoplado a um teletermômetro (modelo THR-140, Intrutherm, Brasil) e fixado na parte superior da tampa de acrílico de cobertura da esteira. Durante os experimentos, a temperatura seca foi mantida em 24°C. A temperatura ambiente no interior da esteira foi mantida através de um ar condicionado (York, PA, EUA).

4.15.3 Variáveis calculadas

4.15.3.1 Velocidade máxima atingida durante a corrida ($V_{máx}$)

A $V_{máx}$ foi calculada a partir de uma adaptação da fórmula proposta por Kuipers et al. (1985) para o cálculo da potência máxima:

$$V_{máx} = V_1 + (V_2 \cdot \frac{t}{180})$$

Sendo:

V_1 : a velocidade da esteira atingida no último estágio completo ($m \cdot min^{-1}$);

V_2 : o incremento na velocidade da esteira a cada estágio ($m \cdot min^{-1}$);

t: o tempo gasto no estágio incompleto (s).

4.15.3.2 Trabalho (W)

Para o cálculo do trabalho, foi usada a seguinte fórmula (Brooks e White, 1978; Brooks *et al.*, 1984):

$$W = mc \cdot g \cdot v \cdot \text{sen}\theta \cdot TE$$

Sendo:

W: Trabalho (J);

mc: massa corporal (kg);

g: aceleração da gravidade ($\text{m}\cdot\text{s}^{-2}$);

v: velocidade da esteira ($\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$);

sen θ : inclinação da esteira

TE: tempo total de exercício (min)

4.15.3.3 Limiar térmico para dissipação de calor (H_{thr})

O H_{thr} corresponde ao valor médio de temperatura interna registrado no momento em que a T_{pele} começa a aumentar (estatisticamente, $p < 0,05$) em comparação com o seu menor valor atingido (nadir) após o início do exercício, adaptado de Drummond *et al.* (2016)

4.15.3.4 Sensibilidade para dissipação de calor (H_{sen})

A H_{sen} foi determinada através da regressão linear dos cinco valores de T_{abd} e T_{pele} correspondentes ao aumento exponencial da T_{pele} após o alcance do H_{thr} (Drummond *et al.*, 2016).

4.15.3.5 Eficiência termorregulatória

A eficiência termorregulatória foi calculada pela razão entre o acúmulo de calor e o trabalho realizado. Quanto menor o valor encontrado, maior é a eficiência termorregulatória

4.16 Análise estatística

Os dados foram expressos como média \pm E.P.M. O teste de Shapiro-Wilk foi usado para verificar a normalidade dos dados. No protocolo 1, para a comparação dos dados referentes à T_{abd} e T_{pele} entre os diferentes grupos (NWR e SHR) foram usadas ANOVAs two-way de medidas repetidas, seguidas do *post hoc* de Tukey. A avaliação da ativação neuronal foi avaliada através de ANOVA two-way, seguida do *post hoc* de Tukey. A massa corporal, PAS, PAM e PAD, H_{thr} e H_{sen} foram avaliados por meio do teste *t* de Student. Foram realizadas análises de correlação de Pearson entre os valores de ativação neuronal e o H_{thr} .

No protocolo 2, para a comparação dos dados referentes à T_{abd} e T_{pele} entre as diferentes doses de NPS (Salina, 8,4; 4,2 e 2,1 mmol) foram usadas ANOVAs two-way de medidas repetidas, seguidas do *post hoc* de Tukey. Para avaliar o TE dos animais ANOVA one-way seguida do *post hoc* de Tukey.

No protocolo 3, para a comparação dos dados referentes à T_{abd} e T_{pele} entre os diferentes grupos (NWR e SHR) e situações (salina ou NPS) foram usadas ANOVAs two-way com parcelas subdivididas, seguidas do *post hoc* teste *t* (LSD) ou Scott knott. As variáveis H_{thr} , H_{sen} , TE e W foram comparadas entre grupos e ambientes por meio de ANOVA two-way, seguida do *post hoc* de Tukey. A massa corporal e a PAS foram avaliadas por meio do teste *t* de Student.

No protocolo 4, para a comparação dos dados referentes à T_{abd} e T_{pele} entre os diferentes grupos (NWR e SHR) e situações (não treinado e treinado) foram usadas ANOVAs two-way com parcelas subdivididas, seguidas dos *post hoc* teste *t* (LSD) ou Scott knott. As variáveis relacionadas ao desempenho físico (VO_{2pico} e TE), H_{thr} , H_{sen} , a capacidade de dissipação de calor, e expressão protéica de nNOS foram comparadas entre

grupos e situações por meio de ANOVA two-way, seguida do *post hoc* de Tukey. A massa corporal e a PAS foram comparadas entre grupos e situações por meio de ANOVA two-way, seguida do *post hoc* de Tukey. O nível de significância adotado foi de 5%.

5. RESULTADOS

5.1 Resultados protocolo experimental 1

5.1.1 Características dos animais

A Figura 5.1 apresenta os dados referentes à pressão arterial. A pressão arterial média (167 ± 10 mmHg vs. 102 ± 5 mmHg), sistólica (195 ± 7 mmHg vs. 119 ± 3 mmHg) e diastólica (154 ± 12 mmHg vs. 94 ± 7 mmHg) foi maior ($p < 0,05$) nos SHRs em comparação aos NWRs.

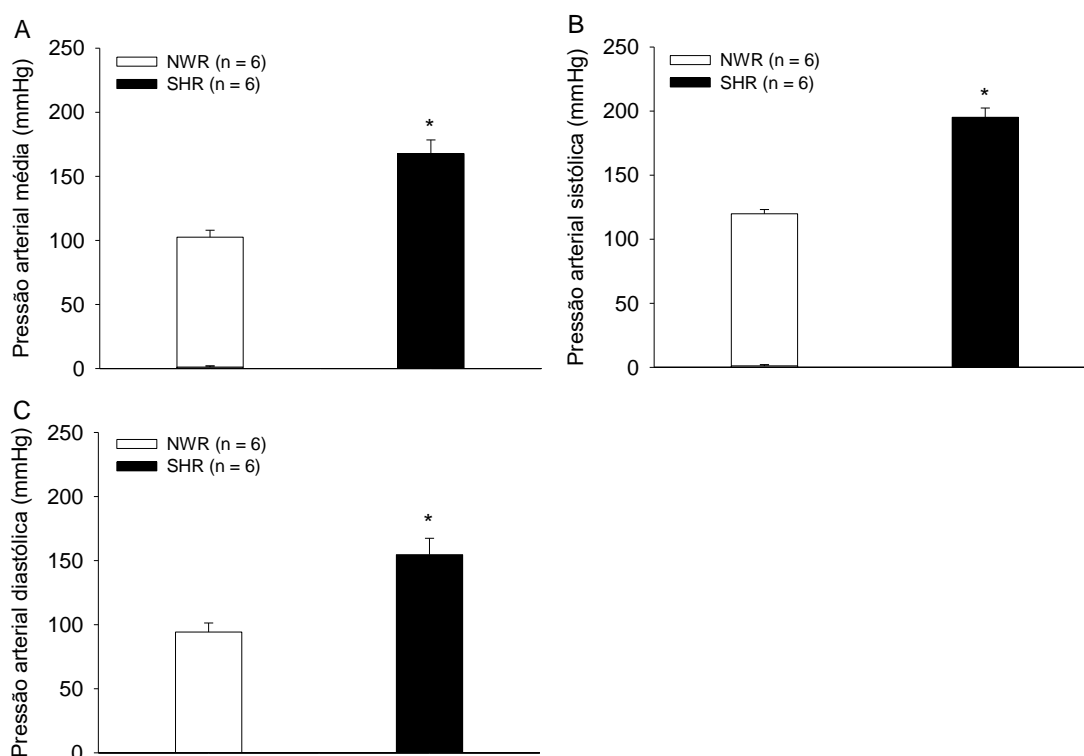


Figura 5.1. Pressão arterial média (A), sistólica (B) e diastólica (C) de ratos dos grupos NWR e SHR. Dados expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs. NWR.

A massa corporal no dia dos experimentos (Figura 5.2) foi menor nos animais SHRs em comparação aos NWRs ($326,8 \pm 5,9$ g vs. $396,5 \pm 11,8$ mmHg, $p < 0,05$).

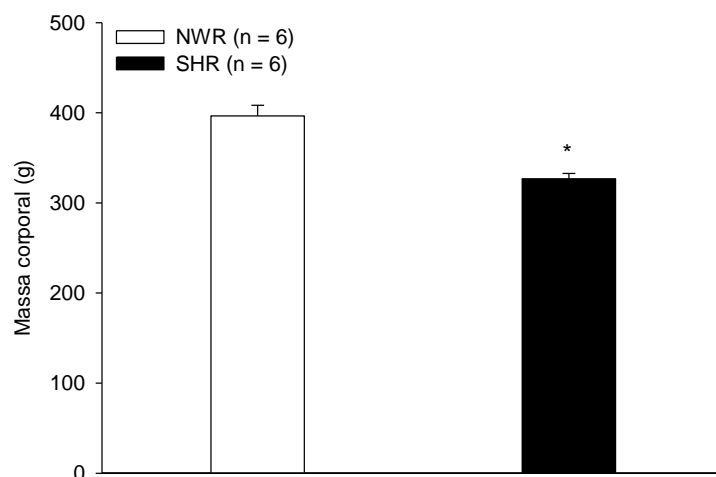


Figura 5.2. Massa corporal de ratos dos grupos NWR e SHR. Dados expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs. NWR.

5.1.2 Balanço térmico durante o exercício

Durante o exercício físico, os animais do grupo SHR apresentaram um aumento exacerbado da T_{abd} quando comparados aos NWRs entre os minutos 12 e 30 (min 30: $39,63 \pm 0,12$ °C vs. $38,67 \pm 0,19$ °C, $p < 0,05$; Figura 5.3A). Os SHRs apresentaram maior latência para o aumento da T_{pele} quando comparados aos NWRs, sendo observadas diferenças nos valores de T_{pele} entre os minutos 12 e 23 (min 23: $30,15 \pm 0,83$ °C vs. $33,55 \pm 0,63$ °C, $p < 0,05$; Figura 5.3B).

Os dados referentes à relação da T_{pele} e da T_{abd} (Figura 5.4A) também indicam uma deficiência para dissipação de calor nos animais hipertensos no início do exercício. A curva dessa relação em animais SHR está deslocada para a direita, indicando que nesses animais houve um aumento acentuado da T_{abd} induzido pelo exercício antes que o aumento da T_{pele} fosse detectado. O H_{trh} foi maior em animais SHR quando comparados aos NWRs ($38,90 \pm 0,22$ °C vs. $37,92 \pm 0,22$ °C, $p < 0,05$; Figura 5.4B) e não houve diferença na H_{sen} entre os grupos (SHR: $7,93 \pm 2,44$ vs. NWR: $14,46 \pm 3,28$, $p > 0,05$; Figura 5.4C).

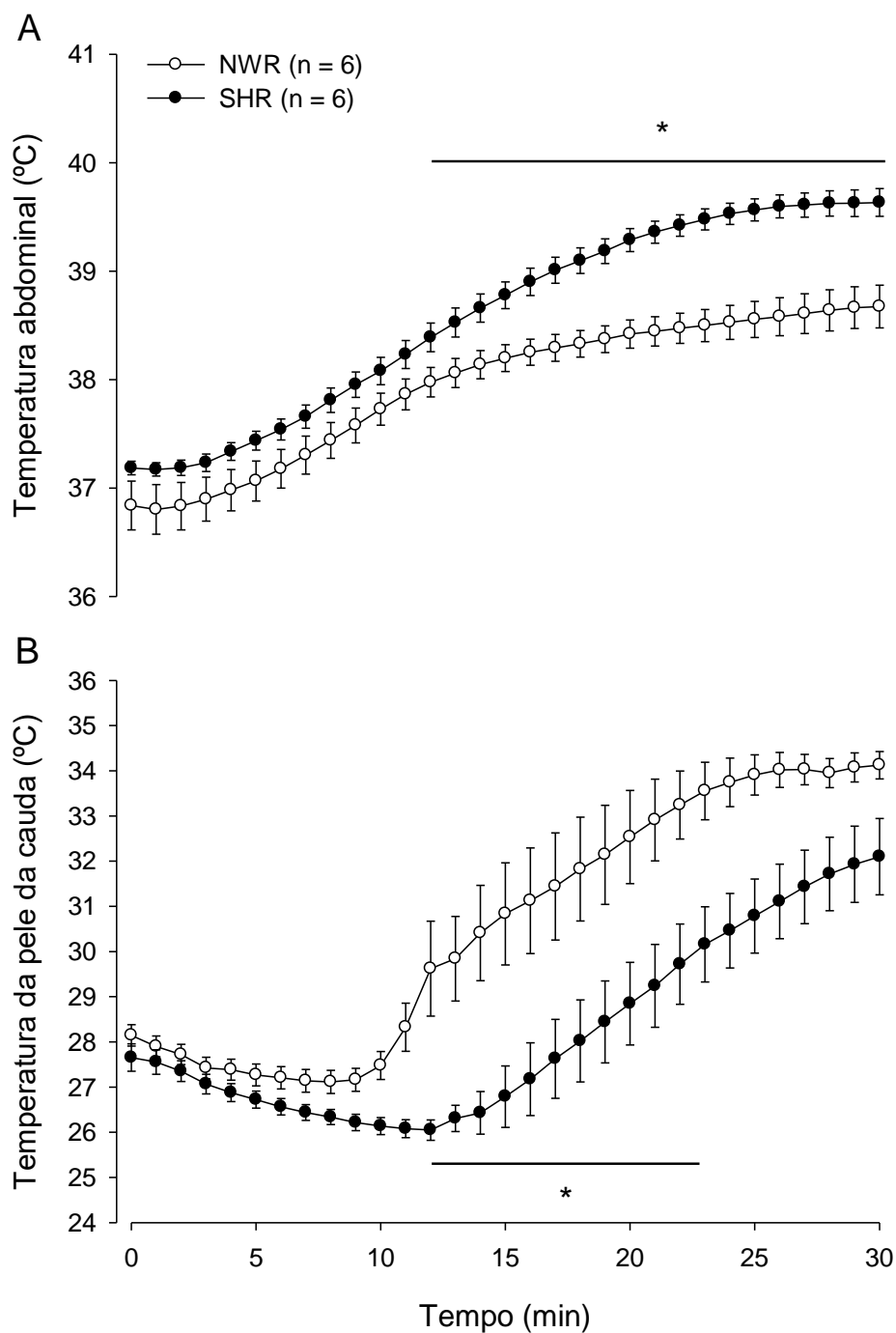


Figura 5.3. Temperaturas abdominal (A) e da pele da cauda (B) dos animais NWRs e SHRs submetidos ao exercício constante. Dados expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs. NWR.

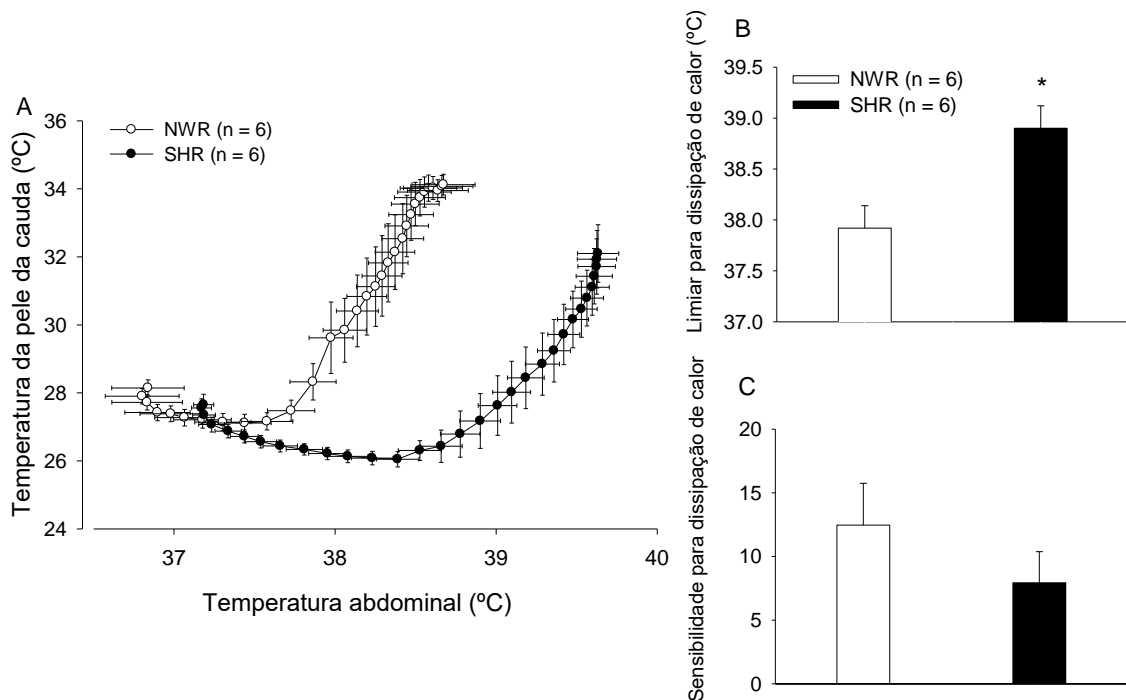


Figura 5.4. Relação entre a temperatura abdominal e a temperatura da pele da cauda (A). Limiar térmico (B) e sensibilidade (C) para dissipação de calor durante o exercício constante. Dados expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs. NWR.

5.1.3 Ativação neuronal das áreas hipotalâmicas envolvidas com a termorregulação durante o exercício

A atividade neuronal foi avaliada em alguns núcleos cerebrais envolvidos com a termorregulação. Na mPOA (Figura 5.5), a realização do exercício físico aumentou o número de neurônios imunorreativos a c-Fos tanto em animais NWRs (145 ± 7 vs. 28 ± 9 , $p < 0,05$) quanto em SHRs (73 ± 8 vs. 32 ± 9 , $p < 0,05$). Porém esse aumento na ativação neuronal em resposta ao exercício foi menor no grupo SHR quando comparado ao grupo NWR (73 ± 8 vs. 145 ± 7 , $p < 0,05$).

No PVN (Figura 5.6), a realização do exercício físico também aumentou a ativação neuronal tanto em animais NWRs (405 ± 31 vs. 168 ± 38 , $p < 0,05$) quanto em SHRs (226 ± 38 vs. 109 ± 38 , $p < 0,05$). Assim como na mPOA, a ativação neuronal em resposta ao exercício foi menor no grupo SHR quando comparado ao grupo NWR (226 ± 38 vs. 405 ± 31 , $p < 0,05$).

No SON (Figura 5.7), a realização do exercício físico também aumentou a ativação neuronal tanto em animais NWRs (160 ± 13 vs. 35 ± 15 , $p < 0,05$) quanto em SHRs (154 ± 15 vs. 27 ± 15 , $p < 0,05$). Porém não foram observadas diferenças na ativação neuronal em resposta ao exercício entre os grupos SHR e NWR (SHR: 154 ± 15 vs. NWR: 160 ± 13 , $p > 0,05$).

Além disso, houve uma forte correlação negativa entre o H_{thr} e o número de neurônios imunorreativos a c-Fos na mPOA ($r = -0,73$; $p < 0,05$; Figura 5.5F) e no PVN ($r = -0,72$; $p < 0,05$; Figura 5.6F). Já no SON não houve essa correlação ($r = -0,34$; $p = 0,33$; Figura 5.7F). Como esperado, não houve correlação entre a H_{sen} e o número de neurônios imunorreativos a c-FOS na mPOA ($r = 0,47$; $p = 0,14$), no PVN ($r = -0,15$; $p = 0,65$) e no SON ($r = -0,35$; $p = 0,31$).

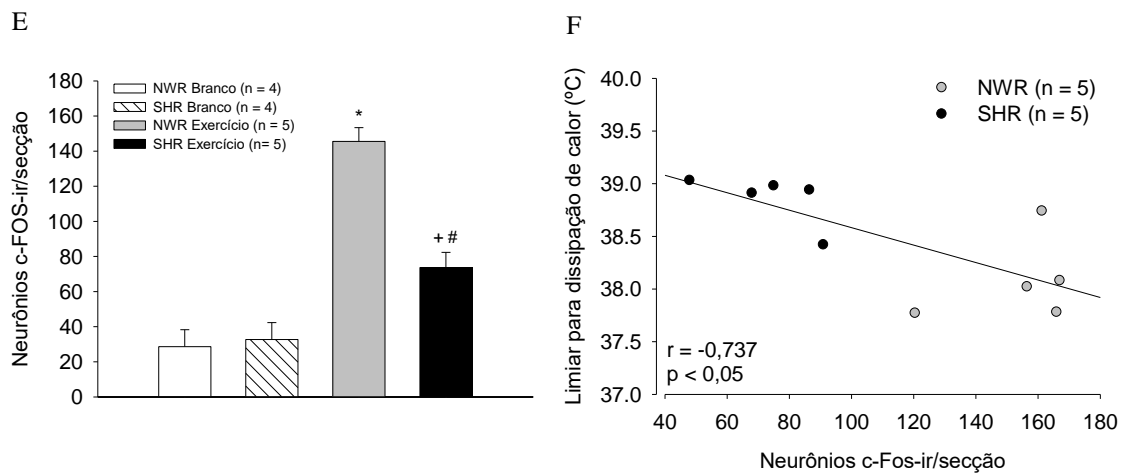
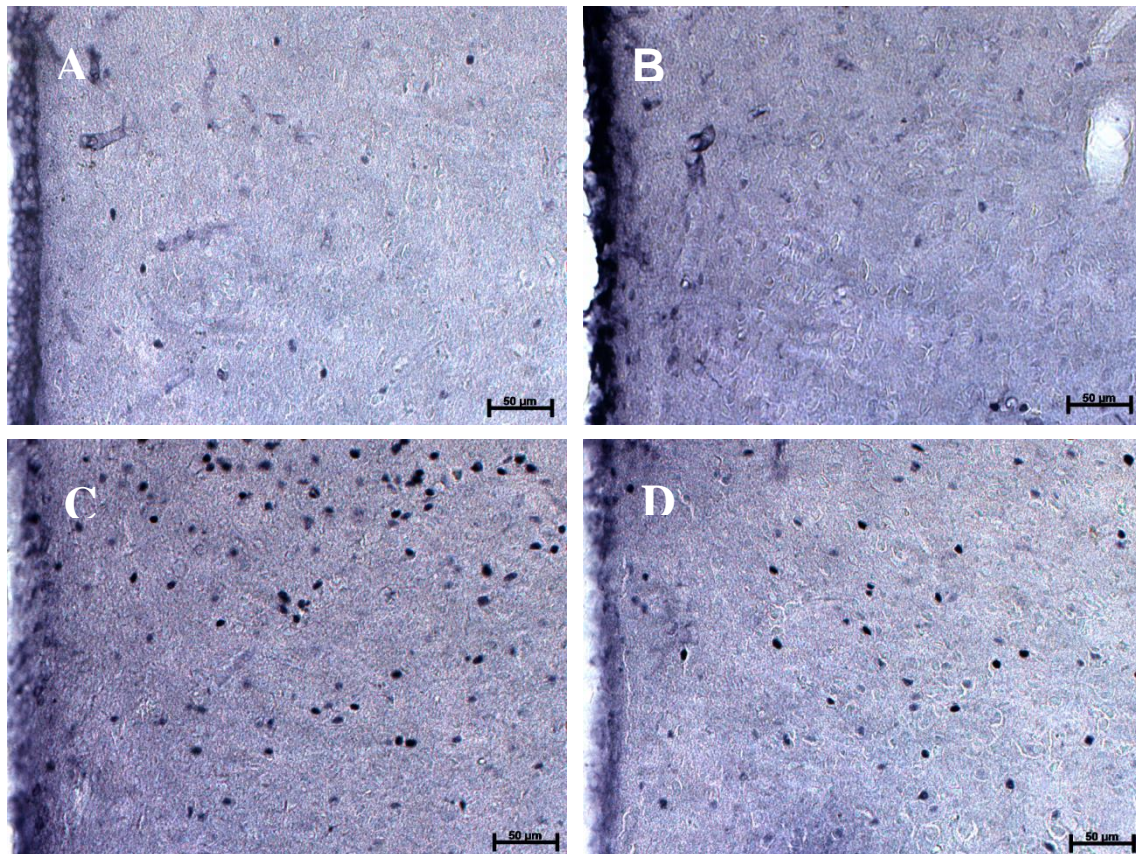


Figura 5.5. Imagens representativas da mPOA mostrando imunorreatividade à c-FOS (núcleos cinza/pretos) dos grupos NWR Branco (A), SHR Branco (B), NWR Exercício (C), SHR Exercício (D). Número de neurônios imunorreativos a c-Fos/secção na mPOA (E). Correlação entre H_{thr} e o número de neurônios imunorreativos a c-Fos na mPOA (F). Dados expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs. NWR Branco, + $p < 0,05$ vs. SHR Branco, # $p < 0,05$ vs. NWR Exercício.

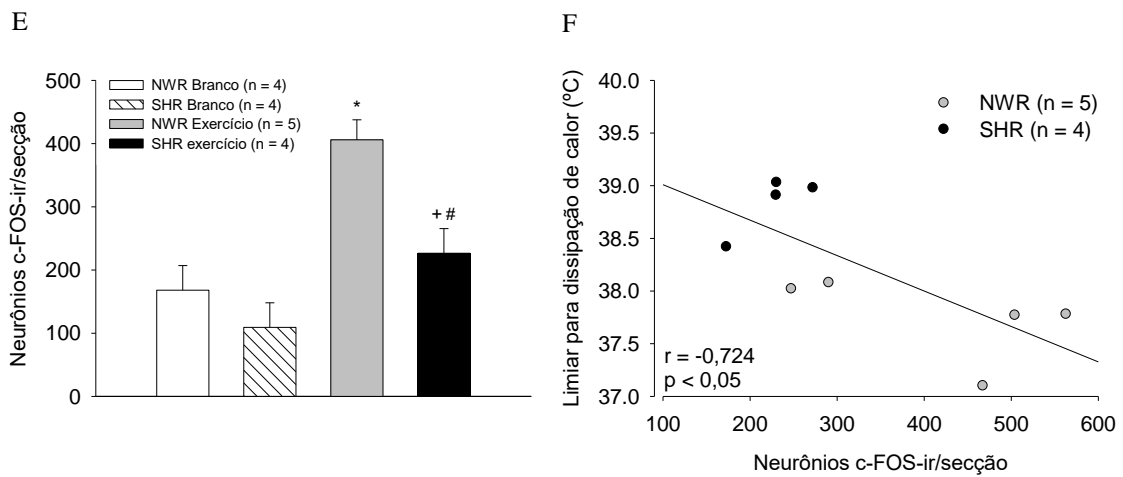
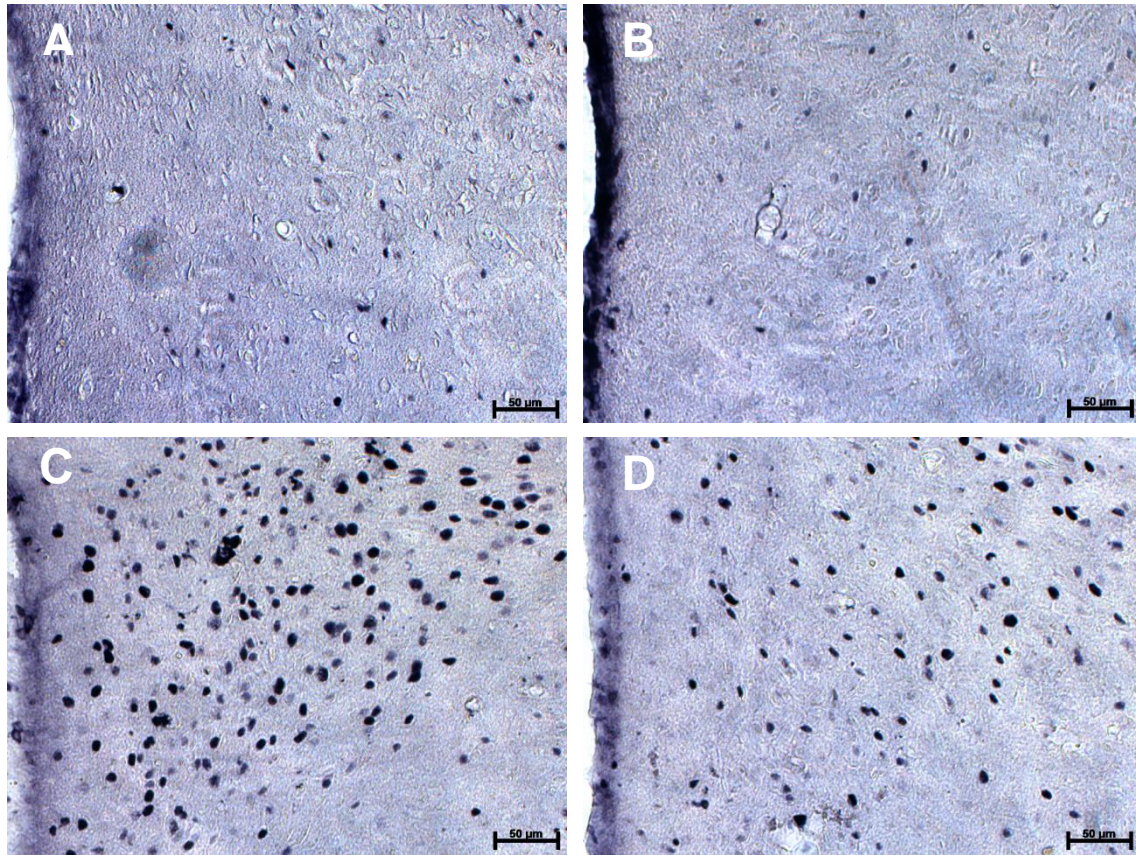


Figura 5.6. Imagens representativas do PVN mostrando imunorreatividade à c-FOS (núcleos cinza/pretos) dos grupos NWR Branco (A), SHR Branco (B), NWR Exercício (C), SHR Exercício (D). Número de neurônios imunorreativos a c-Fos/secção no PVN (E). Correlação entre H_{thr} e o número de neurônios imunorreativos a c-Fos no PVN (F). Dados expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs. NWR Branco, + $p < 0,05$ vs. SHR Branco, # $p < 0,05$ vs. NWR Exercício.

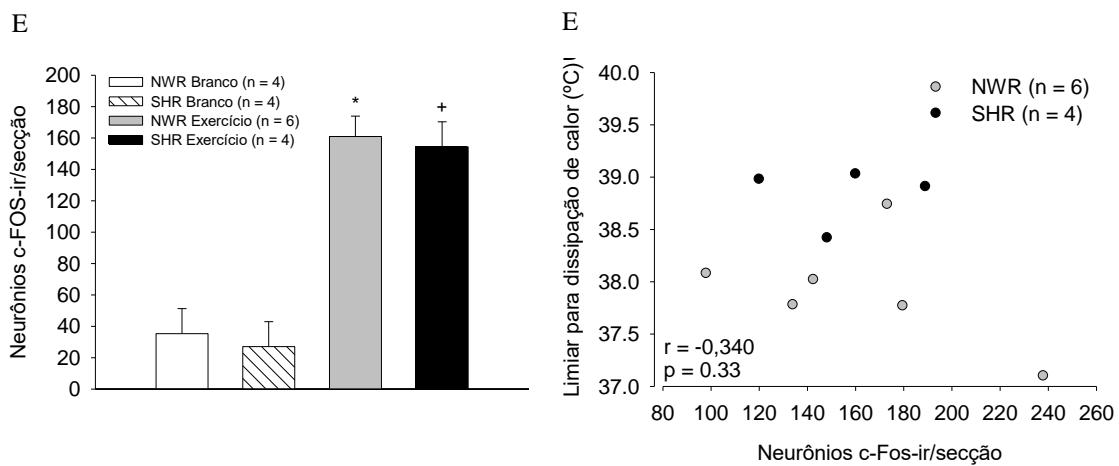
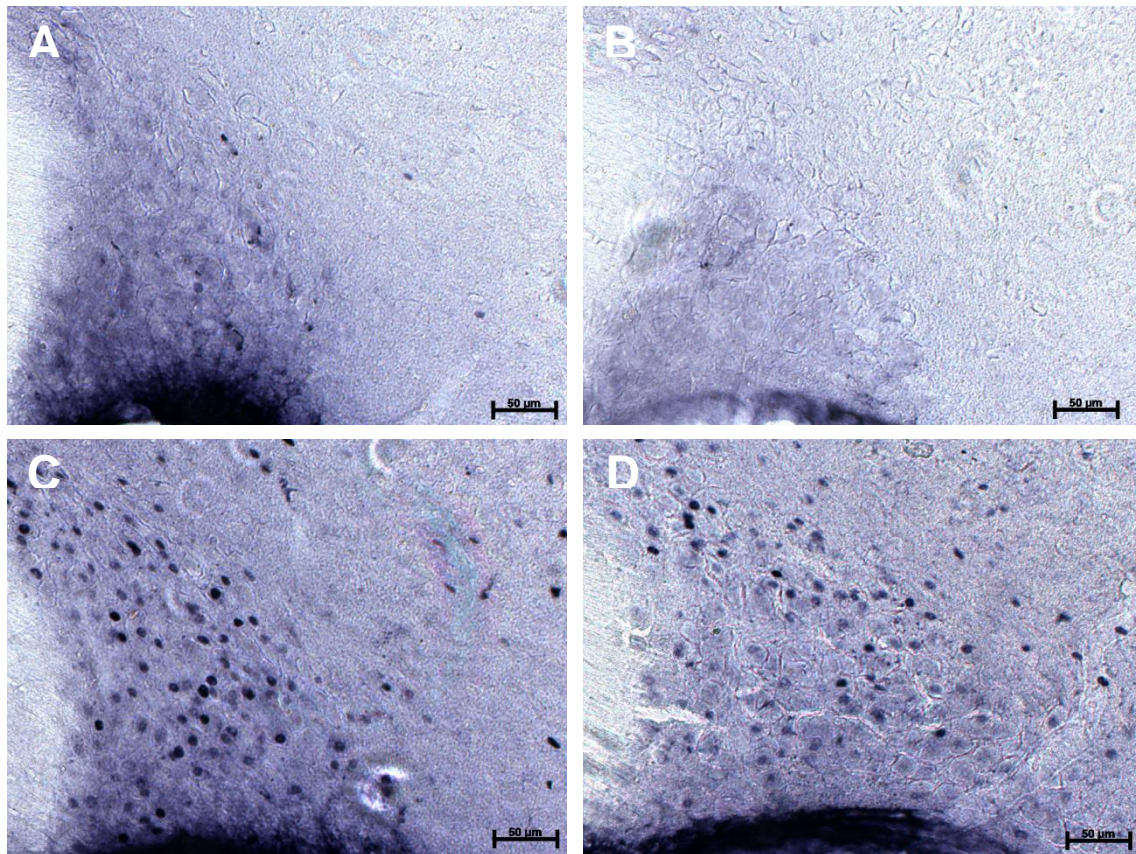


Figura 5.7. Imagens representativas do SON mostrando imunorreatividade à c-FOS (núcleos cinza/pretos) dos grupos NWR Branco (A), SHR Branco (B), NWR Exercício (C), SHR Exercício (D). Número de neurônios imunorreativos a c-Fos/secção no SON (E). Correlação entre H_{thr} e o número de neurônios imunorreativos a c-Fos no SON (F). Dados expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs. NWR Branco, † $p < 0,05$ vs. SHR Branco.

5.2 Resultados do protocolo experimental 2

5.2.1 Balanço térmico durante o exercício

Para determinar a curva dose-resposta do efeito da injeção i.c.v. de NPS na termorregulação durante o exercício (Figura 5.8), foram testadas três doses de NPS (8,4 mmol; 4,2 mmol; 2,1 mmol). A injeção i.c.v. de NPS na dose de 8,4 mmol provocou maior aumento da T_{pele} entre os minutos 13 e 16, 26 e 29 e no momento da fadiga (fadiga: $3,73 \pm 0,27$ °C vs. $2,46 \pm 0,83$ °C, $p < 0,05$) em comparação ao grupo salina, e consequentemente menor aumento na T_{abd} entre os minutos 18 e 35 (min. 35: $0,88 \pm 0,22$ °C vs. $1,66 \pm 0,17$ °C, $p < 0,05$). Quando os efeitos do NPS foram avaliados pela área sob a curva (AUC), a AUC das respostas da T_{pele} foi maior ($74,30 \pm 5,39$ °C·min vs. $34,54 \pm 9,08$ °C·min, $p < 0,05$) e a AUC da T_{abd} ($17,25 \pm 3,89$ °C·min vs. $32,33 \pm 2,72$ °C·min, $p < 0,05$) foi menor em comparação ao grupo salina após a injeção i.c.v. de NPS na dose de 8,4 mmol.

Com a injeção na dose de 4,2 mmol não houve diferença na T_{pele} entre os grupos NPS e salina (fadiga, 4,2 mmol: $3,25 \pm 0,99$ °C vs. Salina: $2,46 \pm 0,83$ °C, $p > 0,05$), porém o grupo NPS apresentou menor aumento na T_{abd} entre os minutos 27 e 35 (min. 35: $0,96 \pm 0,11$ °C vs. $1,66 \pm 0,17$ °C, $p < 0,05$).

A injeção i.c.v. de NPS na dose de 2,1 mmol não alterou as respostas da T_{pele} (fadiga, 2,1 mmol: $2,93 \pm 0,65$ °C vs. Salina: $2,46 \pm 0,83$ °C, $p > 0,05$) e T_{abd} (fadiga, 2,1 mmol: $2,28 \pm 0,24$ °C vs. Salina: $2,22 \pm 0,11$ °C, $p > 0,05$) em comparação ao grupo salina, porém provocou menor aumento na T_{pele} (min. 29: $1,70 \pm 0,33$ °C vs. $3,14 \pm 0,26$ °C, $p < 0,05$) e consequentemente maior aumento na T_{abd} (min. 29: $1,42 \pm 0,10$ °C vs. $0,74 \pm 0,21$ °C, $p < 0,05$) em comparação ao grupo NPS 8,4 mmol.

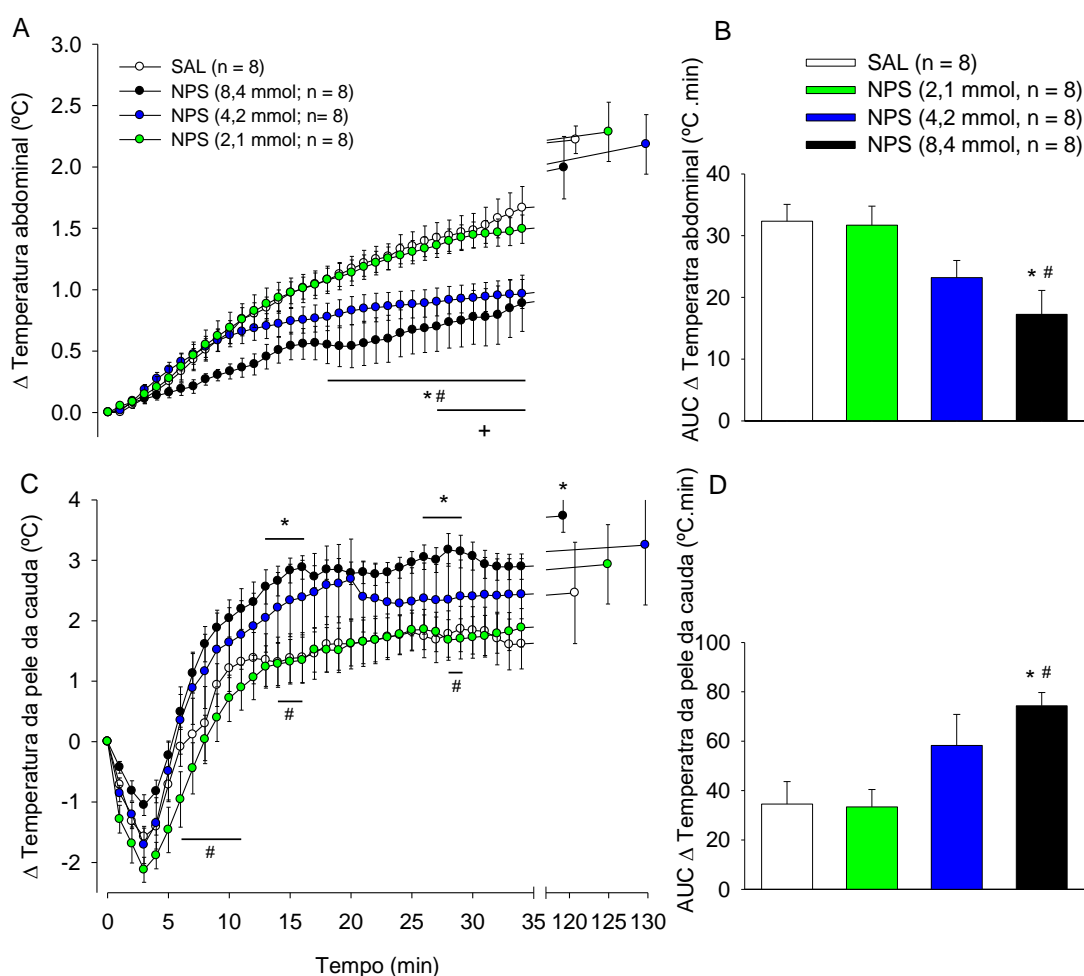


Figura 5.8. Efeitos da injeção i.c.v. de NPS na variação da temperatura abdominal (A) e da pele da cauda (C) de animais NWRs submetidos ao exercício constante. AUC da variação da temperatura abdominal (B) e da temperatura da pele da cauda (D). Dados expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$ 8,4 mmol vs. SAL, + $p < 0,05$ 4,2 mmol vs. SAL, # $p < 0,05$ 8,4 mmol vs. 2,1 mmol.

5.2.1 Desempenho físico

A injeção i.c.v. de NPS, mesmo em diferentes doses, não alterou o desempenho físico de ratos NWR (Salina: $120,70 \pm 22,80$ min. vs. 8,4 mmol: $119,20 \pm 17,00$ min. vs. 4,2 mmol: $129,70 \pm 21,60$ min. vs. 2,1 mmol: $124,90 \pm 22,80$ min., $p > 0,05$; Figura 5.9).

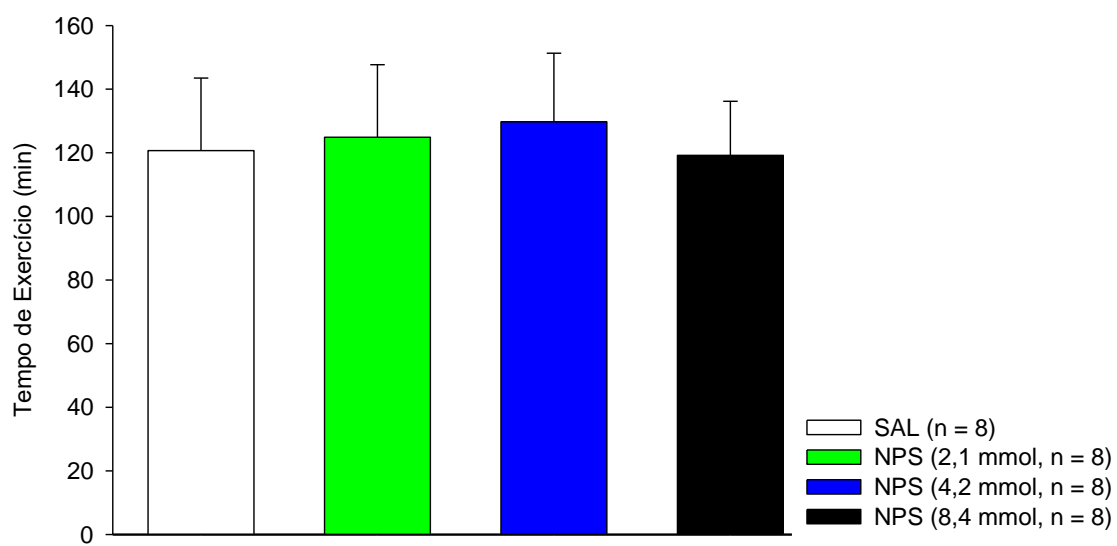


Figura 5.9. Efeitos da injeção i.c.v. de NPS no tempo de exercício de animais NWRs submetidos ao exercício constante. Dados expressos como média \pm EPM.

5.3 Resultados protocolo experimental 3

5.3.1 Características dos animais

A PAS dos SHRs foi maior quando comparados aos NWRs (183 ± 5 mmHg vs. 119 ± 5 mmHg; Figura 5.10).

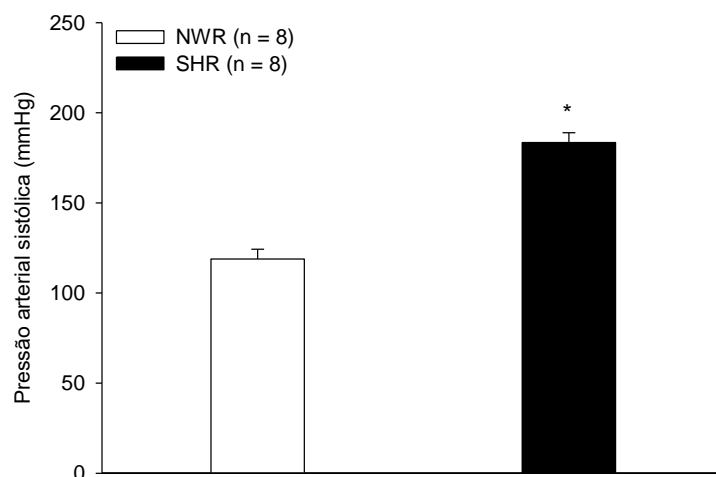


Figura 5.10. Pressão arterial sistólica de ratos dos grupos NWR e SHR. Dados expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs. NWR.

A massa corporal dos SHRs foi menor quando comparados aos NWRs ($289,7 \pm 8,3$ g vs. $343,1 \pm 8,3$ g, $p < 0,05$; Figura 5.11).

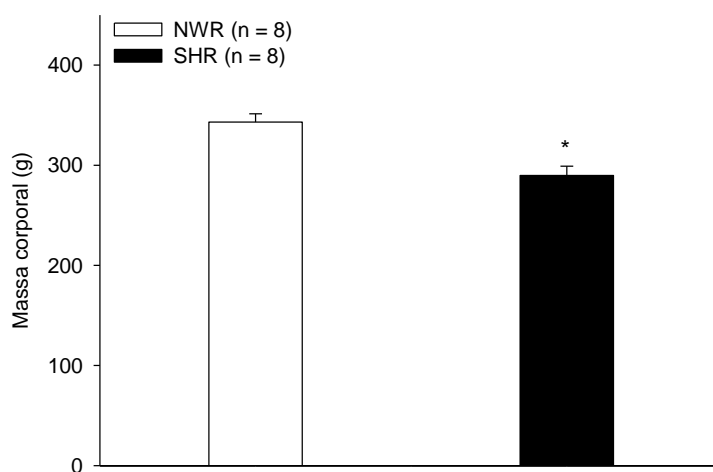


Figura 5.11. Massa corporal de ratos dos grupos NWR e SHR. Dados expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs. NWR.

5.3.2 Balanço térmico durante o exercício

No grupo NWR (Figura 5.12A e 5.12C), a injeção i.c.v. de NPS provocou menor aumento na T_{abd} quando comparada ao grupo salina entre o minuto 18 e a fadiga (fadiga: $1,28 \pm 0,16$ °C vs. $1,71 \pm 0,26$ °C, $p < 0,05$), e maior aumento na T_{pele} entre os minutos 7 e 8, 14 e a fadiga (fadiga: $3,12 \pm 0,33$ °C vs. $1,60 \pm 0,47$ °C, $p < 0,05$). No grupo SHR (Figura 4.12B e 4.12D), a injeção i.c.v. de NPS provocou menor aumento na T_{abd} quando comparada ao grupo salina entre o minuto 23 e a fadiga (fadiga: $1,09 \pm 0,13$ °C vs. $1,70 \pm 0,18$ °C, $p < 0,05$), e maior aumento na T_{pele} entre os minutos 8 e 19 (min 19: $2,53 \pm 0,52$ °C vs. $1,06 \pm 0,72$ °C, $p < 0,05$).

Quando o efeito da hipertensão foi avaliado, percebe-se que essa foi capaz de influenciar as respostas termorregulatórias durante o exercício. No grupo Salina, animais SHRs apresentaram maior aumento da T_{abd} quando comparada ao grupo NWR entre os minutos 16 e 23 (min 23: $1,62 \pm 0,15$ °C vs. $1,21 \pm 0,12$ °C, $p < 0,05$; Figura 5.12A e 5.12B), e menor aumento na T_{pele} entre os minutos 1 e 16 (min 16: $0,09 \pm 0,95$ °C vs. $1,39 \pm 0,41$ °C, $p < 0,05$; Figura 5.12C e 5.12D). No grupo NPS, animais SHRs apresentaram maior aumento da T_{abd} quando comparada ao grupo NWR entre os minutos 8 e 27 (min 27: $1,20 \pm 0,13$ °C vs. $0,69 \pm 0,20$ °C, $p < 0,05$; Figura 5.12A e 5.12B), e menor aumento na T_{pele} entre os minutos 4 e 15 (min 15: $1,58 \pm 0,83$ °C vs. $2,83 \pm 0,20$ °C, $p < 0,05$; Figura 5.12C e 5.12D).

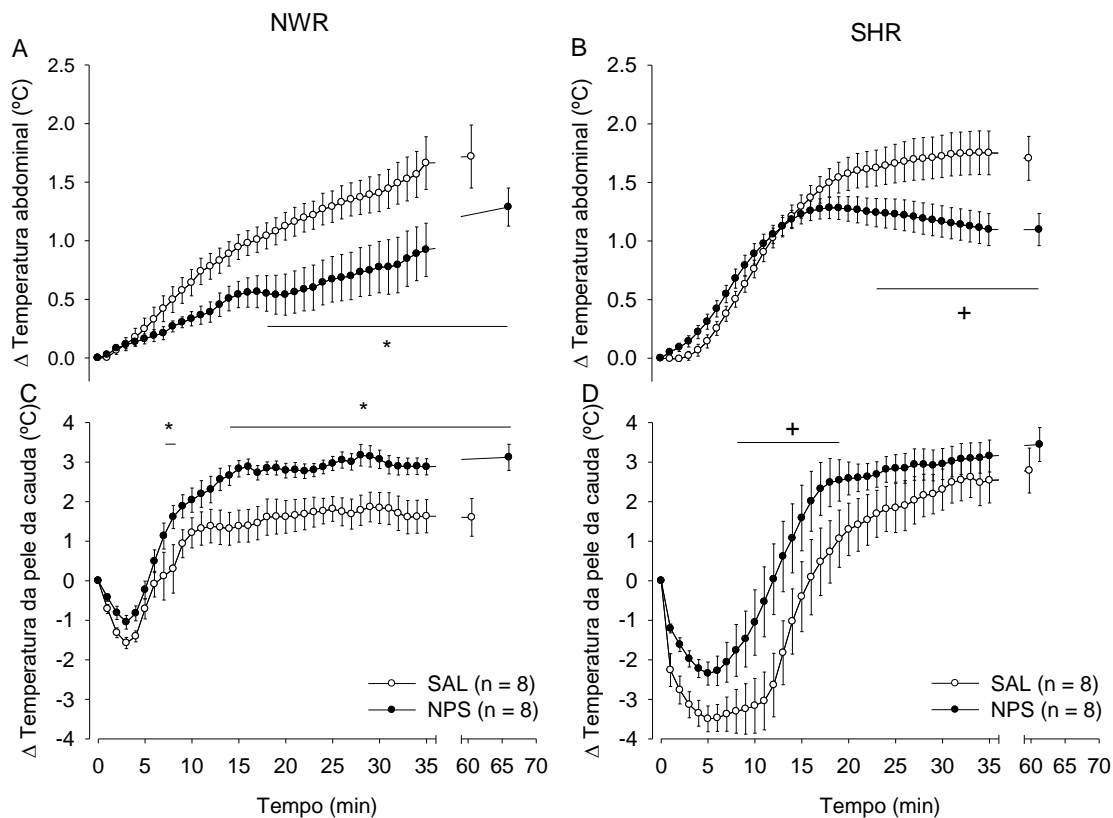


Figura 5.12. Efeitos da injeção i.c.v. de NPS na variação das temperaturas abdominal (painéis A e B) e da pele da cauda (painéis C e D) de animais NWRs (painéis A e C) e SHRs (painéis B e D) submetidos ao exercício constante. Dados expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$ NWR NPS vs. NWR SAL, + $p < 0,05$ SHR NPS vs. SHR SAL.

Os dados referentes à relação da T_{pele} e da T_{abd} (Figuras 5.13A e 5.13B) indicam que a injeção i.c.v. de NPS facilita a dissipação de calor durante o exercício tanto em animais NWRs quanto em SHRs. Em ambos os grupos, a curva dessa relação está deslocada para a esquerda, indicando que nesses animais houve um menor aumento da T_{abd} induzido pelo exercício antes que o aumento da T_{pele} fosse desencadeado.

O H_{trh} (Figura 5.13C) foi maior em animais SHR quando comparados aos NWRs tanto no grupo salina ($p < 0,05$) quanto no grupo NPS ($p < 0,05$). Já a injeção i.c.v. de NPS reduziu o H_{trh} em animais NWR ($37,28 \pm 0,13$ °C vs. $37,79 \pm 0,13$ °C, $p < 0,05$) e SHRs ($38,21 \pm 0,12$ °C vs. $38,57 \pm 0,12$ °C, $p < 0,05$). Quando o efeito da hipertensão arterial foi avaliado, percebe-se que essa foi capaz de aumentar o H_{trh} tanto no grupo SAL ($38,57 \pm 0,12$ °C vs. $37,79 \pm 0,13$ °C, $p < 0,05$) quanto no grupo NPS ($38,21 \pm 0,12$ °C vs. $37,28 \pm 0,13$ °C, $p < 0,05$). A hipertensão arterial e a injeção central de NPS (Figura

5.13D) não modificaram a H_{sen} (NWR SAL: $37,79 \pm 0,13$ vs. NWR NPS: $37,28 \pm 0,13$ vs. SHR SAL: $38,57 \pm 0,12$ vs. SHR NPS: $38,21 \pm 0,12$, $p > 0,05$).

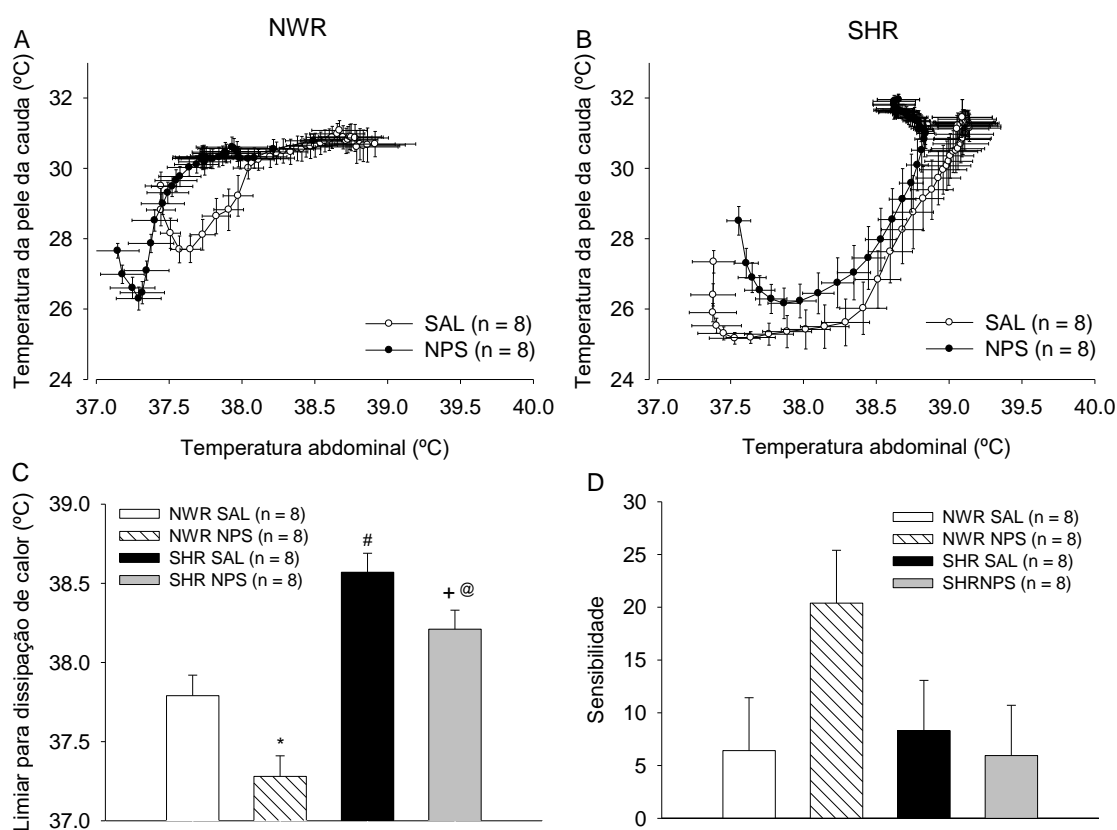


Figura 5.13. Relação entre temperatura da pele da cauda e temperatura abdominal em animais NWRs (A) e SHRs (B) após a injeção i.c.v. de NPS ou SAL. Efeitos da injeção i.c.v. de NPS no limiar (C) e sensibilidade (D) para dissipação de calor durante o exercício constante. Dados expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$ NWR NPS vs. NWR SAL, + $p < 0,05$ SHR NPS vs. SHR SAL, # $p < 0,05$ SHR SAL vs. NWR SAL, @ $p < 0,05$ SHR NPS vs. NWR NPS.

5.3.3 Desempenho físico

Os efeitos da hipertensão arterial e da injeção i.c.v. de NPS no desempenho físico também foram avaliados (Figura 5.14). A injeção i.c.v. de NPS não alterou o TE em animais NWRs (NWR NPS: $66,0 \pm 6,8$ vs. NWR SAL: $60,5 \pm 6,7$, $p > 0,05$) ou SHRs (SHR NPS: $61,2 \pm 5,8$ vs. SHR SAL: $59,7 \pm 5,8$, $p > 0,05$). A hipertensão arterial também

não afetou o TE nos grupos SAL (SHR SAL: $59,7 \pm 5,8$ vs. NWR SAL: $60,5 \pm 6,7$, $p > 0,05$) e NPS (SHR NPS: $61,2 \pm 5,8$ vs. NWR NPS: $66,0 \pm 6,8$, $p > 0,05$).

O desempenho físico também foi avaliado pelo trabalho realizado pelos animais, a injeção i.c.v. de NPS também não alterou o trabalho em animais NWR (NWR NPS: $299,0 \pm 27,1$ J vs. NWR SAL: $277,0 \pm 27,1$ J, $p > 0,05$) ou SHR (SHR NPS: $206,0 \pm 23,2$ J vs. SHR SAL: $200,1 \pm 23,2$ J, $p > 0,05$). Porém, o trabalho realizado pelos SHRs foi menor em comparação com os animais NWRs, tanto no grupo Salina (SHR SAL: $200,1 \pm 23,2$ vs. NWR SAL: $277,0 \pm 27,1$, $p < 0,05$), quanto no grupo NPS (SHR NPS: $206,0 \pm 23,2$ vs. NWR NPS: $299,0 \pm 27,1$, $p < 0,05$).

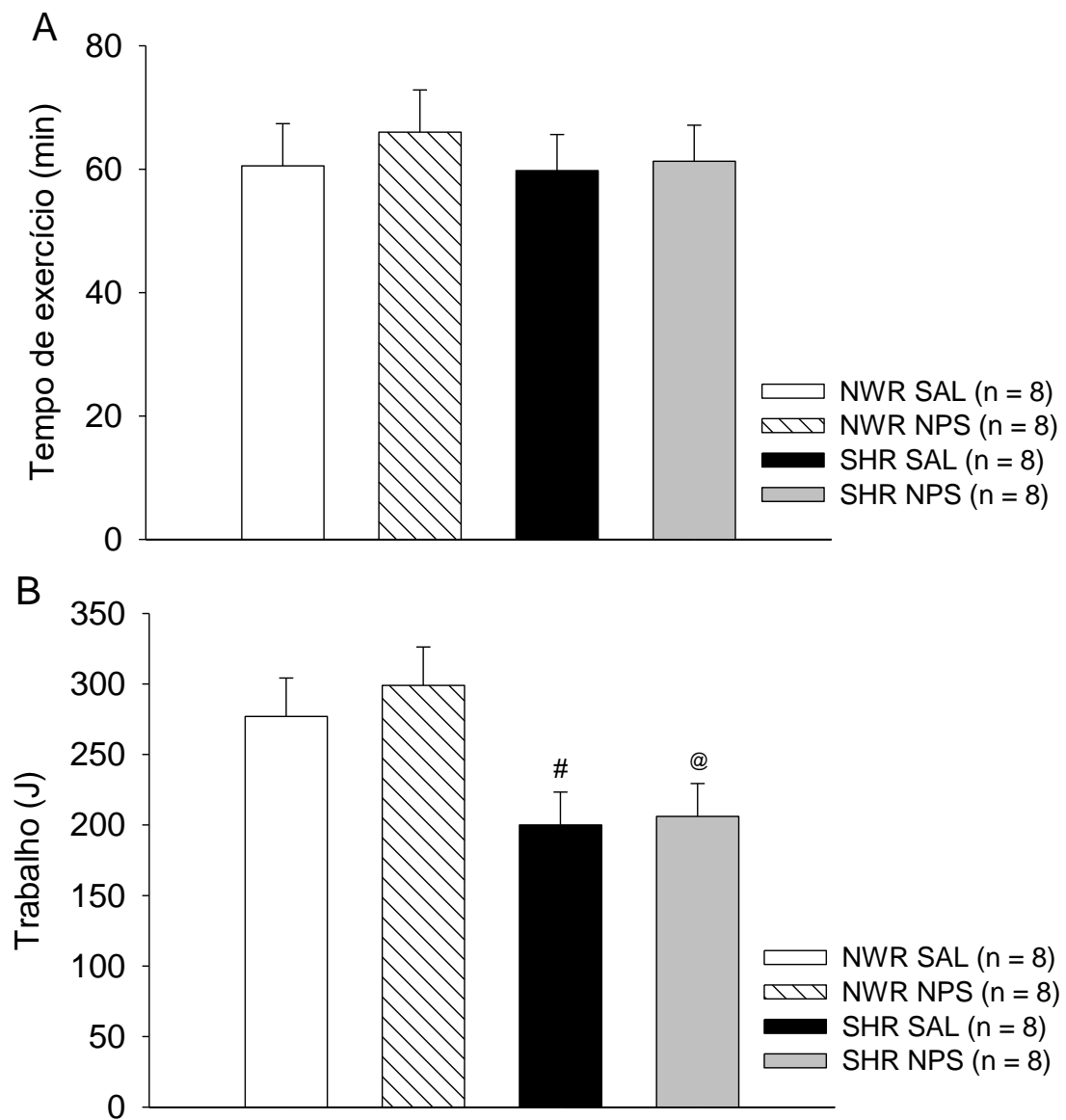


Figura 5.14. Efeitos da injeção i.c.v. de NPS no tempo de exercício (A), e trabalho (B) de animais NWRs e SHRs. Dados expressos como média \pm EPM. # $p < 0,05$ SHR SAL vs. NWR SAL, @ $p < 0,05$ SHR NPS vs. NWR NPS.

5.4 Resultados protocolo experimental 4

5.4.1 Características dos animais

A massa corporal dos diferentes grupos no período pós-treinamento está apresentada na Figura 5.15. Não foram observados efeitos do treinamento físico na massa corporal em animais normotensos (NWR T: $394,8 \pm 9,5$ g vs. NWR NT: $397,3 \pm 8,9$ g, $p > 0,05$) e hipertensos (SHR T: $304,7 \pm 9,5$ g vs. SHR NT: $289,3 \pm 8,9$ g, $p > 0,05$). Os animais dos grupos SHR NT e SHR T apresentaram menor massa corporal ($p < 0,05$) quando comparados aos animais dos grupos NWR NT e NWR T, respectivamente.

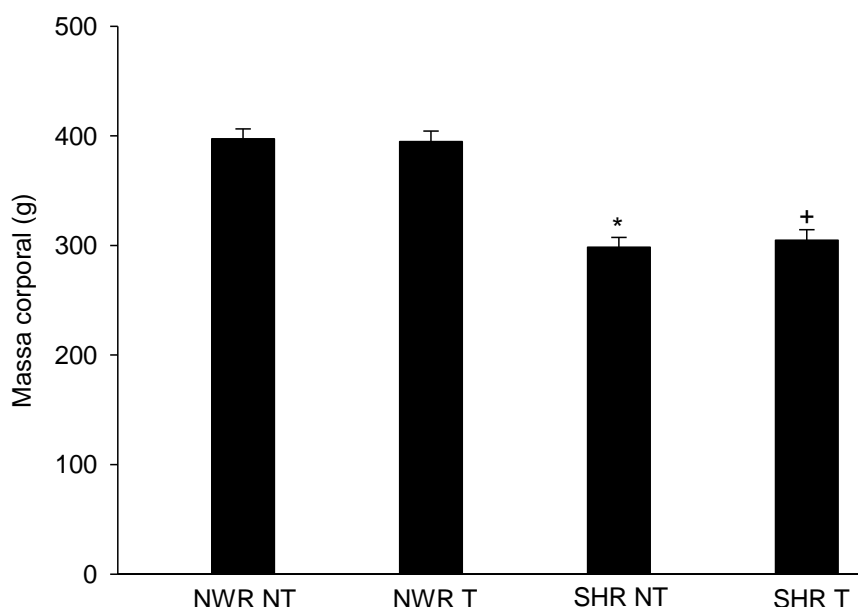


Figura 5.15. Massa corporal de ratos dos grupos NWR NT, NWR T, SHR NT e SHR T. Dados expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs. NWR NT; + $p < 0,05$ vs. NWR T.

A PAS no período pós-treinamento nos diferentes grupos está apresentada na Figura 5.16. O treinamento físico reduziu a PAS apenas no grupo SHR T ($160,1 \pm 5,4$ mmHg vs. $183,5 \pm 5,3$ mmHg, $p < 0,05$). Os animais hipertensos apresentaram maior PAS quando comparados aos animais normotensos, tanto nos grupos não treinados ($183,5 \pm 5,3$ mmHg vs. $118,8 \pm 5,4$ mmHg, $p < 0,05$) quanto nos treinados ($160,1 \pm 5,4$ mmHg vs. $121,2 \pm 6,4$ mmHg, $p < 0,05$).

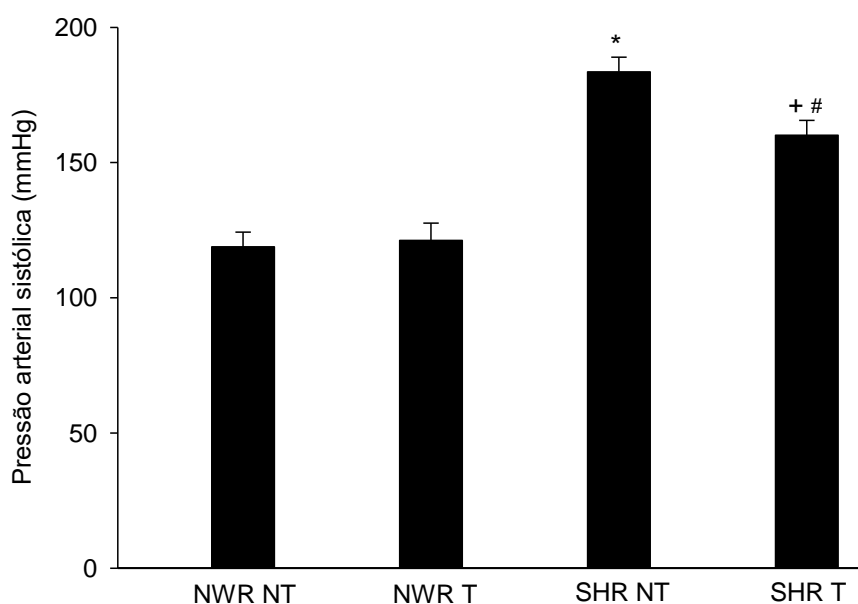


Figura 5.16. Pressão arterial sistólica de ratos dos grupos NWR NT, NWR T, SHR NT e SHR T. Dados expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs. NWR NT; + $p < 0,05$ vs. NWR T, # $p < 0,05$ vs. SHR NT.

5.4.2 Desempenho físico

Para avaliar os efeitos do treinamento físico sobre o desempenho físico dos animais foram utilizados a variação entre os valores pré e pós-treinamento do $VO_{2\text{pico}}$ (Figura 5.17A) e do tempo de exercício (Figura 5.17B). O treinamento físico aumentou o $VO_{2\text{pico}}$ tanto nos NWRs ($6,50 \pm 2,23 \text{ ml.kg}^{-0,75}.\text{min}^{-1}$ vs. $-2,03 \pm 1,88 \text{ ml.kg}^{-0,75}.\text{min}^{-1}$, $p < 0,05$) quanto nos SHRs ($5,71 \pm 1,76 \text{ ml.kg}^{-0,75}.\text{min}^{-1}$ vs. $0,26 \pm 1,57 \text{ ml.kg}^{-0,75}.\text{min}^{-1}$, $p < 0,05$). Da mesma forma, treinamento físico aumentou o tempo de exercício tanto nos NWRs ($14,8 \pm 4,1 \text{ min}$ vs. $-9,4 \pm 3,5 \text{ min}$, $p < 0,05$) quanto nos SHRs ($11,1 \pm 3,8 \text{ min}$ vs. $-9,5 \pm 2,9 \text{ min}$, $p < 0,05$).

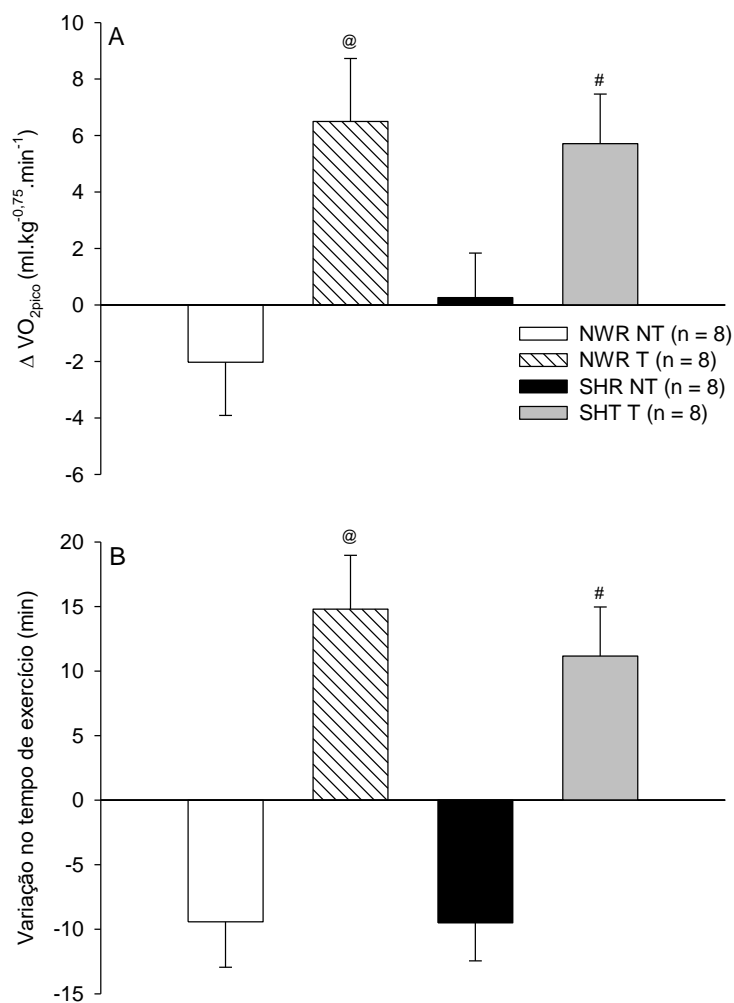


Figura 5.17. Desempenho físico de ratos dos grupos NWR NT, NWR T, SHR NT e SHR T. Variação entre os momentos pré e pós-treinamento físico do VO_{2pico} (A) e do tempo de exercício (B). Dados expressos como média \pm EPM. @ $p < 0,05$ vs. NWR NT; # $p < 0,05$ vs. SHR NT.

5.4.3 Balanço térmico durante o exercício

No grupo NWR (Figura 5.18A e 5.18C), o treinamento físico não alterou a resposta da T_{abd} durante o exercício (fadiga: NWR T: $1,62 \pm 0,26$ °C vs. NWR NT: $1,71 \pm 0,26$ °C, $p < 0,05$), mas provocou um maior aumento na T_{pele} entre o minuto 14 e a fadiga (fadiga: $3,65 \pm 0,38$ °C vs. $1,60 \pm 0,47$ °C, $p < 0,05$). No grupo SHR (Figura 5.18B e 5.18D), o treinamento físico também não alterou a resposta da T_{abd} durante o exercício

(fadiga: SHR T: $1,54 \pm 0,29$ °C vs. SHR NT: $1,70 \pm 0,18$ °C, $p < 0,05$), mas provocou um maior aumento na T_{pele} entre os minutos 1 e 12, e 26 e 31 (min 12: $-0,54 \pm 0,93$ °C vs. $-2,64 \pm 0,80$ °C, $p < 0,05$).

Quando o efeito da hipertensão foi avaliado, percebe-se que essa foi capaz de influenciar as respostas termorregulatórias durante o exercício. Nos grupos não treinados, animais SHRs apresentaram maior aumento da T_{abd} quando comparada ao grupo NWR entre os minutos 16 e 23 (min 23: $1,62 \pm 0,15$ °C vs. $1,21 \pm 0,12$ °C, $p < 0,05$; Figura 5.18A e 5.18B), e menor aumento na T_{pele} entre os minutos 1 e 16 (min 16: $0,09 \pm 0,95$ °C vs. $1,39 \pm 0,41$ °C, $p < 0,05$; Figura 5.18C e 5.18D). Nos grupos treinados, não houve diferença com relação à T_{abd} entre os grupos SHR e NWR (fadiga: SHR: $1,62 \pm 0,26$ °C vs. NWR: $1,71 \pm 0,26$ °C, $p < 0,05$; Figura 5.18A e 5.18B), mas os animais do grupo SHR apresentaram menor aumento na T_{pele} entre os minutos 10 e 18 (min 18: $1,51 \pm 0,57$ °C vs. $3,05 \pm 0,30$ °C, $p < 0,05$; Figura 5.18C e 5.18D).

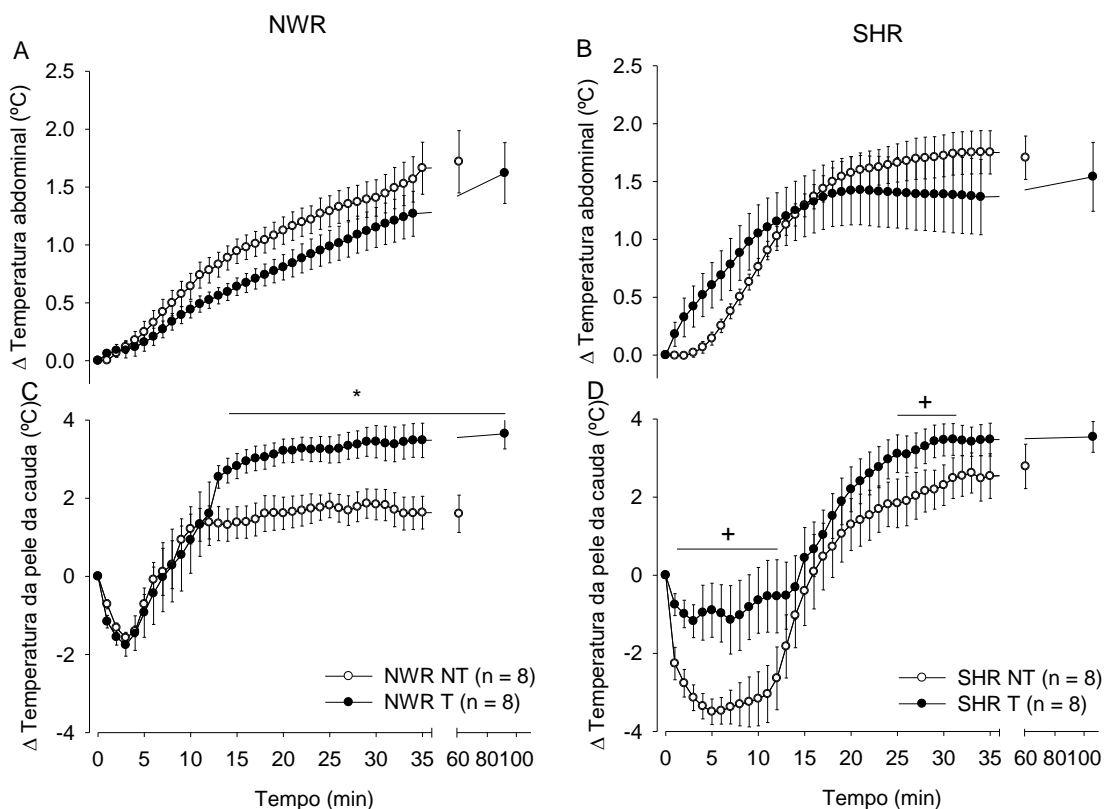


Figura 5.18. Efeitos do treinamento físico na variação das temperaturas abdominal (painéis A e B) e da pele da cauda (painéis C e D) de animais NWRs (painéis A e C) e SHRs (painéis B e D) submetidos ao exercício constante. Dados expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$ NWR T vs. NWR NT, + $p < 0,05$ SHR T vs. SHR NT.

Os dados referentes à relação da T_{pele} e da T_{abd} (Figuras 5.19A e 5.19B) indicam que o treinamento físico não modifica o H_{trh} e a H_{sen} durante o exercício tanto em animais NWRs quanto em SHRs. Nos grupos SHR, a curva dessa relação está deslocada para a direita, indicando que nesses animais houve um maior aumento da T_{abd} induzido pelo exercício antes que o aumento da T_{pele} fosse desencadeado, indicando uma dificuldade para acionar os mecanismos de dissipação de calor nesses animais.

O H_{trh} (Figura 5.19C) foi maior em animais SHRs quando comparados aos NWRs tanto no grupo não treinado ($38,57 \pm 0,12$ °C vs. $37,79 \pm 0,13$ °C, $p < 0,05$) quanto no grupo treinado ($38,97 \pm 0,15$ °C vs. $37,72 \pm 0,16$ °C, $p < 0,05$). Já o treinamento físico não modificou o H_{trh} em animais NWRs (NWR T: $37,72 \pm 0,16$ °C vs. NWR NT: $37,79 \pm 0,13$ °C, $p < 0,05$) e SHRs (SHR T: $38,97 \pm 0,15$ °C vs. SHR NT: $38,57 \pm 0,12$ °C, $p < 0,05$). A hipertensão arterial e o treinamento físico (Figura 5.19D) não modificaram a H_{sen} (NWR NT: $6,42 \pm 5,01$ vs. NWR T: $6,54 \pm 3,44$ vs. SHR NT: $8,31 \pm 4,76$ vs. SHR T: $5,20 \pm 3,19$, $p > 0,05$).

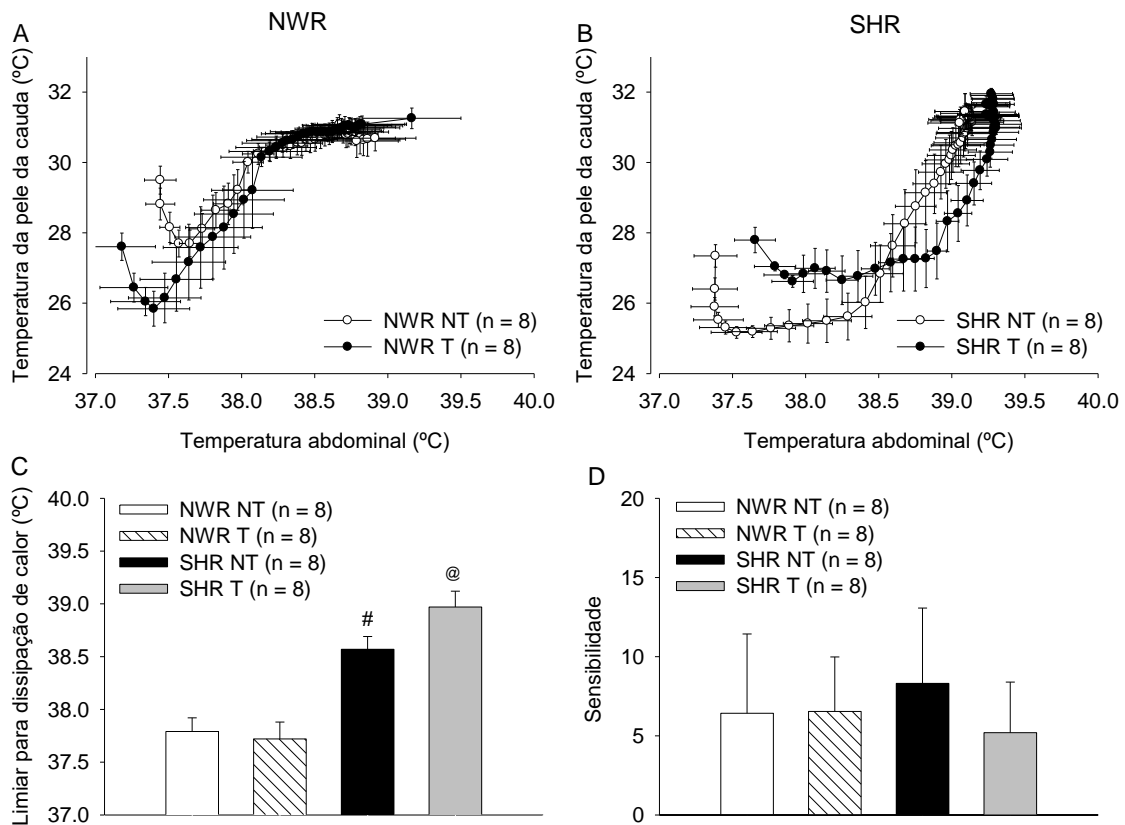


Figura 5.19. Relação entre temperatura da pele da cauda e temperatura abdominal em animais NWRs (A) e SHRs (B) treinados e não treinados. Efeitos do treinamento físico no limiar (C) e sensibilidade (D) para dissipação de calor durante o exercício constante. Dados expressos como média \pm EPM. # $p < 0,05$ SHR NT vs. NWR NT, @ $p < 0,05$ SHR T vs. NWR T.

A eficiência termorregulatória (Figura 5.20) foi menor no grupo SHR NT quando comparado ao grupo NWR NT ($1,94 \pm 0,22$ cal/J vs. $1,24 \pm 0,36$ cal/J, $p < 0,05$). O treinamento físico aumentou a eficiência termorregulatória no grupo SHR ($0,90 \pm 0,19$ cal/J vs. $1,94 \pm 0,22$ cal/J, $p < 0,05$) mas não no grupo NWR (NWR T: $1,00 \pm 0,24$ cal/J vs. NWR NT: $1,24 \pm 0,36$ cal/J, $p > 0,05$). Não houve diferença entre os grupos SHR T e NWR T (SHR T: $0,90 \pm 0,19$ cal/J vs. NWR T: $1,00 \pm 0,24$ cal/J, $p > 0,05$).

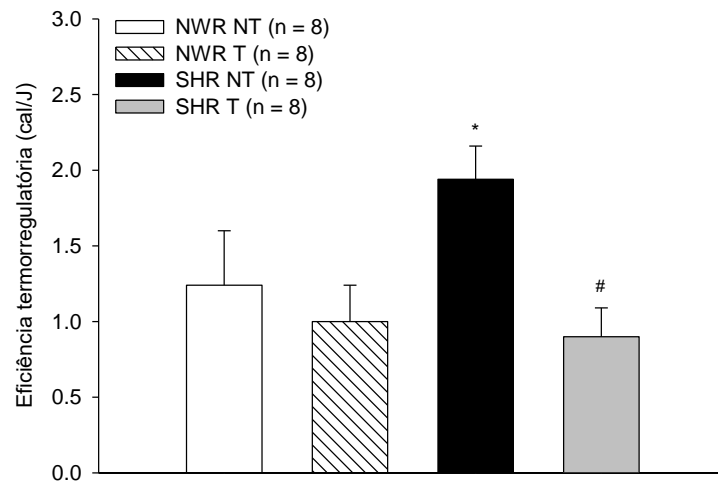


Figura 5.20. Eficiência termorregulatória durante o exercício constante em animais NWRs e SHRs treinados e não treinados. Dados expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs. NWR NT, # $p < 0,05$ vs. SHR NT.

5.4.4 Expressão proteica da nNOS

A expressão proteica da p-nNOS(ser852) na APO (Figura 5.21) foi menor no grupo SHR NT quando comparado ao grupo NWR NT ($0,06 \pm 0,01$ u.a. vs. $0,09 \pm 0,01$ u.a., $p < 0,05$). O treinamento físico aumentou a expressão proteica da p-nNOS(ser852) na APO no grupo SHR ($0,10 \pm 0,01$ u.a. vs. $0,06 \pm 0,01$ u.a., $p < 0,05$) mas não no grupo NWR (NWR T: $0,10 \pm 0,01$ u.a. vs. NWR NT: $0,09 \pm 0,01$ u.a., $p < 0,05$). Não houve diferença entre os grupos SHR T e NWR T (SHR T: $0,10 \pm 0,01$ u.a. vs. NWR T: $0,10 \pm 0,01$ u.a., $p > 0,05$).

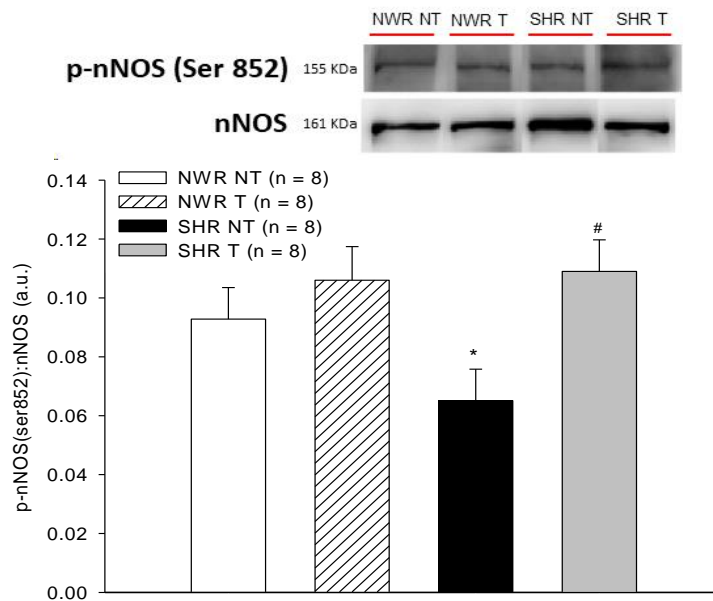


Figura 5.21. Expressão proteica da p-nNOS(ser852) na APO de animais NWRs e SHRs treinados e não treinados. Dados expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs. NWR NT, # $p < 0,05$ vs. SHR NT.

A expressão proteica da p-nNOS(ser852) no PVN (Figura 5.22) foi semelhante entre os grupos SHR NT e NWR NT (SHR NT: $1,10 \pm 0,19$ u.a. vs. NWR NT: $0,94 \pm 0,13$ u.a., $p > 0,05$). O treinamento físico aumentou a expressão proteica da p-nNOS(ser852) na APO no grupo SHR ($1,58 \pm 0,17$ u.a. vs. $1,10 \pm 0,19$ u.a., $p < 0,05$) e no grupo NWR ($1,56 \pm 0,25$ u.a. vs. $0,94 \pm 0,13$ u.a., $p < 0,05$). Não houve diferença entre os grupos SHR T e NWR T (SHR T: $1,58 \pm 0,17$ u.a. vs. NWR T: $1,56 \pm 0,25$ u.a., $p > 0,05$).

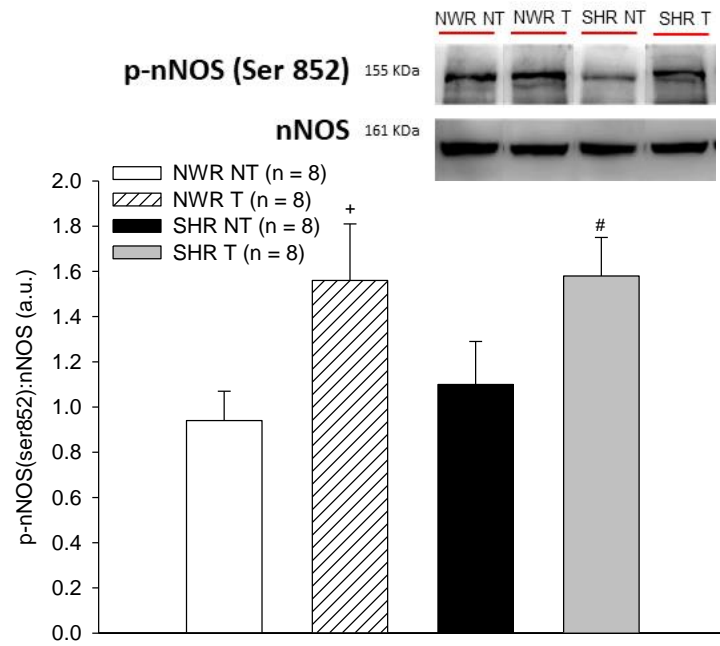


Figura 5.22. Expressão proteica da p-nNOS(ser852) no PVN de animais NWRs e SHRs treinados e não treinados. Dados expressos como média \pm EPM. + $p < 0,05$ vs. NWR NT, # $p < 0,05$ vs. SHR NT.

6. DISCUSSÃO

Esse trabalho teve como objetivo verificar se o déficit termorregulatório apresentado por animais hipertensos durante o exercício envolve a ativação de vias neurais moduladas pelo óxido nítrico e se o treinamento físico seria capaz de corrigir esse desequilíbrio termorregulatório em animais hipertensos via modulação oxinitrérica. Para isso, foi verificado se as alterações termorregulatórias em animais hipertensos realmente têm origem central e se a injeção central de um doador de óxido nítrico poderia corrigir esse desequilíbrio termorregulatório. Além disso, procurou-se avaliar os efeitos do treinamento físico no controle termorregulatório e a expressão proteica da p-nNOS em animais hipertensos. Os resultados do presente estudo demonstram que animais hipertensos possuem menor ativação de núcleos cerebrais envolvidos com a termorregulação durante o exercício. Demonstrou que o aumento da disponibilidade de óxido nítrico aumenta a dissipação de calor e conseqüentemente provoca menor aumento da temperatura interna em animais hipertensos durante o exercício, corrigindo dessa forma, o desequilíbrio termorregulatório apresentados por esses animais. O treinamento físico normalizou a expressão proteica de p-nNOS na APO que é alterada em animais hipertensos, aumentou a expressão proteica de p-nNOS no PVN de animais normotensos e hipertensos, além de corrigir o desequilíbrio termorregulatório em animais hipertensos, aumentando a dissipação de calor e diminuindo a hipertermia durante o exercício.

Origem central do desequilíbrio termorregulatório em animais hipertensos durante o exercício

Os resultados do delineamento 1 demonstram que os animais hipertensos apresentaram maior aumento das T_{abd} durante o exercício quando comparados a animais normotensos. Outros trabalhos também já investigaram a termorregulação em animais hipertensos durante o exercício em animais com a mesma idade dos animais do presente estudo (Campos *et al.*, 2014; Drummond *et al.*, 2016). Apenas o trabalho de Campos *et al.* (2014), não demonstrou a hipertermia exacerbada em animais hipertensos durante o exercício em ambiente temperado. As diferenças nas respostas entre os estudos citados se devem provavelmente aos diferentes níveis de hipertensão arterial apresentadas pelos

animais dos diferentes estudos (Campos et al. 2014, PAS = 170 ± 2 mmHg; Drummond et al. 2016, PAS = 196 ± 4; presente estudo, PAS = 195 ± 7), o que pode ter comprometido de forma diferente a dissipação de calor nesses animais.

No presente estudo, os maiores aumentos da T_{abd} induzidos pelo exercício em ambiente temperado nos animais hipertensos podem ser explicados por um atraso para dissipação cutânea de calor para o ambiente. As diferenças na T_{pele} entre SHRs e NWRs foram encontradas entre os minutos 12 e 23, enquanto as diferenças na T_{abd} foram observadas a partir do 12º minuto. A temporalidade dessas respostas indica que o atraso para o aumento da dissipação de calor contribui para o aumento da T_{abd} . Foi sugerido por Drummond et al. (2016) que as alterações termorregulatórias encontradas em animais hipertensos durante o exercício tenham origem no sistema nervoso central. Porém, até o momento, as alterações centrais envolvidas na termorregulação durante o exercício em animais hipertensos ainda não haviam sido demonstradas.

O presente estudo demonstra que animais hipertensos apresentam maior H_{thr} quando comparados a animais normotensos e que não há diferença na H_{sen} entre os dois grupos. Esses resultados são semelhantes aos já publicados por nosso grupo (Drummond *et al.*, 2016). O maior H_{thr} encontrados em animais SHR sem alterações concomitantes na H_{sen} sugere que os prejuízos na dissipação de calor em animais hipertensos sejam causados por mecanismos centrais. Alterações no H_{thr} geralmente são interpretadas como consequências de modulações centrais, enquanto alterações na H_{sen} são consequências de alterações periféricas (Gisolfi e Wenger, 1984).

De fato, os animais hipertensos apresentam alterações na ativação de núcleos cerebrais envolvidos na termorregulação durante o exercício. Nas situações sem exercício (grupo branco) não foram encontradas diferenças na ativação neuronal de núcleos envolvidos com a termorregulação entre animais SHRs e NWRs em nenhuma das áreas avaliadas (mPOA, PVN e SON). Já durante o exercício, animais hipertensos apresentaram menor ativação neuronal na mPOA e PVN quando comparados a animais normotensos. Além disso, houve uma forte correlação negativa entre a ativação neuronal e o H_{thr} nesses dois núcleos. Portanto, é possível que a alteração na atividade neuronal nesses núcleos seja um dos responsáveis pelos prejuízos termorregulatórios durante o exercício encontrados nos animais hipertensos. Assim como na situação de repouso, durante o exercício a ativação neuronal no SON não foi diferente entre animais SHRs e NWRs.

A APO ocupa um lugar de destaque dentre as estruturas envolvidas no controle da temperatura corporal. A APO possui neurônios termossensíveis que mudam sua atividade frente a alterações na temperatura local. Essa região também recebe informações térmicas provenientes de termorreceptores centrais e periféricos, processa essas informações e estimula as alterações necessárias para o controle da temperatura corporal (Boulant, 2000; Nakamura, 2011). A APO emite projeções neuronais para várias regiões do sistema nervoso central, modulando a atividade desses núcleos participantes do controle termorregulatório, dentre eles o PVN e núcleo ventromedial (Nagashima, 2006; Romanovsky, 2007). As eferências neurais provenientes desses núcleos modulam respostas efetoras específicas como a salivação, o tônus vasomotor, o tremor, a atividade metabólica do tecido adiposo marrom e as respostas termorregulatórias comportamentais, sendo cada uma por via neural distinta e independente (Kazuyuki *et al.*, 1998; Nagashima, 2006; Romanovsky, 2007).

O SON também é um núcleo que recebe projeções neurais da APO e já foi demonstrado sua participação no controle da temperatura corporal (Takahashi *et al.*, 2001a; b). Sua participação dá através de uma modulação via sistema nervoso autônomo. Além disso o SON, possui uma importante função na manutenção do balanço hidroeletrólítico durante o estresse térmico (Yoshida *et al.*, 2002; Nunez *et al.*, 2012). No presente estudo, a realização do exercício aumentou a atividade neuronal nesse núcleo, mas as diferenças na termorregulação entre animais SHRs e NWRs parecem não estar relacionadas à atividade do SON, já que não foram observadas diferenças na ativação neuronal entre as duas linhagens.

O papel do PVN para o controle da atividade nervosa simpática que regula a função cardiovascular já é bem conhecida e discutida na literatura (Patel, 2000; Li, Jackson, *et al.*, 2006). Mas esse núcleo também possui um papel importante do controle termorregulatório. Já foi demonstrado que o PVN possui neurônios termossensíveis que são ativados mediante estresse térmico (Bratinscak e Palkovits, 2004; Cham *et al.*, 2006). O PVN, por meio de projeções para outras áreas como a rafe pálida, a medula ventrolateral rostral e a coluna intermediolateral, participa da regulação da atividade simpática dos órgãos efetores envolvidos na termorregulação, como, por exemplo, o tecido adiposo marrom, a glândula salivar e o leito vascular cutâneo da cauda de roedores (Kazuyuki *et al.*, 1998; Smith *et al.*, 1998; Cham e Badoer, 2008; Madden e Morrison, 2009; Leite *et al.*, 2012). No presente estudo, animais hipertensos apresentaram uma

menor ativação neuronal no PVN e maior H_{thr} , com forte correlação entre essas duas variáveis. Esses dados contribuem para explicar a dificuldade na dissipação de calor e consequente maior aumento da T_{abd} durante o exercício nos animais hipertensos durante o exercício.

Além das alterações centrais demonstradas no presente trabalho, é possível que alterações periféricas também estejam relacionadas ao atraso na vasodilatação da cauda encontrada em ratos hipertensos durante o exercício. A resistência vascular periférica nos animais hipertensos pode ser até 50% maior do que em ratos normotensos, dependendo do leito vascular estudado (Lais *et al.*, 1974). A maior resistência periférica em animais hipertensos pode ser explicada por diversos fatores, dentre eles, hiperresponsividade da musculatura lisa dos vasos a agentes vasoconstritores (Lais *et al.*, 1974), prejuízos na vasodilatação mediada pelo fluxo sanguíneo (Koller e Huang, 1994) e menor biodisponibilidade de óxido nítrico periférico (Kerr *et al.*, 1999; Touyz e Schiffrin, 2004). Além disso, já foi demonstrado que SHRs apresentam espessamento da musculatura lisa da artéria caudal e concomitante diminuição da luz do vaso (Sandow *et al.*, 2003).

Além da dissipação de calor prejudicada, uma produção de calor exacerbada também poderia ser um dos fatores que causam o maior aumento da T_{abd} durante o exercício em animais hipertensos. Porém até o momento, não foram encontradas diferenças na taxa metabólica e, portanto, na produção de calor entre animais hipertensos e normotensos durante o exercício em ambiente temperado (Campos *et al.*, 2014; Campos, 2017).

Escolha da dose de nitroprussiato de sódio utilizada

No presente trabalho foram testadas 3 diferentes doses de NPS (2,1 mmol, 4,2 mmol e 8,4 mmol) nas respostas termorregulatórias e de desempenho físico durante o exercício em animais normotensos. A dose de 2,1 mmol não causou efeito termorregulatório nos animais avaliados. As doses de 4,2 mmol e 8,4 mmol causaram maior dissipação de calor e menor aumento na T_{abd} durante o exercício, com os maiores efeitos sendo observados com a utilização da maior dose. Nenhuma das doses avaliada

alterou o desempenho físico dos animais avaliados. Portanto, a dose escolhida para os experimentos subsequentes foi a de 8,4 mmol.

O mecanismo de liberação de NO pelo NPS ($\text{Na}_2[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{CN})_5(\text{NO})]$) nos tecidos biológicos é mais complexo do que geralmente é assumido e ainda não foi completamente elucidado (Miller e Megson, 2007). Para alguns autores, o simples contato com o tecido biológico provoca a liberação de NO a partir do NPS (Grossi *et al.*, 2001; Grossi e Monteverchi, 2002). De toda forma, várias rotas podem estar envolvidas na liberação de NO e até o momento já foi demonstrado um papel fundamental da glutatona e da cisteína, presentes na maioria dos tipos celulares, na liberação do NO (Grossi e D'angelo, 2005).

No presente estudo, os níveis de NO no sistema nervoso central após injeção de NPS não foram avaliados. Mas as respostas termorregulatórias apresentadas após a injeção de NPS vão de encontro às esperadas com o aumento das concentrações de NO central (Wanner, Leite, *et al.*, 2015). Portanto, as respostas termorregulatórias apresentadas após a injeção de NPS podem, ao menos em parte, serem atribuídas ao aumento da disponibilidade de NO central.

Efeitos da injeção central de NPS nas respostas termorregulatórias de animais normotensos e hipertensos durante o exercício

Os resultados encontrados no delineamento 3 indicam que o aumento da disponibilidade de NO central aumenta a dissipação de calor durante o exercício tanto em animais normotensos quanto em animais hipertensos, provocando menor aumento da T_{abd} em ambos os grupos. O aumento da dissipação de calor provocado pela injeção central de NPS se deve, ao menos em parte, à redução do H_{thr} . Quando se observa a curva da relação entre as T_{abd} e T_{pele} , pode-se perceber que a injeção central de NPS deslocou essa curva para direita, portanto foi necessário um menor aumento da temperatura interna para que os mecanismos de dissipação de calor fossem acionados.

A vasodilatação da cauda é a principal via utilizada por ratos para dissipar o calor acumulado durante o exercício (Wilson *et al.*, 1978; Gisolfi e Wenger, 1984; Wanner, Primola-Gomes, *et al.*, 2015). Porém outros mecanismos como a vasodilatação da pele das patas (Gordon e Watkinson, 1988; Gordon, 1990), a evaporação da saliva dispersa

sobre a superfície corporal (Hainsworth, 1967; Hainsworth e Stricker, 1969), a evaporação de água a partir do trato respiratório (Tanaka *et al.*, 1988) e até mesmo a micção voluntária e posterior dispersão dessa urina pela superfície corporal (Hubbard *et al.*, 1982) contribuem para a dissipação de calor em roedores (Wanner, Primola-Gomes, *et al.*, 2015). O fluxo sanguíneo para a pele da cauda é modulado por uma atividade vasoconstritora noradrenérgica (O'leary *et al.*, 1985; Owens *et al.*, 2002). A realização de uma simpatectomia na região do tronco eleva o fluxo sanguíneo da cauda para níveis similares aos observados em ratos sob situação de hipertermia (O'leary *et al.*, 1985). Portanto, é razoável propor que a vasodilatação da pele da cauda induzida pelo exercício resulta de uma retirada da atividade simpática para a cauda (Wanner, Primola-Gomes, *et al.*, 2015).

Vários estudos já demonstraram o papel do óxido nítrico central na redução da atividade simpática (Monda *et al.*, 1995; Nishimura *et al.*, 1997; Nurminen *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 1997; Li, Wang, *et al.*, 2006). A injeção i.c.v. de L-arginina diminui a atividade simpática no nervo abdominal (Nishimura *et al.*, 1997). A administração i.c.v. de L-NAME em ratos anestesiados induz um aumento da frequência cardíaca, da pressão arterial, que pode ser prevenido por um pré-tratamento com agente betabloqueador adrenérgico (Nurminen *et al.*, 1997). A injeção i.c.v. do inibidor das NOS (N^G-monomethyl-L-arginine) no PVN aumenta a frequência cardíaca, a pressão arterial, e a atividade nervosa simpática renal. Esses efeitos são atenuados pela administração subsequente de L-arginina (Zhang *et al.*, 1997).

A hiperatividade simpática é uma característica de animais SHRs (Judy *et al.*, 1976; Takeda *et al.*, 1987). Portanto, a dificuldade na vasodilatação da cauda demonstrada pelos animais hipertensos durante o exercício pode ser uma consequência dessa hiperatividade. Já o aumento da concentração central de NO poderia reduzir a atividade simpática, aumentar a vasodilatação da cauda e conseqüentemente aumentar a dissipação de calor durante o exercício em animais SHRs.

Os resultados encontrados no presente trabalho são semelhantes aos de Wanner *et al.* (2015), que também avaliaram os efeitos da injeção central de um doador de NO (L-arginina) na termorregulação de ratos normotensos durante o exercício. A diferença entre os estudos está no doador de NO utilizado. O NPS utilizado no presente estudo, é um doador de NO que não depende das NOS para a produção de NO (Miller e Megson, 2007),

diferente da L-arginina que depende das NOS para a produção de NO (Miller e Megson, 2007).

Os efeitos da inibição das NOS na termorregulação durante o exercício também já foram avaliados (Lacerda *et al.*, 2005; Lacerda *et al.*, 2006; Lima *et al.*, 2014). A injeção central de L-NAME, um inibidor não específico das NOS diminuiu a dissipação de calor (Lacerda *et al.*, 2005), aumentou a produção de calor (Lacerda *et al.*, 2006) com consequente maior acúmulo de calor durante o exercício (Lacerda *et al.*, 2005). Também já foi demonstrado, que a injeção central de L-NAME diminui a ativação neuronal no PVN, um importante núcleo hipotalâmico para o controle termorregulatório durante o exercício (Lima *et al.*, 2014).

Efeitos do treinamento físico nas respostas termorregulatórias de animais normotensos e hipertensos durante o exercício

Os resultados do delineamento 4 demonstram que entre os animais não treinados, os animais hipertensos apresentam menor dissipação de calor e consequente maior aumento da T_{abd} durante o exercício quando comparados a animais normotensos. Já entre os grupos treinados, animais hipertensos e normotensos apresentaram aumento semelhante da T_{abd} durante o exercício. A T_{pele} foi menor em animais hipertensos treinados quando comparados aos normotensos treinados entre os minutos 10 e 18 da sessão de exercício. Esses resultados sugerem que a redução da dissipação de calor nos animais hipertensos não foi suficiente para afetar o controle da T_{abd} durante o exercício nos animais treinados.

O treinamento físico foi capaz de tornar o controle termorregulatório mais eficiente durante o exercício tanto em animais normotensos quanto em hipertensos. Em animais normotensos e hipertensos não houve diferença na T_{abd} entre animais treinados e não treinados. Esses resultados indicam um aumento da eficiência termorregulatória nesses animais, já que os animais dos grupos treinados e não treinados realizaram o exercício a uma mesma intensidade relativa (60% $V_{máx}$) mas em diferentes intensidades absolutas (NWR NT: $13,9 \pm 0,3$ m/min; NWR T: $16,9 \pm 0,3$ m/min; SHR NT: $13,7 \pm 0,3$ m/min; SHR T: $16,3 \pm 0,6$ m/min;). Nessas condições o calor metabólico gerado nos

animais treinados seria maior devido a maior intensidade do exercício. Para manter a temperatura interna semelhante seria necessária uma maior dissipação de calor.

De fato, o treinamento físico aumentou a dissipação de calor durante o exercício em animais normotensos e hipertensos. Animais normotensos e hipertensos treinados apresentaram maior T_{pele} e capacidade de dissipação de calor durante o exercício quando comparados a animais não treinados. O treinamento físico parece aumentar a capacidade de vasodilatação da cauda e conseqüentemente aumentar a dissipação de calor. Esse aumento da capacidade de dissipação de calor pode ser explicado por alterações vasculares. O treinamento físico é capaz de melhorar a função vascular através da redução da atividade simpática (Bertagnolli *et al.*, 2008) e da resistência vascular periférica (Melo *et al.*, 2003; Amaral e Michelini, 2011) e melhora da função endotelial (Laughlin *et al.*, 2001; Roque *et al.*, 2013) em hipertensos.

A participação do NO na termorregulação durante o exercício foi demonstrada no presente trabalho e em diversos outros estudos (Lacerda *et al.*, 2005; Lacerda *et al.*, 2006; Lima *et al.*, 2014; Wanner, Leite, *et al.*, 2015). O presente estudo também demonstrou os efeitos do treinamento físico na modulação da atividade da nNOS. O treinamento normalizou a atividade da nNOS na APO, que se encontrava diminuída nos animais hipertensos. O treinamento físico também aumentou a atividade da nNOS no PVN de ratos normotensos e hipertensos. Santiago *et al.* (2016) já demonstraram que ratos normotensos treinados apresentam uma maior ativação neuronal nos mesmos núcleos investigados (APO e PVN) quando submetidos a uma sessão de exercício.

Portanto, o aumento da eficiência termorregulatória provocado pelo treinamento físico pode, ao menos em parte, ser explicados pelo aumento da atividade da nNOS na APO e PVN. O aumento da atividade da nNOS pode resultar em uma maior disponibilidade de NO no PVN, redução da atividade simpática, aumento do fluxo sanguíneo para a pele da cauda, aumento da dissipação de calor e finalmente em menor hipertermia durante o exercício.

Efeitos do treinamento físico na pressão arterial de repouso

Segundo Kobuko et al. (2005), SHRs apresentam elevação na PA a partir das primeiras semanas de vida e, por volta da 6ª semana, já são considerados hipertensos. Aproximadamente na 16ª semana de vida a elevação PA atinge um platô de elevação nesses animais. No presente estudo, todos os animais SHRs avaliados já eram considerados hipertensos, pois possuíam a PAS maior do que 150 mmHg (Okamoto e Aoki, 1963) e se encontravam em uma fase de estabilização da elevação da PA (Kokubo *et al.*, 2005).

Os animais avaliados no delineamento 4 iniciaram o treinamento físico (ou o período sem treinamento físico) com 8 semanas de idade. Todos os animais SHRs já apresentavam a PAS maior do que 150 mmHg. Dessa forma o treinamento físico foi realizado em animais já considerados hipertensos, mas durante a fase de desenvolvimento da doença (Kokubo *et al.*, 2005). Portanto, o treinamento físico utilizado no presente trabalho possui características de uma ferramenta para o tratamento da hipertensão arterial.

O treinamento físico foi capaz de reduzir a PAS dos animais hipertensos. Os animais do grupo SHR T apresentaram valores menores de PAS quando comparados aos animais do grupo SHR NT. Assim o treinamento de intensidade moderada e duração entre 30 e 60 minutos, se mostrou efetivo em reduzir os valores de PAS em ratos hipertensos. Treinamentos físicos com características semelhantes também já se mostraram eficientes em reduzir os valores pressóricos em humanos hipertensos (Cornelissen e Smart, 2013).

Os mecanismos responsáveis pela atenuação da elevação ou redução dos níveis pressóricos em hipertensos após o treinamento aeróbio incluem várias adaptações, tais como: redução da atividade vasomotora simpática (Ceroni *et al.*, 2009; Mueller, 2010), aumento da sensibilidade barorreflexa (Brum *et al.*, 2000), menor reatividade vascular (Pasqualini *et al.*, 2010), redução da resistência vascular periférica (Amaral *et al.*, 2000; Melo *et al.*, 2003; Amaral e Michelini, 2011) e redução do estresse oxidativo (Chaar *et al.*, 2015).

O treinamento físico não alterou a PAS em ratos normotensos. Esses resultados eram esperados e também já foram demonstrados, visto que em humanos normotensos o

treinamento físico aeróbico não é capaz de diminuir os valores de pressão arterial de forma crônica (Cardoso *et al.*, 2010).

Efeitos da massa corporal nas respostas termorregulatórias durante o exercício

A diferença na massa corporal observada entre animais normotensos e hipertensos poderia afetar as alterações na T_{abd} induzidas pelo exercício, já que o custo energético da corrida e a dissipação de calor cutânea (razão entre a massa corporal e a área de superfície corporal) são dependentes da massa corporal (Cramer e Jay, 2014). Porém, Drummond *et al.* (2016) demonstraram que as diferenças termorregulatórias encontradas entre animais hipertensos e normotensos durante o exercício não são dependentes da diferença na massa corporal entre os grupos. Para eliminar esse fator de confundimento, os autores selecionaram SHRs mais pesados e NWRs mais leves e, dessa forma, não houve diferença na massa corporal entre os grupos. Mesmo com a ausência de diferença na massa corporal dos animais, as alterações nas T_{abd} , T_{pele} e temperatura cerebral foram mantidas entre animais hipertensos e normotensos.

Dessa forma, as diferenças termorregulatórias encontradas entre animais hipertensos e normotensos no presente estudo são atribuídas a alterações causadas pela hipertensão arterial e não por diferenças na massa corporal. Os demais grupos que foram comparados (NPS vs. SAL e treinado vs. não treinado) possuíam massa corporal semelhante.

Desempenho físico: efeitos da hipertensão arterial, da injeção central de NPS e do treinamento físico

No presente estudo, não houve diferença no tempo de exercício entre animais hipertensos e normotensos. Em estudos anteriores também não foram encontradas diferenças no desempenho físico, avaliados pelo tempo de exercício, entre animais normotensos e hipertensos (Carneiro-Junior *et al.*, 2010; Carneiro-Junior *et al.*, 2013; Campos *et al.*, 2014; Drummond *et al.*, 2016). No entanto, além do tempo de exercício,

também foi utilizado o cálculo do trabalho. O trabalho é uma medida de desempenho físico que leva a massa corporal dos animais em consideração. O cálculo do trabalho foi necessário devido à menor massa corporal observada nos animais hipertensos em relação aos normotensos.

O trabalho foi menor nos animais hipertensos quando comparados aos normotensos. Tais resultados podem indicar que os SHRs apresentam menor desempenho físico do que ratos NWRs no mesmo protocolo de exercício e no mesmo ambiente, se a massa corporal é levada em consideração. O trabalho realizado é uma variável mais adequada do que o tempo de exercício para medida do desempenho em estudos que comparam grupos de ratos com diferentes valores de massa corporal.

No presente trabalho, a temperatura interna não parece ter sido o fator determinante para a interrupção do exercício. Durante a realização do exercício constante em ambiente temperado, mesmo nos ratos hipertensos, em que a temperatura interna aumentou mais do que em ratos normotensos, os valores de temperatura interna atingidos na fadiga foram semelhantes ao de outros momentos do exercício, sugerindo que valores críticos de temperatura interna não foram determinantes para a interrupção do exercício, como proposto por Fuller *et al.* (1998). Porém, a manutenção da temperatura interna elevada, somadas ao estresse cardiovascular causado pela manutenção de um débito cardíaco elevado durante um longo período, além de várias outras sobrecargas fisiológicas causadas pela longa duração do esforço, podem ter contribuído para interrupção do exercício.

A injeção central de NPS não alterou o desempenho físico em animais normotensos e hipertensos. Nas situações avaliadas, os valores de temperatura interna não parecem ter sido determinantes para a interrupção do exercício e, dessa forma, a redução hipertermia durante o exercício não promoveu nenhum efeito ergogênico no desempenho físico. A injeção central de L-arginina, um outro doador de NO, também não alterou o desempenho físico de ratos (Wanner, Leite, *et al.*, 2015). Já a inibição central das NOS reduziu o desempenho físico (Lacerda *et al.*, 2006), porém nessa situação a temperatura interna se eleva mais do que em animais controle (Lacerda *et al.*, 2005), portanto é possível que nessa situação a fadiga seja determinada pelo alcance de temperatura críticas. Níveis elevados de temperatura interna e altas taxas de acúmulo de calor são associadas à interrupção do exercício (Rodrigues *et al.*, 2003; Kunstetter *et al.*, 2014).

No presente estudo, o treinamento físico foi capaz de aumentar o desempenho físico como esperado. O treinamento aumentou o tempo de exercício e o $VO_{2\text{pico}}$ em animais normotensos e hipertensos. O aumento do desempenho físico pode ser explicado, por outros fatores além do aumento da capacidade cardiorrespiratória, como o aumento da biogênese mitocondrial e atividade de enzimas oxidativas (Baar, 2004; Holloszy, 2008), aumento da eficiência mecânica (Campos, 2017), da economia de corrida (Teixeira-Coelho *et al.*, 2017) e do limiar de lactato (Pate e Kriska, 1984).

6. CONCLUSÃO

Os resultados do presente trabalho permitem concluir que as alterações termorregulatórias encontradas entre animais hipertensos e normotensos durante o exercício podem, ao menos em parte, ser explicadas por uma menor ativação de núcleos cerebrais envolvidos no controle termorregulatório. Além disso, o treinamento físico aumenta a eficiência do controle termorregulatório durante o exercício em animais normotensos e hipertensos e o aumento dessa eficiência pode ser explicado por um aumento da atividade da sintase de óxido nítrico neuronal nos animais treinados.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALAGHBAND-ZADEH, J.; DAS, I.; HANSON, M. R.; MACGREGOR, C. A.; DE WARDENER, H. E.; LAYCOCK, J. F. Hypothalamic and plasma total nitrate/nitrite concentrations in spontaneously hypertensive rats. **Exp Physiol**, v. 81, n. 5, p. 881-3, Sep 1996.

AMARAL, S. L.; MICHELINI, L. C. Effect of gender on training-induced vascular remodeling in SHR. **Braz J Med Biol Res**, v. 44, n. 9, p. 814-26, Sep 2011.

AMARAL, S. L.; ZORN, T. M.; MICHELINI, L. C. Exercise training normalizes wall-to-lumen ratio of the gracilis muscle arterioles and reduces pressure in spontaneously hypertensive rats. **J Hypertens**, v. 18, n. 11, p. 1563-72, Nov 2000.

AMIR, S.; DE BLASIO, E. Activation of brown adipose tissue thermogenesis by chemical stimulation of the hypothalamic supraoptic nucleus. **Brain Res**, v. 563, n. 1-2, p. 349-52, Nov 1 1991.

ARGAUD, L.; FERRY, T.; LE, Q. H.; MARFISI, A.; CIORBA, D.; ACHACHE, P.; DUCLUZEAU, R.; ROBERT, D. Short- and long-term outcomes of heatstroke following the 2003 heat wave in Lyon, France. **Arch Intern Med**, v. 167, n. 20, p. 2177-83, Nov 12 2007.

ARMITAGE, P.; BERRY, G. The planning of statistical investigations. In: (Ed.). **Statistical methods in medical research**. Oxford, Blackwell, 1987. p.179-85.

BAAR, K. Involvement of PPAR gamma co-activator-1, nuclear respiratory factors 1 and 2, and PPAR alpha in the adaptive response to endurance exercise. **Proc Nutr Soc**, v. 63, n. 2, p. 269-73, May 2004.

BALTHAZAR, C. H.; LEITE, L. H.; RODRIGUES, A. G.; COIMBRA, C. C. Performance-enhancing and thermoregulatory effects of intracerebroventricular dopamine in running rats. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 93, n. 4, p. 465-9, Oct 2009.

BARNEY, C. C.; SMITH, G. L.; FOLKERTS, M. M. Thermal dehydration-induced thirst in spontaneously hypertensive rats. **Am J Physiol**, v. 276, n. 5 Pt 2, p. R1302-10, May 1999.

BERKEY, D. L.; MEEUWSEN, K. W.; BARNEY, C. C. Measurements of core temperature in spontaneously hypertensive rats by radiotelemetry. **Am J Physiol**, v. 258, n. 3 Pt 2, p. R743-9, Mar 1990.

BERTAGNOLLI, M.; SCHENKEL, P. C.; CAMPOS, C.; MOSTARDA, C. T.; CASARINI, D. E.; BELLO-KLEIN, A.; IRIGOYEN, M. C.; RIGATTO, K. Exercise training reduces sympathetic modulation on cardiovascular system and cardiac oxidative stress in spontaneously hypertensive rats. **Am J Hypertens**, v. 21, n. 11, p. 1188-93, Nov 2008.

BOULANT, J. A. Role of the preoptic-anterior hypothalamus in thermoregulation and fever. **Clin Infect Dis**, v. 31 Suppl 5, p. S157-61, Oct 2000.

_____. Neuronal basis of Hammel's model for set-point thermoregulation. **J Appl Physiol (1985)**, v. 100, n. 4, p. 1347-54, Apr 2006.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 72, p. 248-54, May 7 1976.

BRATINCSAK, A.; PALKOVITS, M. Activation of brain areas in rat following warm and cold ambient exposure. **Neuroscience**, v. 127, n. 2, p. 385-97, 2004.

BREDT, D. S. Endogenous nitric oxide synthesis: biological functions and pathophysiology. **Free Radic Res**, v. 31, n. 6, p. 577-96, Dec 1999.

BREDT, D. S.; GLATT, C. E.; HWANG, P. M.; FOTUHI, M.; DAWSON, T. M.; SNYDER, S. H. Nitric oxide synthase protein and mRNA are discretely localized in neuronal populations of the mammalian CNS together with NADPH diaphorase. **Neuron**, v. 7, n. 4, p. 615-24, Oct 1991.

BREDT, D. S.; HWANG, P. M.; GLATT, C. E.; LOWENSTEIN, C.; REED, R. R.; SNYDER, S. H. Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. **Nature**, v. 351, n. 6329, p. 714-8, Jun 27 1991.

BRIESE, E. Normal body temperature of rats: the setpoint controversy. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 22, n. 3, p. 427-36, May 1998.

BROOKS, G. A.; DONOVAN, C. M.; WHITE, T. P. Estimation of anaerobic energy production and efficiency in rats during exercise. **J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol**, v. 56, n. 2, p. 520-5, Feb 1984.

BROOKS, G. A.; WHITE, T. P. Determination of metabolic and heart rate responses of rats to treadmill exercise. **J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol**, v. 45, n. 6, p. 1009-15, Dec 1978.

BRUM, P. C.; DA SILVA, G. J.; MOREIRA, E. D.; IDA, F.; NEGRAO, C. E.; KRIEGER, E. M. Exercise training increases baroreceptor gain sensitivity in normal and hypertensive rats. **Hypertension**, v. 36, n. 6, p. 1018-22, Dec 2000.

CALABRESE, V.; BUTTERFIELD, D. A.; SCAPAGNINI, G.; STELLA, A. M.; MAINES, M. D. Redox regulation of heat shock protein expression by signaling involving nitric oxide and carbon monoxide: relevance to brain aging,

neurodegenerative disorders, and longevity. **Antioxid Redox Signal**, v. 8, n. 3-4, p. 444-77, Mar-Apr 2006.

CALABRESE, V.; MANCUSO, C.; CALVANI, M.; RIZZARELLI, E.; BUTTERFIELD, D. A.; STELLA, A. M. Nitric oxide in the central nervous system: neuroprotection versus neurotoxicity. **Nat Rev Neurosci**, v. 8, n. 10, p. 766-75, Oct 2007.

CAMPOS, H. O. **Efeitos do treinamento físico aeróbio em ratos espontaneamente hipertensos sobre o balanço térmico e a expressão proteica de UCP1, UCP3 e BDNF**. 2017. (Tese de doutorado). Departamento de Fisiologia e Biofísica, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte-MG.

CAMPOS, H. O.; LEITE, L. H.; DRUMMOND, L. R.; CUNHA, D. N. Q.; COIMBRA, C. C.; NATALI, A. J.; PRIMOLA-GOMES, T. N. Temperature control of hypertensive rats during moderate exercise in warm environment. **J Sports Sci Med**, v. 13, n. 3, 2014.

CARDOSO, C. G., JR.; GOMIDES, R. S.; QUEIROZ, A. C.; PINTO, L. G.; DA SILVEIRA LOBO, F.; TINUCCI, T.; MION, D., JR.; DE MORAES FORJAZ, C. L. Acute and chronic effects of aerobic and resistance exercise on ambulatory blood pressure. **Clinics (Sao Paulo)**, v. 65, n. 3, p. 317-25, Mar 2010.

CARNEIRO-JUNIOR, M. A.; PELUZIO, M. C.; SILVA, C. H.; AMORIM, P. R.; SILVA, K. A.; SOUZA, M. O.; CASTRO, C. A.; ROMAN-CAMPOS, D.; PRIMOLA-GOMES, T. N.; NATALI, A. J. Exercise training and detraining modify the morphological and mechanical properties of single cardiac myocytes obtained from spontaneously hypertensive rats. **Braz J Med Biol Res**, v. 43, n. 11, p. 1042-6, Nov 2010.

CARNEIRO-JUNIOR, M. A.; QUINTAO-JUNIOR, J. F.; DRUMMOND, L. R.; LAVORATO, V. N.; DRUMMOND, F. R.; DA CUNHA, D. N.; AMADEU, M. A.; FELIX, L. B.; DE OLIVEIRA, E. M.; CRUZ, J. S.; PRIMOLA-GOMES, T. N.; MILL, J. G.; NATALI, A. J. The benefits of endurance training in cardiomyocyte function in hypertensive rats are reversed within four weeks of detraining. **J Mol Cell Cardiol**, v. 57, p. 119-28, Apr 2013.

CERONI, A.; CHAAR, L. J.; BOMBEIN, R. L.; MICHELINI, L. C. Chronic absence of baroreceptor inputs prevents training-induced cardiovascular adjustments in normotensive and spontaneously hypertensive rats. **Exp Physiol**, v. 94, n. 6, p. 630-40, Jun 2009.

CHAAR, L. J.; ALVES, T. P.; BATISTA JUNIOR, A. M.; MICHELINI, L. C. Early Training-Induced Reduction of Angiotensinogen in Autonomic Areas-The Main Effect of Exercise on Brain Renin-Angiotensin System in Hypertensive Rats. **PLoS One**, v. 10, n. 9, p. e0137395, 2015.

CHAM, J. L.; BADOER, E. Hypothalamic paraventricular nucleus is critical for renal vasoconstriction elicited by elevations in body temperature. **Am J Physiol Renal Physiol**, v. 294, n. 2, p. F309-15, Feb 2008.

CHAM, J. L.; KLEIN, R.; OWENS, N. C.; MATHAI, M.; MCKINLEY, M.; BADOER, E. Activation of spinally projecting and nitrenergic neurons in the PVN following heat exposure. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 291, n. 1, p. R91-101, Jul 2006.

CHENG, A.; WANG, S.; CAI, J.; RAO, M. S.; MATTSON, M. P. Nitric oxide acts in a positive feedback loop with BDNF to regulate neural progenitor cell proliferation and differentiation in the mammalian brain. **Dev Biol**, v. 258, n. 2, p. 319-33, Jun 15 2003.

CHOBANIAN, A. V.; BAKRIS, G. L.; BLACK, H. R.; CUSHMAN, W. C.; GREEN, L. A.; IZZO, J. L., JR.; JONES, D. W.; MATERSON, B. J.; OPARIL, S.; WRIGHT, J. T., JR.; ROCCELLA, E. J. The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure: the JNC 7 report. **JAMA**, v. 289, n. 19, p. 2560-72, May 21 2003.

CHOU, T. C.; YEN, M. H.; LI, C. Y.; DING, Y. A. Alterations of nitric oxide synthase expression with aging and hypertension in rats. **Hypertension**, v. 31, n. 2, p. 643-8, Feb 1998.

COLLINS, M. G.; HUNTER, W. S.; BLATTEIS, C. M. Factors producing elevated core temperature in spontaneously hypertensive rats. **J Appl Physiol (1985)**, v. 63, n. 2, p. 740-5, Aug 1987.

CORNELISSEN, V. A.; SMART, N. A. Exercise training for blood pressure: a systematic review and meta-analysis. **J Am Heart Assoc**, v. 2, n. 1, p. e004473, Feb 1 2013.

COYLE, E. F. Physical activity as a metabolic stressor. **Am J Clin Nutr**, v. 72, n. 2 Suppl, p. 512S-20S, Aug 2000.

CRAMER, M. N.; JAY, O. Selecting the correct exercise intensity for unbiased comparisons of thermoregulatory responses between groups of different mass and surface area. **J Appl Physiol (1985)**, v. 116, n. 9, p. 1123-32, May 1 2014.

DAWSON, T. M.; SNYDER, S. H. Gases as biological messengers: nitric oxide and carbon monoxide in the brain. **J Neurosci**, v. 14, n. 9, p. 5147-59, Sep 1994.

DINERMAN, J. L.; DAWSON, T. M.; SCHELL, M. J.; SNOWMAN, A.; SNYDER, S. H. Endothelial nitric oxide synthase localized to hippocampal pyramidal cells:

implications for synaptic plasticity. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 91, n. 10, p. 4214-8, May 10 1994.

DOGGRELL, S. A.; BROWN, L. Rat models of hypertension, cardiac hypertrophy and failure. **Cardiovasc Res**, v. 39, n. 1, p. 89-105, Jul 1998.

DRUMMOND, L. R.; KUNSTETTER, A. C.; VAZ, F. F.; CAMPOS, H. O.; ANDRADE, A. G.; COIMBRA, C. C.; NATALI, A. J.; WANNER, S. P.; PRIMOLA-GOMES, T. N. Brain Temperature in Spontaneously Hypertensive Rats during Physical Exercise in Temperate and Warm Environments. **PLoS One**, v. 11, n. 5, p. e0155919, 2016.

ELLIS, F. P. Mortality from heat illness and heat-aggravated illness in the United States. **Environ Res**, v. 5, n. 1, p. 1-58, Mar 1972.

FOLKOW, B. Early structural changes in hypertension: pathophysiology and clinical consequences. **J Cardiovasc Pharmacol**, v. 22 Suppl 1, p. S1-6, 1993.

FULLER, A.; CARTER, R. N.; MITCHELL, D. Brain and abdominal temperatures at fatigue in rats exercising in the heat. **J Appl Physiol (1985)**, v. 84, n. 3, p. 877-83, Mar 1998.

GALBO, H. The hormonal response to exercise. **Proc Nutr Soc**, v. 44, n. 2, p. 257-66, Jul 1985.

GALLOWAY, S. D.; MAUGHAN, R. J. Effects of ambient temperature on the capacity to perform prolonged cycle exercise in man. **Med Sci Sports Exerc**, v. 29, n. 9, p. 1240-9, Sep 1997.

GISOLFI, C. V.; WENGER, C. B. Temperature regulation during exercise: old concepts, new ideas. **Exerc Sport Sci Rev**, v. 12, p. 339-72, 1984.

GLEESON, M. Temperature regulation during exercise. **Int J Sports Med**, v. 19 Suppl 2, p. S96-9, Jun 1998.

GORDON, C. J. Thermal biology of the laboratory rat. **Physiol Behav**, v. 47, n. 5, p. 963-91, May 1990.

GORDON, C. J.; WATKINSON, W. P. Behavioral and autonomic thermoregulation in the rat following chlordimeform administration. **Neurotoxicol Teratol**, v. 10, n. 3, p. 215-9, May-Jun 1988.

GREEN, D. J.; MAIORANA, A.; O'DRISCOLL, G.; TAYLOR, R. Effect of exercise training on endothelium-derived nitric oxide function in humans. **J Physiol**, v. 561, n. Pt 1, p. 1-25, Nov 15 2004.

GROSSI, L.; D'ANGELO, S. Sodium nitroprusside: mechanism of NO release mediated by sulfhydryl-containing molecules. **J Med Chem**, v. 48, n. 7, p. 2622-6, Apr 7 2005.

GROSSI, L.; MONTEVECCHI, P. C. A kinetic study of S-nitrosothiol decomposition. **Chemistry**, v. 8, n. 2, p. 380-7, Jan 18 2002.

GROSSI, L.; MONTEVECCHI, P. C.; STRAZZARI, S. Decomposition of S-nitrosothiols: unimolecular versus autocatalytic mechanism. **J Am Chem Soc**, v. 123, n. 20, p. 4853-4, May 23 2001.

GUIX, F. X.; URIBESALGO, I.; COMA, M.; MUNOZ, F. J. The physiology and pathophysiology of nitric oxide in the brain. **Prog Neurobiol**, v. 76, n. 2, p. 126-52, Jun 2005.

HAINSWORTH, F. R. Saliva spreading, activity, and body temperature regulation in the rat. **Am J Physiol**, v. 212, n. 6, p. 1288-92, Jun 1967.

HAINSWORTH, F. R.; STRICKER, E. M. Evaporative cooling in the rat: effects of partial desalivation. **Am J Physiol**, v. 217, n. 2, p. 494-7, Aug 1969.

HARTLEY, L. H.; MASON, J. W.; HOGAN, R. P.; JONES, L. G.; KOTCHEN, T. A.; MOUGEY, E. H.; WHERRY, F. E.; PENNINGTON, L. L.; RICKETTS, P. T. Multiple hormonal responses to prolonged exercise in relation to physical training. **J Appl Physiol**, v. 33, n. 5, p. 607-10, Nov 1972.

HOFFMAN, G. E.; LE, W. W.; SITA, L. V. The importance of titrating antibodies for immunocytochemical methods. **Curr Protoc Neurosci**, v. Chapter 2, p. Unit 2 12, Oct 2008.

HOLLOSZY, J. O. Regulation by exercise of skeletal muscle content of mitochondria and GLUT4. **J Physiol Pharmacol**, v. 59 Suppl 7, p. 5-18, Dec 2008.

HOLT, S. J.; WHEAL, H. V.; YORK, D. A. Hypothalamic control of brown adipose tissue in Zucker lean and obese rats. Effect of electrical stimulation of the ventromedial nucleus and other hypothalamic centres. **Brain Res**, v. 405, n. 2, p. 227-33, Mar 10 1987.

HUANG, P. L. Neuronal and endothelial nitric oxide synthase gene knockout mice. **Braz J Med Biol Res**, v. 32, n. 11, p. 1353-9, Nov 1999.

HUBBARD, R. W.; MATTHEW, C. B.; FRANCESCONI, R. Heat-stressed rat: effects of atropine, desalivation, or restraint. **J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol**, v. 53, n. 5, p. 1171-4, Nov 1982.

IUPS. Glossary of terms for thermal physiology. Third Edition. Revised by The Commission for Thermal Physiology of the International Union of Physiological Sciences. **The Japanese Journal of Physiology**, v. 51, n. 2, p. 245-280, 2001.

JUDY, W. V.; WATANABE, A. M.; HENRY, D. P.; BESCH, H. R., JR.; MURPHY, W. R.; HOCKEL, G. M. Sympathetic nerve activity: role in regulation of blood pressure in the spontaneously hypertensive rat. **Circ Res**, v. 38, n. 6 Suppl 2, p. 21-9, Jun 1976.

KAZUYUKI, K.; HOSONO, T.; ZHANG, Y. H.; CHEN, X. M. Neuronal networks controlling thermoregulatory effectors. **Prog Brain Res**, v. 115, p. 49-62, 1998.

KERR, S.; BROSNAN, M. J.; MCINTYRE, M.; REID, J. L.; DOMINICZAK, A. F.; HAMILTON, C. A. Superoxide anion production is increased in a model of genetic hypertension: role of the endothelium. **Hypertension**, v. 33, n. 6, p. 1353-8, Jun 1999.

KIRBY, R. F.; SOKOLOFF, G.; PERDOMO, E.; BLUMBERG, M. S. Thermoregulatory and cardiac responses of infant spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto rats to cold exposure. **Hypertension**, v. 33, n. 6, p. 1465-9, Jun 1999.

KIYATKIN, E. A. Brain temperature fluctuations during physiological and pathological conditions. **Eur J Appl Physiol**, v. 101, n. 1, p. 3-17, Sep 2007.

KOBAYASHI, S. Temperature-sensitive neurons in the hypothalamus: a new hypothesis that they act as thermostats, not as transducers. **Prog Neurobiol**, v. 32, n. 2, p. 103-35, 1989.

KOKUBO, M.; UEMURA, A.; MATSUBARA, T.; MUROHARA, T. Noninvasive evaluation of the time course of change in cardiac function in spontaneously hypertensive rats by echocardiography. **Hypertens Res**, v. 28, n. 7, p. 601-9, Jul 2005.

KOLLER, A.; HUANG, A. Impaired nitric oxide-mediated flow-induced dilation in arterioles of spontaneously hypertensive rats. **Circ Res**, v. 74, n. 3, p. 416-21, Mar 1994.

KONDO, N.; TAYLOR, N. A. S.; SHIBASAKI, M.; AOKI, K.; MUHAMED, A. M. Thermoregulatory adaptation in humans and its modifying factors. **Global Environmental Research**, v. 13, n. 1, p. 35-41, 2009.

KUNSTETTER, A. C.; WANNER, S. P.; MADEIRA, L. G.; WILKE, C. F.; RODRIGUES, L. O.; LIMA, N. R. Association between the increase in brain temperature and physical performance at different exercise intensities and protocols in a temperate environment. **Braz J Med Biol Res**, v. 47, n. 8, p. 679-88, Aug 2014.

LACERDA, A. C.; MARUBAYASHI, U.; BALTHAZAR, C. H.; COIMBRA, C. C. Evidence that brain nitric oxide inhibition increases metabolic cost of exercise, reducing running performance in rats. **Neurosci Lett**, v. 393, n. 2-3, p. 260-3, Jan 30 2006.

LACERDA, A. C.; MARUBAYASHI, U.; COIMBRA, C. C. Nitric oxide pathway is an important modulator of heat loss in rats during exercise. **Brain Res Bull**, v. 67, n. 1-2, p. 110-6, Sep 30 2005.

LAIS, L. T.; SHAFFER, R. A.; BRODY, M. J. Neurogenic and humoral factors controlling vascular resistance in the spontaneously hypertensive rat. **Circ Res**, v. 35, n. 5, p. 764-74, Nov 1974.

LAUGHLIN, M. H.; SCHRAGE, W. G.; MCALLISTER, R. M.; GARVERICK, H. A.; JONES, A. W. Interaction of gender and exercise training: vasomotor reactivity of porcine skeletal muscle arteries. **J Appl Physiol (1985)**, v. 90, n. 1, p. 216-27, Jan 2001.

LEITE, L. H.; ZHENG, H.; COIMBRA, C. C.; PATEL, K. P. Contribution of the paraventricular nucleus in autonomic adjustments to heat stress. **Exp Biol Med (Maywood)**, v. 237, n. 5, p. 570-7, May 2012.

LI, Y. F.; JACKSON, K. L.; STERN, J. E.; RABELER, B.; PATEL, K. P. Interaction between glutamate and GABA systems in the integration of sympathetic outflow by the

paraventricular nucleus of the hypothalamus. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 291, n. 6, p. H2847-56, Dec 2006.

LI, Y. F.; WANG, W.; MAYHAN, W. G.; PATEL, K. P. Angiotensin-mediated increase in renal sympathetic nerve discharge within the PVN: role of nitric oxide. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 290, n. 4, p. R1035-43, Apr 2006.

LIMA, P. M.; SANTIAGO, H. P.; SZAWKA, R. E.; COIMBRA, C. C. Central blockade of nitric oxide transmission impairs exercise-induced neuronal activation in the PVN and reduces physical performance. **Brain Res Bull**, v. 108, p. 80-7, Sep 2014.

MADDEN, C. J.; MORRISON, S. F. Neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus inhibit sympathetic outflow to brown adipose tissue. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 296, n. 3, p. R831-43, Mar 2009.

MALACHIAS, M. V. B.; FRANCO, R. J.; FORJAZ, C. L. M.; PIERIN, A. M. G.; GOWDAK, M. M.; KLEIN, M.; MATSUDO, V. 7th Brazilian Guideline of Arterial Hypertension: Chapter 6 - Non-pharmacological treatment. **Arq Bras Cardiol**, v. 107, n. 3 Suppl 3, p. 30-34, Sep 2016.

MALKOFF, J. Non-Invasive Blood Pressure for Mice and Rats. **Animal Lab News**, v. November/December, 2005.

MANCIA, G.; FAGARD, R.; NARKIEWICZ, K.; REDON, J.; ZANCHETTI, A.; BOHM, M.; CHRISTIAENS, T.; CIFKOVA, R.; DE BACKER, G.; DOMINCZAK, A.; GALDERISI, M.; GROBBEE, D. E.; JAARSMA, T.; KIRCHHOF, P.; KJELDSEN, S. E.; LAURENT, S.; MANOLIS, A. J.; NILSSON, P. M.; RUILOPE, L. M.; SCHMIEDER, R. E.; SIRNES, P. A.; SLEIGHT, P.; VIIGIMAA, M.; WAEBER, B.; ZANNAD, F.; TASK FORCE FOR THE MANAGEMENT OF ARTERIAL HYPERTENSION OF THE EUROPEAN SOCIETY OF, H.; THE EUROPEAN

SOCIETY OF, C. 2013 ESH/ESC Practice Guidelines for the Management of Arterial Hypertension. **Blood Press**, v. 23, n. 1, p. 3-16, Feb 2014.

MCALLISTER, R. M.; HIRAI, T.; MUSCH, T. I. Contribution of endothelium-derived nitric oxide (EDNO) to the skeletal muscle blood flow response to exercise. **Med Sci Sports Exerc**, v. 27, n. 8, p. 1145-51, Aug 1995.

MELO, R. M.; MARTINHO, E., JR.; MICHELINI, L. C. Training-induced, pressure-lowering effect in SHR: wide effects on circulatory profile of exercised and nonexercised muscles. **Hypertension**, v. 42, n. 4, p. 851-7, Oct 2003.

MILLER, M. R.; MEGSON, I. L. Recent developments in nitric oxide donor drugs. **Br J Pharmacol**, v. 151, n. 3, p. 305-21, Jun 2007.

MONCADA, S.; PALMER, R. M.; HIGGS, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacol Rev**, v. 43, n. 2, p. 109-42, Jun 1991.

MONDA, M.; AMARO, S.; SULLO, A.; DE LUCA, B. Nitric oxide reduces body temperature and sympathetic input to brown adipose tissue during PGE1-hyperthermia. **Brain Res Bull**, v. 38, n. 5, p. 489-93, 1995.

MONTI, J. M.; JANTOS, H. Effects of L-arginine and SIN-1 on sleep and waking in the rat during both phases of the light-dark cycle. **Life Sci**, v. 75, n. 17, p. 2027-34, Sep 10 2004.

MORLEY, R. M.; CONN, C. A.; KLUGER, M. J.; VANDER, A. J. Temperature regulation in biotelemetered spontaneously hypertensive rats. **Am J Physiol**, v. 258, n. 4 Pt 2, p. R1064-9, Apr 1990.

MORRISON, S. F.; NAKAMURA, K.; MADDEN, C. J. Central control of thermogenesis in mammals. **Exp Physiol**, v. 93, n. 7, p. 773-97, Jul 2008.

MUELLER, P. J. Physical (in)activity-dependent alterations at the rostral ventrolateral medulla: influence on sympathetic nervous system regulation. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 298, n. 6, p. R1468-74, Jun 2010.

NAGASHIMA, K. Central mechanisms for thermoregulation in a hot environment. **Ind Health**, v. 44, n. 3, p. 359-67, Jul 2006.

NAGASHIMA, K.; NAKAI, S.; TANAKA, M.; KANOSUE, K. Neuronal circuitries involved in thermoregulation. **Auton Neurosci**, v. 85, n. 1-3, p. 18-25, Dec 20 2000.

NAKAMURA, K. Central circuitries for body temperature regulation and fever. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 301, n. 5, p. R1207-28, Nov 2011.

NISHIMURA, M.; TAKAHASHI, H.; NANBU, A.; SAKAMOTO, M.; YOSHIMURA, M. Cardiovascular regulation by L-arginine in the brain of rats: role of the brain renin-angiotensin system and nitric oxide. **Am J Hypertens**, v. 10, n. 4 Pt 1, p. 389-96, Apr 1997.

NUNEZ, P.; DIAZ, B.; PERILLAN, C.; VIJANDE, M.; ARGUELLES, J. Progressive training effects on neuronal hypothalamic activation in the rat. **Neurosci Lett**, v. 517, n. 2, p. 113-7, May 31 2012.

NURMINEN, M. L.; YLIKORKALA, A.; VAPAATALO, H. Central inhibition of nitric oxide synthesis increases blood pressure and heart rate in anesthetized rats. **Methods Find Exp Clin Pharmacol**, v. 19, n. 1, p. 35-41, Jan-Feb 1997.

O'LEARY, D. S.; JOHNSON, J. M.; TAYLOR, W. F. Mode of neural control mediating rat tail vasodilation during heating. **Journal of Applied Physiology**, v. 59, n. 5, p. 1533-1538, 1985-11-01 00:00:00 1985.

OKAMOTO, K.; AOKI, K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. **Jpn Circ J**, v. 27, p. 282-93, Mar 1963.

OKAZAWA, M.; TAKAO, K.; HORI, A.; SHIRAKI, T.; MATSUMURA, K.; KOBAYASHI, S. Ionic basis of cold receptors acting as thermostats. **J Neurosci**, v. 22, n. 10, p. 3994-4001, May 15 2002.

OOTSUKA, Y.; MCALLEN, R. M. Comparison between two rat sympathetic pathways activated in cold defense. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 291, n. 3, p. R589-95, Sep 2006.

OWENS, N. C.; OOTSUKA, Y.; KANOSUE, K.; MCALLEN, R. M. Thermoregulatory control of sympathetic fibres supplying the rat's tail. **J Physiol**, v. 543, n. Pt 3, p. 849-58, Sep 15 2002.

PALKOVITS, M. Isolated removal of hypothalamic or other brain nuclei of the rat. **Brain Res**, v. 59, p. 449-50, Sep 14 1973.

PASQUALINI, L.; SCHILLACI, G.; INNOCENTE, S.; PUCCI, G.; COSCIA, F.; SIEPI, D.; LUPATTELLI, G.; CIUFFETTI, G.; MANNARINO, E. Lifestyle intervention improves microvascular reactivity and increases serum adiponectin in overweight hypertensive patients. **Nutr Metab Cardiovasc Dis**, v. 20, n. 2, p. 87-92, Feb 2010.

PATE, R. R.; KRISKA, A. Physiological basis of the sex difference in cardiorespiratory endurance. **Sports Med**, v. 1, n. 2, p. 87-98, Mar-Apr 1984.

PATEL, K. P. Role of paraventricular nucleus in mediating sympathetic outflow in heart failure. **Heart Fail Rev**, v. 5, n. 1, p. 73-86, Mar 2000.

PATEL, K. P.; ZHENG, H. Central neural control of sympathetic nerve activity in heart failure following exercise training. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 302, n. 3, p. H527-37, Feb 1 2012.

PAXINOS, G.; WATSON, G. **The rat brain in stereotaxic coordinates**. 2nd. San Diego, California: Elsevier, 2007.

PEREIRA, M.; LUNET, N.; AZEVEDO, A.; BARROS, H. Differences in prevalence, awareness, treatment and control of hypertension between developing and developed countries. **J Hypertens**, v. 27, n. 5, p. 963-75, May 2009.

PESCATELLO, L. S.; FRANKLIN, B. A.; FAGARD, R.; FARQUHAR, W. B.; KELLEY, G. A.; RAY, C. A. American College of Sports Medicine position stand. Exercise and hypertension. **Med Sci Sports Exerc**, v. 36, n. 3, p. 533-53, Mar 2004.

PESCATELLO, L. S.; MACDONALD, H. V.; LAMBERTI, L.; JOHNSON, B. T. Exercise for Hypertension: A Prescription Update Integrating Existing Recommendations with Emerging Research. **Curr Hypertens Rep**, v. 17, n. 11, p. 87, Nov 2015.

PIRES, W.; WANNER, S. P.; LA GUARDIA, R. B.; RODRIGUES, L. O.; SILVEIRA, S. A.; COIMBRA, C. C.; MARUBAYASHI, U.; LIMA, N. R. Intracerebroventricular physostigmine enhances blood pressure and heat loss in running rats. **J Physiol Pharmacol**, v. 58, n. 1, p. 3-17, Mar 2007.

PLOCHOCKA-ZULINSKA, D.; KRUKOFF, T. L. Increased gene expression of neuronal nitric oxide synthase in brain of adult spontaneously hypertensive rats. **Brain Res Mol Brain Res**, v. 48, n. 2, p. 291-7, Sep 1997.

RODRIGO, J.; SPRINGALL, D. R.; UTTENTHAL, O.; BENTURA, M. L.; ABADIA-MOLINA, F.; RIVEROS-MORENO, V.; MARTINEZ-MURILLO, R.; POLAK, J. M.;

MONCADA, S. Localization of nitric oxide synthase in the adult rat brain. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 345, n. 1312, p. 175-221, Jul 29 1994.

RODRIGUES, L. O.; OLIVEIRA, A.; LIMA, N. R.; MACHADO-MOREIRA, C. A. Heat storage rate and acute fatigue in rats. **Braz J Med Biol Res**, v. 36, n. 1, p. 131-5, Jan 2003.

ROMANOVSKY, A. A. Thermoregulation: some concepts have changed. Functional architecture of the thermoregulatory system. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 292, n. 1, p. R37-46, Jan 2007.

_____. Skin temperature: its role in thermoregulation. **Acta Physiol (Oxf)**, v. 210, n. 3, p. 498-507, Mar 2014.

ROMANOVSKY, A. A.; ALMEIDA, M. C.; GARAMI, A.; STEINER, A. A.; NORMAN, M. H.; MORRISON, S. F.; NAKAMURA, K.; BURMEISTER, J. J.; NUCCI, T. B. The transient receptor potential vanilloid-1 channel in thermoregulation: a thermosensor it is not. **Pharmacol Rev**, v. 61, n. 3, p. 228-61, Sep 2009.

ROMANOVSKY, A. A.; IVANOV, A. I.; SHIMANSKY, Y. P. Selected contribution: ambient temperature for experiments in rats: a new method for determining the zone of thermal neutrality. **J Appl Physiol (1985)**, v. 92, n. 6, p. 2667-79, Jun 2002.

ROQUE, F. R.; BRIONES, A. M.; GARCIA-REDONDO, A. B.; GALAN, M.; MARTINEZ-REVELLES, S.; AVENDANO, M. S.; CACHOFEIRO, V.; FERNANDES, T.; VASSALLO, D. V.; OLIVEIRA, E. M.; SALAICES, M. Aerobic exercise reduces oxidative stress and improves vascular changes of small mesenteric and coronary arteries in hypertension. **Br J Pharmacol**, v. 168, n. 3, p. 686-703, Feb 2013.

SANDOW, S. L.; BRAMICH, N. J.; BANDI, H. P.; RUMMERY, N. M.; HILL, C. E. Structure, function, and endothelium-derived hyperpolarizing factor in the caudal artery of the SHR and WKY rat. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 23, n. 5, p. 822-8, May 1 2003.

SANTIAGO, H. P.; LEITE, L. H.; LIMA, P. M.; RODOVALHO, G. V.; SZAWKA, R. E.; COIMBRA, C. C. The improvement of exercise performance by physical training is related to increased hypothalamic neuronal activation. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 43, n. 1, p. 116-24, Jan 2016.

SBC. [VI Brazilian Guidelines on Hypertension]. *Arq Bras Cardiol*. 95: 1-51 p. 2010.

SCHWIMMER, H.; GERSTBERGER, R.; HOROWITZ, M. Nitric oxide and angiotensin II: neuromodulation of thermoregulation during combined heat and hypohydration stress. **Brain Res**, v. 1006, n. 2, p. 177-89, May 1 2004.

SMITH, J. E.; JANSEN, A. S.; GILBEY, M. P.; LOEWY, A. D. CNS cell groups projecting to sympathetic outflow of tail artery: neural circuits involved in heat loss in the rat. **Brain Res**, v. 786, n. 1-2, p. 153-64, Mar 9 1998.

SOARES, D. D.; LIMA, N. R.; COIMBRA, C. C.; MARUBAYASHI, U. Evidence that tryptophan reduces mechanical efficiency and running performance in rats. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 74, n. 2, p. 357-62, Jan 2003.

TAKAHASHI, A.; ISHIMARU, H.; IKARASHI, Y.; KISHI, E.; MARUYAMA, Y. Cholinergic input to the supraoptic nucleus increases Fos expression and body temperature in rats. **Pflugers Arch**, v. 442, n. 3, p. 451-8, Jun 2001a.

_____. Opposite regulation of body temperature by cholinergic input to the paraventricular nucleus and supraoptic nucleus in rats. **Brain Res**, v. 909, n. 1-2, p. 102-11, Aug 3 2001b.

TAKEDA, K.; OKAJIMA, H.; HAYASHI, J.; KAWASAKI, S.; SASAKI, S.; NAKAGAWA, M.; IJICHI, H. Attenuation of hypothalamo-sympathetic hyperactivity by renal denervation in experimental hypertensive rats. **Clin Exp Hypertens A**, v. 9 Suppl 1, p. 75-88, 1987.

TANAKA, H.; YANASE, M.; NAKAYAMA, T. Body temperature regulation in rats during exercise of various intensities at different ambient temperatures. **Jpn J Physiol**, v. 38, n. 2, p. 167-77, 1988.

TEIXEIRA-COELHO, F.; FONSECA, C. G.; BARBOSA, N. H. S.; VAZ, F. F.; CORDEIRO, L. M. S.; COIMBRA, C. C.; PIRES, W.; SOARES, D. D.; WANNER, S. P. Effects of manipulating the duration and intensity of aerobic training sessions on the physical performance of rats. **PLoS One**, v. 12, n. 8, p. e0183763, 2017.

THOMPSON, P. D.; CROUSE, S. F.; GOODPASTER, B.; KELLEY, D.; MOYNA, N.; PESCATELLO, L. The acute versus the chronic response to exercise. **Med Sci Sports Exerc**, v. 33, n. 6 Suppl, p. S438-45; discussion S452-3, Jun 2001.

TOUYZ, R. M.; SCHIFFRIN, E. L. Reactive oxygen species in vascular biology: implications in hypertension. **Histochem Cell Biol**, v. 122, n. 4, p. 339-52, Oct 2004.

TRAYSTMAN, R. J.; MOORE, L. E.; HELFAER, M. A.; DAVIS, S.; BANASIAK, K.; WILLIAMS, M.; HURN, P. D. Nitro-L-arginine analogues. Dose- and time-related nitric oxide synthase inhibition in brain. **Stroke**, v. 26, n. 5, p. 864-9, May 1995.

TRIPPODO, N. C.; FROHLICH, E. D. Similarities of genetic (spontaneous) hypertension. Man and rat. **Circ Res**, v. 48, n. 3, p. 309-19, Mar 1981.

TRIPPODO, N. C.; YAMAMOTO, J.; FROLICH, E. D. Whole-body venous capacity and effective total tissue compliance in SHR. **Hypertension**, v. 3, n. 1, p. 104-12, Jan-Feb 1981.

TUCKER, L. E.; STANFORD, J.; GRAVES, B.; SWETNAM, J.; HAMBURGER, S.; ANWAR, A. Classical heatstroke: clinical and laboratory assessment. **South Med J**, v. 78, n. 1, p. 20-5, Jan 1985.

VINCENT, S. R.; KIMURA, H. Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain. **Neuroscience**, v. 46, n. 4, p. 755-84, 1992.

WANG, H.; SIEMENS, J. TRP ion channels in thermosensation, thermoregulation and metabolism. **Temperature (Austin)**, v. 2, n. 2, p. 178-87, Apr-Jun 2015.

WANNER, S. P. **O exercício físico induz ajustes termorregulatórios e cardiovasculares que são mediados pela neurotransmissão colinérgica dos núcleos ventromediais hipotalâmicos**. 2006. 103 Mestrado em Educação Física (Dissertação de Mestrado). Escola de Educação Física, Fisioterapia e Terapia Ocupacional, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

WANNER, S. P.; ALMEIDA, M. C.; SHIMANSKY, Y. P.; OLIVEIRA, D. L.; EALES, J. R.; COIMBRA, C. C.; ROMANOVSKY, A. A. Cold-Induced Thermogenesis and Inflammation-Associated Cold-Seeking Behavior Are Represented by Different Dorsomedial Hypothalamic Sites: A Three-Dimensional Functional Topography Study in Conscious Rats. **J Neurosci**, v. 37, n. 29, p. 6956-6971, Jul 19 2017.

WANNER, S. P.; GUIMARAES, J. B.; RODRIGUES, L. O.; MARUBAYASHI, U.; COIMBRA, C. C.; LIMA, N. R. Muscarinic cholinergic receptors in the ventromedial hypothalamic nucleus facilitate tail heat loss during physical exercise. **Brain Res Bull**, v. 73, n. 1-3, p. 28-33, Jun 15 2007.

WANNER, S. P.; LEITE, L. H.; GUIMARAES, J. B.; COIMBRA, C. C. Increased brain L-arginine availability facilitates cutaneous heat loss induced by running exercise. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 42, n. 6, p. 609-16, Jun 2015.

WANNER, S. P.; PRIMOLA-GOMES, T. N.; PIRES, W.; GUIMARAES, J. B.; HUDSON, A. S.; KUNSTETTER, A. C.; FONSECA, C. G.; DRUMMOND, L. R.; DAMASCENO, W. C.; TEIXEIRA-COELHO, F. Thermoregulatory responses in exercising rats: methodological aspects and relevance to human physiology. **Temperature (Austin)**, v. 2, n. 4, p. 457-75, Oct-Dec 2015.

WENER, J. The concept of regulation for human body temperature. **J Therm Biol**, v. 5, p. 75-82, 1979.

WILSON, N. C.; GISOLFI, C. V.; FARBER, J.; HINRICHS, D. K. Colonic and tail-skin temperature responses of the rat at selected running speeds. **J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol**, v. 44, n. 4, p. 571-5, Apr 1978.

WRIGHT, G.; IAMS, S.; KNECHT, E. Resistance to heat stress in the spontaneously hypertensive rat. **Can J Physiol Pharmacol**, v. 55, n. 5, p. 975-82, Oct 1977.

WRIGHT, G. L.; KNECHT, E.; BADGER, D.; SAMUELOFF, S.; TORAASON, M.; DUKES-DOBOS, F. Oxygen consumption in the spontaneously hypertensive rat. **Proc Soc Exp Biol Med**, v. 159, n. 3, p. 449-52, Dec 1978.

YAMAMOTO, T.; SHIMOYAMA, N.; MIZUGUCHI, T. Nitric oxide synthase inhibitor blocks spinal sensitization induced by formalin injection into the rat paw. **Anesth Analg**, v. 77, n. 5, p. 886-90, Nov 1993.

YOSHIDA, K.; MARUYAMA, M.; HOSONO, T.; NAGASHIMA, K.; FUKUDA, Y.; GERSTBERGER, R.; KANOSUE, K. Fos expression induced by warming the preoptic area in rats. **Brain Res**, v. 933, n. 2, p. 109-17, Apr 19 2002.

YOUNG, A. A.; DAWSON, N. J. Evidence for on-off control of heat dissipation from the tail of the rat. **Can J Physiol Pharmacol**, v. 60, n. 3, p. 392-8, Mar 1982.

ZHANG, K.; MAYHAN, W. G.; PATEL, K. P. Nitric oxide within the paraventricular nucleus mediates changes in renal sympathetic nerve activity. **Am J Physiol**, v. 273, n. 3 Pt 2, p. R864-72, Sep 1997.