ANA CAROLINA THOMAZ TAKAKURA

# Mecanismos Cardio-Respiratórios Integrados na Região Bulbar: Participação da Área Pressora Caudal, dos Núcleos do Trato Solitário e do Núcleo Retrotrapezóide

**Tese apresentada à Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina para obtenção do título de Doutor em Ciências**

**SÃO PAULO**

**2009**

**ANA CAROLINA THOMAZ TAKAKURA**

# Mecanismos Cardio-Respiratórios Integrados na Região Bulbar: Participação da Área Pressora Caudal, dos Núcleos do Trato Solitário e do Núcleo Retrotrapezóide

**Tese apresentada à Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina para obtenção do título de Doutor em Ciências**
**Curso de Pós-graduação em Farmacologia**
**Setor de Fisiofarmacologia**

**Orientador**
**Prof. Dr. Eduardo Colombari**

Takakura, Ana Carolina Thomaz

**Mecanismos Cardio-Respiratórios Integrados na Região Bulbar: Participação da Área Pressora Caudal, dos Núcleos do Trato Solitário e do Núcleo Retrotrapezóide.**

Ana Carolina Thomaz Takakura. – São Paulo, 2009.

vii, 200.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

Título em inglês: Integrated Cardio-Respiratory Mechanisms within the brainstem: Involvement of the Caudal Pressor Area, the Nucleus of the Solitary Tract and the Retrotrapezopid Nucleus.

1. Atividade simpática. 2. Pressão arterial. 3. Núcleo do trato solitário. 4. Bulbo ventrolateral. 5. Sistema nervoso central.

**Este trabalho foi realizado com o apoio financeiro da FAPESP (processos 04/08282-6 e 98/06231-2 Projeto Temático) e Capes (processo BEX 4402/05-73)**

**“Só é útil o conhecimento que nos torna melhores”**
***Sócrates***

# *AGRADECIMENTOS*

♦ Ao meu orientador, Prof. Dr. Eduardo Colombari, os maiores e mais sinceros agradecimentos. Obrigada pela colaboração, paciência e seus conhecimentos repassados durante todo desenvolvimento desse trabalho, além da grande amizade formada. A disponibilidade que sempre manifestou e a empatia com que recebeu as minhas idéias foram o estímulo que me permitiu vencer as inseguranças desse processo.

♦ Ao Prof. Dr. Patrice G. Guyenet pela generosidade em passar seus ensinamentos. Obrigada pela paciência, dedicação, disponibilidade, apoio e confiança. A você, todo meu carinho e gratidão pelos momentos maravilhosos em Charlottesville.

♦ Às Prof$^{as}$. Ruth L. Stornetta e Diane L. Rosin pelos ensinamentos nos experimentos de anatomia envolvendo imuno-histoquímica e hibridização in-situ.

♦ Ao meu primeiro e eterno orientador, Prof. Dr. José Vanderlei Menani, a quem devoto a mais sincera e efusiva admiração.

♦ Ao Prof. Dr. Ruy Ribeiro de Campos Júnior que gentilmente aceitou co-orientar esse trabalho. Obrigada pelos ensinamentos e valiosas sugestões.

♦ Aos colegas, professores e funcionários do Departamento de Fisiologia e Patologia da Faculdade de Odontoloia de Araraquara e da Disciplina de Fisiologia Cardiovascular e Respiratória da Universidade Federal de São Paulo pelo apoio que nunca me foi negado.

♦ À Universidade Federal de São Paulo que me proporcionou a oportunidade de cursar Pós-Graduação num curso de excelência como o curso de Pós-Graduação em Farmacologia.

♦ À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela confiança e apoio financeiro.

# *AGRADECIMENTOS ESPECIAIS*

♦ A Deus, por ter me dado o que tenho de mais precioso, a vida. Obrigada também porque tenho diante de mim um sonho realizado. Concluo mais uma etapa da minha vida e agradeço-Lhe pela força que me impulsionou a chegar até aqui.

♦ Ao meu querido Thiago, meu marido, que compartilha comigo 14 anos de convivência: você é ESSENCIAL na minha vida. Você faz parte de cada linha escrita desse trabalho e de cada experimento realizado..... Esteve presente desde o momento em que essa semente foi plantada (quando me levou para o laboratório de fisiologia no meu primeiro ano de graduação) até à valiosa revisão que ajudou a dar a forma final a esse trabalho e, certamente, a muitos outros que ainda virão. A vida junto de você é maravilhosa.... Agradeço a Deus todos os dias pela sua existência e por ter o prazer e sorte de dividir minha vida com a sua..... Espero que juntos consigamos construir um lar de paz e harmonia para a nossa Luísa, que é a nossa jóia preciosa.... Obrigada por me ensinar que a vida é muito bela quando temos alguém que amamos verdadeiramente ao nosso lado..... Acordar ao seu lado todos os dias, meu querido, me enche de paz.

♦ À minha pequena Luísa, que nasceu no meio de todo esse trabalho..... Com quem eu sonhei a vida toda; que pouco antes de chegar, tinha um coração que batia rápido no meu ventre e a minha ansiedade nos fez parceiras desde então.... Que ao nascer, foi vestida com a minha paixão... Acordar com a tua luz, minha filha, faz dos meus dias uma constante primavera. Teu sorriso, minha energia. Tua sinceridade, minha emoção. Tua gargalhada, minha alegria... Você foi uma decisão sábia do meu coração, uma gostosa escolha que atribui sentido à minha vida. Te devo vários ensinamentos....

♦ Aos meus queridos pais, Osvaldo e Lucimara, que me deram a vida e me ensinaram a vivê-la com dignidade. A vocês, meus queridos, que iluminaram os meus caminhos obscuros com afeto e dedicação; que apostaram em mim e me deram a maior herança que poderia existir: a educação e a cultura; que se doaram inteiros e renunciaram aos seus sonhos para que eu pudesse realizar os meus. Obrigada pela certeza de que, a qualquer momento que eu olhar para o lado, as suas mãos estarão estendidas para me auxiliar.

♦ Aos meus queridos irmãos Isabela, Breno e Bruno que me incentivaram a todo momento a lutar pelos meus sonhos e encontrar prazer em coisas simples, como trabalho e família.... Obrigada pela proteção e cuidados que sempre foram meus privilégios de irmã caçula.... É muito bom quando estamos todos reunidos.....

♦ À toda minha família que me ajuda e apóia em tudo que faço. Obrigada por me ensinar a importância de estarmos sempre unidos para vencer as dificuldades que a vida nos impõe. Vejo em cada um de vocês a garra necessária para a luta do nosso cotidiano.

# ÍNDICE

Abreviações e Símbolos.....14

***Parte 1: "Envolvimento dos núcleos do trato solitário (NTS) nas respostas cardiovasculares produzidas pela estimulação e inibição da área pressora caudal (APC)".***

RESUMO.....17

ABSTRACT.....22

INTRODUÇÃO.....26

OBJETIVOS.....39

MATERIAIS E MÉTODOS.....40

1- Animais.....40

2- Procedimentos cirúrgicos e anestesia.....40

3- Lesão eletrolítica do NTS comissural medial.....42

4- Registro de pressão arterial e frequência cardíaca.....43

5- Registro de atividade simpática eferente e nervo frênico.....43

6- Injeção de drogas.....44

7- Drogas utilizadas.....45

8- Ativação dos quimiorreceptores periféricos.....46

9- Histologia.....46

9- Análise dos resultados.....48

Experimentos realizados.....49

RESULTADOS.....54

1- Análise histológica.....54

1.1- Lesão do núcleo do trato solitário comissural.....54

1.2- Injeções no núcleo do trato solitário.....54

1.3- Injeções na área pressora caudal.....55

2- Efeitos da lesão eletrolítica do NTS comissural nas respostas de PAM e FC após a estimulação da APC.....58

3- Efeitos da inibição do NTS comissural nas respostas de PAM e FC após a estimulação da APC.....61

4- Efeitos da inibição do NTS intermediário nas respostas de PAM e FC após a estimulação da APC.....64

5- Efeitos da estimulação do NTS comissural nas respostas de PAM e FC após a inibição da APC.....67

6- Efeitos da estimulação do NTS intermediário nas respostas de PAM e FC após a inibição da APC.....71

7- Efeitos da inibição da APC nas respostas de ativação do baro e quimiorreflexo.....74

7.1- Barorreflexo.....74

7.2- Quimiorreflexo.....78

8- Hipóxia promove a ativação de neurônios glutamatérgicos no NTS e na APC.....81

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO.....84

***Parte 2: "Influências inibitórias nos neurônios quimiossensíveis do núcleo retrotrapezóide (NRT)".***

RESUMO.....100

ABSTRACT.....104

INTRODUÇÃO.....106

OBJETIVOS.....117
MATERIAIS E MÉTODOS.....118
1- Animais.....118
2- Procedimentos cirúrgicos e anestesia.....118
3- Registro das variáveis fisiológicas e atividade neuronal.....120
3.1- Registro de pressão arterial.....120
3.2- Registro da atividade do nervo frênico.....120
3.3- Registro extracelular dos neurônios da superfície ventral do bulbo e do núcleo do trato solitário.....121
4- Ativação do reflexo de Hering-Breuer.....123
5- Drogas utilizadas.....124
6- Injeção dos traçadores neuronais.....125
7- Histologia.....127
8- Análise dos resultados.....128
RESULTADOS.....130
1- Análise histológica.....130
1.1-Injeções nos núcleos do trato solitário intermediário (região intersticial).....130
1.2- Injeções na coluna respiratória rostro-ventral.....130
2-Efeitos da distensão do pulmão na atividade dos neurônios do núcleo retrotrapezóide.....132
3- Efeitos da distensão do pulmão na atividade de outros neurônios localizados no bulbo ventrolateral.....138

4- Efeitos da distensão do pulmão nos neurônios quimiossensíveis do núcleo retrotrapezóide após a injeção de muscimol na coluna respiratória rostro-ventral.....142
5- Efeitos da estimulação do nervo vago nos neurônios quimiossensíveis do núcleo retrotrapezóide.....145
6- Efeitos da ativação do reflexo de Bezold-Jarish na atividade dos neurônios do núcleo retrotrapezóide.....150
7- Efeitos da distensão do pulmão nos neurônios quimiossensíveis do núcleo retrotrapezóide após a injeção de muscimol na região intersticial do NTS.....152
8- A injeção intracerebriventricular de ácido quinurênico inibe os efeitos inibitórios da distensão do pulmão, mas mantém intacto os efeitos da hipercapnia nos neurônios do núcleo retrotrapezóide.....155
9- Evidências eletrofisiológicas de que as células GABAérgicas do NTS intersticial inervam o núcleo retrotrapezóide.....157
10- Evidências anatômicas de projeções GABAérgicas do NTS intersticial para o núcleo retrotrapezóide.....162
DISCUSSÃO E CONCLUSÃO.....167
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....186

# ABREVIAÇÕES E SÍMBOLOS

**APC:** Área pressora caudal.
**bpm:** Batimento por minuto.
**BDA:** Amina dextrana biotinilada.
**Böt:** Região Bötzinger.
**C1:** Grupamento adrenérgico C1.
**$CO_2$:** Dióxido de carbono.
**CVL:** Região caudoventrolateral.
**CRV:** Coluna respiratória ventral.
**EPM**: Erro padrão da média.
**FC:** Frequência cardíaca.
**GABA:** Ácido δ-aminobutírico.
**GAD:** Glutamina ácido descarboxilase.
**i.c.v.**: Intracerebroventricular.
**i.v.**: Endovenoso
**Itr:** Região inter trigeminal.
**KF:** Kölliker-Fuse.
**Kg:** Quilograma.
**mg**: miligrama(s).
**ml**: mililitro(s).
**mm**: milímetro(s).
**mmHg:** Milímetro de mercúrio.
**mM:** Milimolar.
**Mo5:** Núcleo motor do trigêmio.
**nA:** Núcleo Ambígus.
**NaCN:** Cianeto de sódio.
**nl:** Nanolitro(s).
**nmol:** Nanomolar.
**NPBL:** Núcleo parabraquial lateral.
**NTS:** Núcleos do trato solitário.
**NTScom:** Núcleo do trato solitário comissural.
**NTS int:** Núcleo do trato solitário intermediário.
**NRL:** Núcleo reticular lateral.
**NRT:** Núcleo retrotrapezóide.
**$O_2$:** Oxigênio.
**PAM:** Pressão arterial média.
**PAP:** Pressão arterial pulsátil.
**$pCO_2$:** Pressão parcial de $CO_2$.
**Pn:** Núcleo pontino.
**$pO_2$:** Pressão parcial de $O_2$.
**pre-BötC:** Complexo pré-Bötzinger.
**RVL:** Região rostroventrolateral.
**Scp:** Peduncúlo cerebelar superior.
**SNC:** Sistema nervoso central.
**SO:** Oliva superior.

**VGLUT:** Vesícula para transporte de glutamato.
**VlPon:** Ponte ventrolateral.
**5n:** Quinto nervo motor.
**7n:** Sétimo nervo motor.
**7:** Núcleo motor do facial.
**µg:** micrograma(s);
**µm:** micrometro(s);
**±:** mais ou menos;
**>:** maior;
**<:** menor.

# Parte 1

***“Envolvimento dos núcleos do trato solitário (NTS) nas respostas cardiovasculares produzidas pela estimulação e inibição da área pressora caudal (APC)”.***

# RESUMO

Respostas cardiovasculares podem ser integradas em diferentes níveis do sistema nervoso central (SNC). No bulbo existem várias áreas importantes para o controle cardiovascular. Sabe-se que, na superfície ventrolateral do bulbo, existem pelo menos três regiões relevantes ao controle cardiovascular: região rostroventrolateral (RVL), região caudoventrolateral (CVL) e a área pressora caudal (APC).

A região RVL tem importante função na manutenção do tônus vasomotor e a região CVL interfere na regulação da pressão arterial (PA) por modular a atividade da região RVL. Além disso, essas duas regiões participam na interação de reflexos cardiovasculares, que incluem a participação de outra estrutura bulbar (Núcleos do Trato Solitário - NTS) como primeira sinapse de fibras aferentes reflexas. A APC foi recentemente descoberta e interfere na regulação da PA por modular a atividade dos neurônios das regiões RVL e CVL.

Desse modo, o presente estudo procurou investigar a participação do NTS (região comissural e intermediária) nas respostas produzidas pela estimulação ou inibição da APC.

Foram utilizados ratos Holtzman (280-350 g; n = 6-8) anestesiados com uretana (1,2 g/kg, i.v.). Um cateter foi inserido na artéria e veia femoral desses animais para registro de pressão arterial, freqüência cardíaca e injeção de drogas. Em alguns animais, foi registrada a atividade elétrica do nervo esplâncnico e do nervo frênico. Os animais foram adaptados a um aparelho estereotáxico e submetidos a uma craniotomia parcial para injeções de drogas.

Num primeiro grupo experimental, os animais foram submetidos a lesão fictícia ou eletrolítica (1 mA x 10s) do NTS comissural (NTScom). A injeção unilateral do aminoácido excitatório L-glutamato (1 mM - 100 nl) na APC produziu resposta pressora ($\Delta$ = +28 ± 3 mmHg, vs. controle: $\Delta$ = +2 ± 2 mmHg, $p<0,05$) e taquicárdica ($\Delta$ = +20 ± 1 bpm, vs. controle: $\Delta$ = +3 ± 3 bpm, $p<0,05$). As respostas pressora e taquicárdica promovidas pela injeção unilateral de L-glutamato na APC foram abolidas 10 ($\Delta$ = +5 ± 7 mmHg e $\Delta$ = +4 ± 3 bpm, respectivamente), 30 ($\Delta$ = +7 ± 3 mmHg e $\Delta$ = +6 ± 3 bpm, respectivamente) e 60 minutos ($\Delta$ = +11 ± 3 mmHg e $\Delta$ = +5 ± 1 bpm, respectivamente) após a lesão eletrolítica do NTScom. Da mesma maneira, no grupo de animais que recebeu a injeção do agonista GABA-A muscimol no NTScom, as respostas pressora e taquicárdica promovidas pela injeção unilateral de L-glutamato na APC foram abolidas 10 ($\Delta$ = +5 ± 5 mmHg e $\Delta$ = +5 ± 3 bpm, respectivamente), 30 ($\Delta$ = +8 ± 5 mmHg e $\Delta$ = +7 ± 2 bpm, respectivamente) e 60 minutos ($\Delta$ = +11 ± 6 mmHg e $\Delta$ = +5 ± 2 bpm, respectivamente) após a injeção de muscimol. Por outro lado, as respostas pressora e taquicárdica promovidas pela injeção unilateral de L-glutamato na APC não foram modificadas 10 ($\Delta$ = +11 ± 2 mmHg e $\Delta$ = +30 ± 12 bpm, respectivamente), 30 ($\Delta$ = +27 ± 4 mmHg e $\Delta$ = +32 ± 15 bpm, respectivamente) e 60 minutos ($\Delta$ = +24 ± 7 mmHg e $\Delta$ = +24 ± 8 bpm, respectivamente) após as injeções bilaterais de muscimol no NTS intermediário.

Dessa forma, as repostas de estimulação da APC parecem depender da integridade dos neurônios localizados no NTScom. Sendo assim, será que a integridade da APC é importante para as respostas de estimulação do NTScom?

Apenas as injeções bilaterais do agonista GABAérgico muscimol (2 mM - 100 nl) na APC promoveu queda de PAM ($\Delta$ = -18 ± 6 mmHg, $p<0,05$) e FC ($\Delta$ = -21 ± 8 bpm, $p<0,05$). As respostas depressora e bradicárdica promovidas pela injeção unilateral de L-glutamato no NTScom foram abolidas 10 ($\Delta$ = -5 ± 3 mmHg e $\Delta$ = +8 ± 9 bpm, respectivamente), 30 ($\Delta$ = -5 ± 2 mmHg e $\Delta$ = +7 ± 4 bpm, respectivamente) e 60 minutos ($\Delta$ = -6 ± 4 mmHg e $\Delta$ = +10 ± 6 bpm, respectivamente) após as injeções bilaterais de muscimol na APC. Da mesma maneira do ocorrido com as respostas de estimulação da APC, as respostas depressora e bradicárdica promovidas pela injeção unilateral de L-glutamato no NTS intermediário não foram modificadas 10 ($\Delta$ = -41 ± 9 mmHg e $\Delta$ = -67 ± 26 bpm, respectivamente), 30 ($\Delta$ = -31 ± 12 mmHg e $\Delta$ = -23 ± 4 bpm, respectivamente) e 60 minutos ($\Delta$ = -32 ± 8 mmHg e $\Delta$ = -21 ± 3 bpm, respectivamente) após as injeções bilaterais de muscimol na APC.

Nossa próxima questão era saber se a inibição da APC promoveria alterações nos reflexos cardiovasculares. A curva do barorreflexo foi construída com injeções endovenosas de uma dose depressora de nitroprussiato de sódio (30 μg/kg) e com a inflação de um balão na aorta torácica. A relação de atividade simpática e PAM (curva do barorreflexo) não revelou nenhum efeito significativo alterado após as injeções bilaterais de muscimol na APC. Após a inibição da APC o barorreflexo continuou operando nos mesmos valores de PAM50 quando comparado ao grupo controle. Os valores de platô superior e inferior, bem como o ganho também não tiveram diferença quando comparados com o grupo controle. A ativação do quimiorreflexo foi realizada com injeções endovenosas de cianeto

de sódio (NaCN – 50 μg/kg). A ativação do quimiorreflexo com NaCN produziu resposta pressora (Δ = +16 ± 4 mmHg, vs. salina Δ = +2 ± 2 mmHg, $p<0,05$), aumento da atividade simpática do nervo esplâncnico (Δ = +236 ± 11% em relação ao controle, $p<0,01$) e aumento da atividade do nervo frênico. Muscimol injetado bilateralmente na APC promoveu uma redução da resposta pressora (Δ = +9 ± 2 mmHg, vs. salina Δ = +18 ± 4 mmHg, $p<0,05$), da resposta simpatoexcitatória (Δ = +88 ± 18%, vs. salina Δ = +217 ± 33 %, $p<0,01$) e do aumento da atividade do nervo frênico produzido pela ativação dos quimiorreceptores periféricos com NaCN.

As aferências dos quimiorreceptores periféricos terminam predominantemente no NTScom. Para corroborar a interação existente entre os neurônios do NTScom e a APC, o próximo experimento foi realizado para testar se os neurônios localizados no NTS ou na APC, ativados por hipóxia, são predominantemente glutamatérgicos ou gabaérgicos. Os animais foram expostos a situações de hipóxia (8% $O_2$, n = 5) ou normóxia (ar ambiente, n = 4). A imunorretividade para a proteína Fos foi utilizada para identificação dos neurônios ativados por hipóxia. Os neurônios glutamatérgicos ou gabaérgicos foram definidos devido à expressão, via hibridização in situ, de VGLUT2 mRNA ou GAD67 mRNA, respectivamente. A maioria dos neurônios que expressam Fos após hipóxia são glutamatérgicos na região do NTScom (64 ± 13%) e NTS intermediário (41 ± 9%). Na região da APC, dos neurônios que expressam Fos após hipóxia, somente uma pequena parcela (26 ± 9%) são glutamatérgicos. Apenas uma pequena quantidade de neurônios que expressam Fos também

expressam GAD67 mRNA na região do NTScom (7 ± 4%), na região do NTS intermediário (16 ± 9%) e na APC (5 ± 3%). A imunorreatividade para a proteína Fos foi praticamente inexistente nos animais que foram expostos ao ar ambiente.

Diante disso, os nossos resultados são os primeiros a mostrar a existência da interação entre a região comissural do NTS e a APC no que diz respeito ao controle cardiovascular. Sabe-se que a região do NTScom contém neurônios de segunda ordem que recebem as aferências dos quimiorreceptores periféricos e que as respostas de estimulação do NTScom parecem depender da integridade da APC. Logo, os resultados do presente estudo também mostraram que a inibição da APC foi capaz de reduzir as respostas simpatoexcitatórias e respiratórias após a estimulação dos quimiorreceptores periféricos. Por outro lado, a inibição da APC não foi capaz de reduzir as respostas de ativação do barorreflexo.

# ABSTRACT

Cardiovascular responses are integrated at different levels of the central nervous system (CNS). In the brainstem, there are different areas related to the cardiovascular control. It is well known that in the ventrolateral medulla there are, at least, three important regions involved with cardiovascular control: the rostral ventrolateral medulla (RVLM), the caudal ventrolateral medulla (CVLM) and the caudal pressor area (CPA). The RVLM is the main source of excitatory input to sympathetic preganglionic neurons playing a crucial role for tonic and reflex control of the cardiovascular system. The caudal ventrolateral medulla (CVLM) contains the GABAergic sympathoinhibitory neurons that project to RVLM. Besides these two regions, the NTS is the site of the first synapse of the viscerosensory afferent fibers in the brainstem including those related to cardiovascular and respiratory afferents. Besides the circuitry described above, more recent studies have also shown a new site, the CPA, located in the caudal end of the ventrolateral medulla, which provides excitatory signals that affect sympathetic activity to the cardiovascular system in rats.

Therefore, the aim of the present study was to investigate the involvement of the NTS (commissural and/or intermediate regions) on the stimulation or inhibition of the CPA.

Male Holtzman rats (280-350 g; n = 6-8) anesthetized with urethane (1.2 g/kg, i.v.) were used. Unilateral microinjection of L-glutamate (1 mM - 100 nL) into the CPA resulted in an increase in mean arterial pressure (MAP, $\Delta$ = +28 ± 3 mmHg, vs. controle: $\Delta$ = +2 ± 2 mmHg, $p<0.05$) and heart rate (HR, $\Delta$ = +20 ± 1

bpm, vs. controle: Δ = +3 ± 3 bpm, p<0.05). Electrolytic lesions of the commissural NTS (commNTS) (1 mA x 10s) abolished the pressor and tachycardic responses at 10 (Δ = +5 ± 7 mmHg and Δ = +4 ± 3 bpm), 30 (Δ = +7 ± 3 mmHg and Δ = +6 ± 3 bpm) and 60 minutes (Δ = +11 ± 3 mmHg and Δ = +5 ± 1 bpm) produced by injection of L-glutamate into the CPA.

In the same way, muscimol (GABA-A receptor agonist) (2 mM - 60 nL) injected into the commNTS abolished the pressor and tachycardic responses at 10 (Δ = +5 ± 5 mmHg and Δ = +5 ± 3 bpm), 30 (Δ = +8 ± 5 mmHg and Δ = +7 ± 2 bpm) and 60 minutes (Δ = +11 ± 6 mmHg and Δ = +5 ± 2 bpm) produced by injection of L-glutamate into the CPA. On the other hand, the injection of L-glutamate unilaterally into the CPA 10, 30 and 60 minutes after the injection of muscimol into the intermediate NTS produced no change on MAP increase (Δ = +11± 2, +27 ± 4 and +24 ± 7 mmHg, respectively) and HR (Δ = +30 ± 12, +32 ± 15 and +24 ± 8 bpm, respectively).

It seems that the activation of the CPA depends on the integrity of the commNTS neurons. Does the CPA integrity depend on NTS activation?

Bilateral injection of muscimol (GABA-A agonist, 2 mM – 60 nl) into the CPA produced a decrease in MAP (Δ = -18 ± 2 mmHg, p<0.05) and HR (Δ = -21 ± 6 bpm, p<0.05). The depressor and bradycardia responses produced by L-glutamate into the commNTS was abolished at 10 (Δ = -5 ± 3 mmHg and Δ = +8 ± 9 bpm), 30 (Δ = -5 ± 2 mmHg and Δ = +7 ± 4 bpm) and 60 minutes (Δ = -6 ± 4 mmHg and Δ = +10 ± 6 bpm) after muscimol injection into the CPA. On the other hand, the depressor and bradicardic responses produced by L-glutamate into the

intermediate NTS was not changed at 10 (Δ = -41 ± 9 mmHg and Δ = -67 ± 26 bpm), 30 (Δ = -31 ± 12 mmHg and Δ = -23 ± 4 bpm) and 60 minutes (Δ = -32 ± 8 mmHg and Δ = -21 ± 3 bpm) after muscimol injection into the CPA.

Our next question was to know if the inhibition of the CPA will change the cardiovascular reflexes. Baroreflex curves were generated by lowering MAP with sodium nitroprusside (30 μg/kg) and increasing MAP by constricting an abdominal aortic snare. The relationship between MAP and sympathetic nerve discharge (SND) (baroreflex curves) revealed no change after muscimol injection into the CPA. After inhibition of the CPA, the baroreflex operated around a comparable MAP (MAP50) in all groups of rats. The lower and upper plateau, as well the baroreflex range was not different from the control group.

The chemoreflex was actvated by i.v. injections of sodium cyanide (NaCN – 50 μg/kg). The activation of chemoreflex with NaCN produced a rise in MAP (Δ = +16 ± 4 mmHg, vs. saline Δ = +2 ± 2 mmHg, $p<0.05$), an increase in SND (Δ = +236 ± 11% of resting, $p<0.01$) and an increase in phrenic nerve discharge (PND). Muscimol injection into the CPA reduced the pressor (Δ = +9 ± 2 mmHg, vs. saline Δ = +18 ± 4 mmHg, $p<0.05$), sympathoexcitatory (Δ = +88 ± 18%, vs. saline Δ = +217 ± 33 %, $p<0.01$) and the increase in PND produced by chemoreflex activation with NaCN.

Carotid chemoreceptor afferents terminate predominantly in commNTS. The next experiment was designed to test and to confirm the interaction between the commNTS and the CPA neurons by anatomical approaches. We tested whether glutamatergic or GABAergic.

The rats were exposed to hypoxia (8% $O_2$, n = 5) or to normal air (n = 4). Fos-immunoreactivity was used to identify commNTS neurons that were activated by hypoxia. NTS or CPA neurons were classified as glutamatergic or GABAergic based on whether they contained VGLUT2 mRNA or GAD67 mRNA.

The vast majority of the commNTS (64 ± 13%), intermediate NTS (41 ± 9%) and CPA (26 ± 9%) neurons that were immunoreactive for Fos contained VGLUT2 mRNA, whereas only a small proportion of the same class of neurons contained GAD-67 mRNA (commNTS: 7 ± 4%; intermediate NTS: 16 ± 9% and CPA: 5 ± 3%).

Therefore, our results are the first to show the existence of an interaction between the commNTS and CPA in terms of cardiovascular control. However we know that commNTS neurons receive inputs from peripheral chemoreceptors and the stimulation of commNTS depends on CPA integrity. These data suggest that CPA contributes to resting MAP, sSND and to the sympathoexcitatory effect during stimulation of peripheral chemoreceptors.

# INTRODUÇÃO

O sistema cardiovascular tem importância vital na homeostasia do meio interno. Para desempenhar esta função, esse sistema dispõe de refinados mecanismos no ajuste da pressão arterial momento a momento (controle neural) e de longa duração (controle humoral).

## Regulação neural da pressão arterial

A regulação neural do sistema cardiovascular envolve a ativação de diferentes grupos de sensores periféricos (barorreceptores, receptores cardiopulmonares e quimiorreceptores, entre outros), os quais projetam suas aferências para estruturas do sistema nervoso central (SNC) via nervos vago e glossofaríngeo. O processamento destas informações aferentes no SNC irá resultar na modulação das vias autonômicas eferentes, controlando as variáveis cardiovasculares no sentido de manter a homeostase nas diversas situações comportamentais em que os mamíferos são submetidos. No sistema cardiovascular, as variáveis reguladas pelo sistema nervoso autônomo são a freqüência cardíaca, o volume sistólico (força de contração) e a resistência periférica, as quais são determinantes da pressão arterial.

O envolvimento do SNC na manutenção da homeostase do sistema cardiovascular é conhecido desde o século XIX. Os estudos clássicos realizados por Claude Bernard na França, e publicados em 1863 (*apud* Gebber, 1990), já mostravam que a transecção da medula espinal cervical em qualquer nível

produzia pronunciada queda da pressão arterial. No entanto, foram os estudos de Dittmar, em 1873 (*apud* Gebber, 1990), que primeiro demonstraram a participação do bulbo na manutenção da pressão arterial, sobretudo as porções ventrolaterais bulbares. Nesses estudos, foi observado que a destruição da região ventral do bulbo produzia queda da pressão arterial, ao passo que o mesmo não acontecia se a destruição fosse realizada na região dorsal. Disso adveio a hipótese de que a região ventral do bulbo exerceria fundamental importância na manutenção dos níveis considerados normais de pressão arterial, e foi introduzido na época o conceito de tônus vasomotor simpático.

Posteriormente, Bayliss lançou a hipótese de que existiria um centro vasomotor, localizado na região ventral do bulbo e que seria constituído por áreas tanto pressoras como depressoras (Bayliss, 1901).

Mais tarde, o aparecimento da técnica de estereotaxia associada à eletrofisiologia (estimulação elétrica) possibilitou o mapeamento de todo o tronco cerebral e foram identificadas regiões pressoras e depressoras situadas em toda a formação reticular bulbar, que se estendiam desde a região dorsal até a ventral do bulbo (Wang e Ranson, 1939; Alexander, 1946). A idéia de um centro vasomotor simpático com localização delimitada, como proposto por Dittmar passou então a ser desacreditada. Entretanto, os dados obtidos utilizando a técnica de estimulação elétrica, que reconhecidamente interfere não só sobre os corpos celulares dos neurônios, como também sobre fibras de passagem, não permitia delimitar com exatidão a localização das regiões envolvidas no controle cardiovascular.

Os estudos de Feldberg e Guertzenstein (1972) e Guertzenstein (1973) foram os primeiros a demonstrar a existência da atividade tônica de neurônios localizados na superfície ventral do bulbo rostral de gatos sobre a manutenção da pressão arterial. Inicialmente, eles demonstraram que a administração intracerebroventricular de pentobarbital sódico produzia queda da pressão arterial; a mesma dose administrada endovenosamente ou quando o aqueduto cerebral que liga o terceiro ao quarto ventrículo era obstruído, a hipotensão desaparecia, sugerindo que o pentobarbital atuava na região bulbar (Feldberg & Guertzenstein, 1972). Os dois autores também utilizaram-se de drogas que agem preferencialmente em corpos celulares, como o ácido gama-aminobutírico (GABA) e glicina que, ao serem aplicados topicamente por meio de anéis plásticos sobre a região estudada (superfície ventral bulbar rostral), produziam acentuada queda da pressão arterial.

Foi também demonstrado que a aplicação unilateral de glicina causava uma queda muito maior de pressão arterial atingindo níveis considerados espinais agudos, ou seja, níveis de pressão arterial por volta de 60 mmHg (Guertzenstein e Silver, 1974). Com tais experimentos, foi possível localizar mais precisamente a região bulbar ventral responsável pela manutenção da pressão arterial. Novamente, a idéia de um centro vasomotor delimitado voltou a ser considerada.

A partir das publicações de Guertzenstein e colaboradores (1972, 1973, 1974, 1976, 1977, 1984 e 1986), diferentes grupos de pesquisa começaram a enfocar a participação do bulbo ventrolateral no controle cardiovascular, na tentativa de melhor compreender o papel desta região, não somente na

manutenção do tônus vasomotor simpático, mas também no que diz respeito ao seu papel no controle reflexo cardiovascular e ajustes cardiovasculares específicos (Dampney, 1994a, b). Até então, ou seja, em meados de 1970, os núcleos do trato solitário (NTS) localizados na região dorsal do bulbo eram conhecidos como o maior centro integrador cardiovascular, particularmente por receber as informações dos aferentes barorreceptores. Outra região considerada importante era a coluna intermédio-lateral (IML) da medula espinal, pois era sabido que esta região contém os neurônios efetores simpáticos pré-ganglionares. No entanto, o centro responsável pela conexão NTS-IML, ou seja, o centro vasomotor tinha localização indefinida (Chalmers e Pilowsky, 1991). Dessa forma, sobretudo os estudos de Guertzenstein e colaboradores foram fundamentais no sentido de delimitar um centro vasomotor simpático integrador localizado no bulbo ventral rostral e de fundamental importância para manutenção da homeostase cardiovascular.

Atualmente sabe-se que o bulbo participa no controle cardiovascular, gerando sinais que são continuamente modulados pelas informações aferentes cardiovasculares (Spyer, 1990a, b). Os nervos depressor aórtico e do seio carotídeo, cujas aferências têm acesso ao SNC através dos nervos vago e glossofaríngeo, respectivamente, são responsáveis pela condução das informações aferentes dos baro- e quimiorreceptores para o SNC, mais precisamente no bulbo, como parte integrante na regulação cardiovascular. Os corpos celulares destas fibras vagais e glossofaríngeas estão localizados nos

gânglios nodoso e petroso, respectivamente, tendo suas terminações no NTS (Palkovitz e Zárborsky, 1977).

**Centro de integração de aferências cardiovasculares: núcleos do trato solitário**

A primeira sinapse ou o sítio de terminação das fibras aferentes no NTS já foi investigado anatômica (Torvik, 1956; Cottle, 1964; Palkovits e Zárborsky, 1977) e eletrofisiologicamente (Fussey e cols., 1967; Jordan e Spyer, 1977; Jordan e Spyer, 1978), bem como a expressão da proteína Fos em neurônios do NTS, após a estimulação dos barorreceptores (Erickson e Millhorn, 1991; Weston e cols., 2003) em várias espécies.

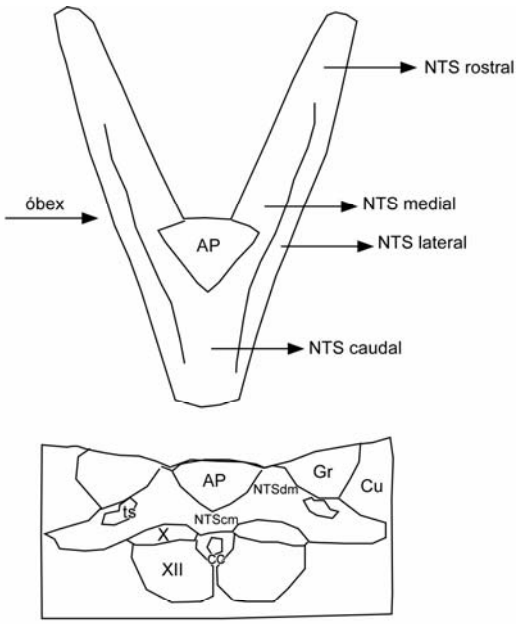


**Figura 1:** A) subdivisões do NTS em relação à proximidade com a área postrema. B) representação de um corte transversal do bulbo do rato, mostrando a localização do NTS em relação a outros núcleos, como a área postrema, núcleo grácil, núcleo cuneato, núcleo dorsal motor do vago, núcleo do hipoglosso e canal central. Abreviações: AP, área postrema; cc, canal central; Cu, núcleo cuneato; Gr, núcleo grácil; NTS, núcleos do trato solitário. Extraído e adaptado de Ter Horst e Streefland (1994).

O NTS é constituído por grupos heterogêneos de neurônios, que estão dispostos dorsalmente no bulbo e se estendem de forma rostrocaudal, como uma coluna bilateral, desde o nível do pólo caudal do núcleo motor do nervo facial até o óbex, onde as duas colunas se unem para formar uma única estrutura na linha média, que continua caudalmente até a parte caudal da decussação piramidal (Ciriello e cols, 1994; Ter Horst e Streefland, 1994) (Fig. 1).

Em relação ao seu aspecto antero-posterior, o NTS pode ser dividido em 3 porções, dada a sua proximidade com a área postrema (Cottle, 1964; Loewy, 1990): NTS rostral; NTS intermediário (medial e lateral) e NTS comissural (Fig. 1).

O NTS intermediário e comissural estão diretamente envolvidos no controle cardiovascular e respiratório, pois todas as projeções aferentes vagais e glossofaríngeas, que conduzem informações cardio-respiratórias, fazem sua primeira sinapse nessas duas porções do NTS.

Sabe-se que a porção intermediária do NTS constitui o principal sítio de entrada das aferências dos barorreceptores, utilizando o L-glutamato como principal neurotransmissor (Talman e cols., 1980; Weston e cols., 2003). Já a porção comissural do NTS constitui o principal sítio no SNC para o qual se projetam as aferências dos quimiorreceptores carotídeos (Chitravanshi e cols., 1993; Finley e Katz, 1992; Ciriello e cols., 1994). Curiosamente, a microinjeção de L-glutamato, no NTS intermediário, em animais não anestesiados promoveu resposta pressora (Machado e Bonagamba, 1992; Colombari e cols., 1994), diferentemente da resposta hipotensora produzida pela estimulação dos barorreceptores (Talman e cols., 1980; Ohta e Talman, 1994; Machado e Bonagamba, 1992). Como a resposta produzida pela injeção de L-glutamato no NTS intermediário é semelhante à resposta produzida pela ativação dos quimiorreceptores, uma possibilidade seria que o efeito da injeção de L-glutamato no NTS mimetizasse a ativação do quimiorreflexo (Haibara e cols., 1995). Em animais normotensos, a lesão do NTS comissural bloqueou a resposta pressora do L-glutamato injetado no NTS intermediário e a resposta pressora produzida

pela estimulação dos quimiorreceptores periféricos com KCN (Colombari e cols., 1996). Esses resultados levaram à sugestão de que o NTS comissural possui importante participação na ativação do sistema nervoso simpático.

A partir do NTS, as informações provenientes dos receptores periféricos podem ser distribuídas para diversas áreas do sistema nervoso, dentre as quais se destacam as áreas localizadas na região ventral do bulbo que controlam o tônus simpático sobre o sistema cardiovascular. Atualmente, pelo menos três regiões distintas localizadas na superfície ventrolateral bulbar são reconhecidas como de fundamental importância para a manutenção do tônus vasomotor simpático e pressão arterial: região rostroventrolateral (RVL), região caudoventrolateral (CVL) e, mais recentemente, a área pressora caudal (APC).

**Áreas bulbares envolvidas na integração cardiovascular: área rostroventrolateral e caudoventrolateral**

A região denominada de área rostroventrolateral (RVL) do bulbo é conhecida por conter os elementos para a geração e manutenção do tônus simpático vasomotor (Guertzenstein e Silver, 1974; Guyenet, 1990; Chalmers e Pilowsky, 1991; Morrison e Reis, 1991). Atualmente, existem duas hipóteses sobre a participação da região do RVL na manutenção do tônus simpático vasomotor. A primeira hipótese é baseada em estudos de registro intracelular dos neurônios do RVL *"in vitro"*, e estabelece que tais neurônios possuem atividade intrínseca do tipo marcapasso (Sun e cols., 1988a, b e c). A segunda hipótese sugere que a atividade dos neurônios do RVL depende de atividade sináptica excitatória, isto é,

seriam controlados por outras regiões do SNC que se projetam para o RVL, gerando por sua vez o tônus simpático (Barman e Gebber, 1987). Além de sua importante função na manutenção do tônus vasomotor, a região RVL também participa na interação de reflexos cardiovasculares (McAllen e cols., 1982). Embora as conexões barorreceptoras se efetuem com a área CVL, a integridade da área RVL é fundamental para o controle reflexo da pressão arterial exercido pelos barorreceptores e pelos quimiorreceptores, cujas fibras se projetam para SNC, inicialmente para região dorsal do bulbo (NTS) e, então, essas informações chegam até a área RVL, alterando, assim, o tônus simpático (Fig. 2).

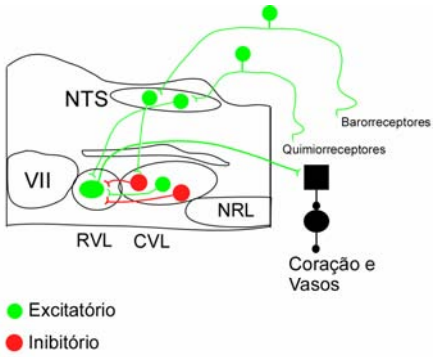


**Figura 2:** Representação esquemática do circuito neural, no bulbo, envolvido no baro- e quimiorreflexo, indicando as projeções aferentes desta via para o NTS. Pode-se também observar a integração do NTS com as regiões ventrais do bulbo na modulação das vias neurovegetativas eferentes cardiovasculares.

A outra região da porção ventral do bulbo é conhecida como área caudoventrolateral (CVL) e possui ação inibitória sobre a região do RVL e, portanto, sua atividade inibe o tônus simpático e pressão arterial (Guertzenstein, 1973; Cravo e cols., 1991). Ela está localizada caudalmente à região RVL e é tida atualmente como uma região tipicamente depressora. A estimulação desta região através da aplicação de drogas como nicotina, L-glutamato e leptazol produzem queda da pressão arterial (Bisset e cols., 1975 e Blessing e Reis, 1982), enquanto sua inibição produz efeitos opostos (Guertzenstein e Lopes, 1984).

Acredita-se, atualmente, que a área CVL interfere na regulação da pressão arterial, modulando a atividade da área RVL, uma vez que existem várias evidências obtidas em estudos anatômicos e eletrofisiológicos, demonstrando que esta área envia projeções curtas para a área rostral (Granata e cols., 1985). Estudos em diferentes espécies animais têm demonstrado, também, que esta área não envia projeções diretas para os neurônios pré-ganglionares simpáticos e, portanto, a modulação da atividade simpática exercida por esta região se dá via RVL. A área CVL recebe importantes projeções excitatórias do NTS, indicando que esta região participa no controle reflexo da pressão arterial (Fig. 2).

**Nova região bulbar envolvida na integração cardiovascular: área pressora caudal**

Em 1986, demonstrou-se a existência de uma terceira área situada na face ventrolateral do bulbo (Feldberg e Guertzenstein, 1986). Aparentemente, esta área, denominada de área pressora caudal (APC), interfere na regulação da pressão arterial, modulando a atividade dos neurônios das áreas RVL e CVL, uma vez que a integridade funcional destas duas áreas é fundamental para que as respostas cardiovasculares decorrentes da estimulação ou inibição da APC ocorram plenamente (Campos e cols., 1995). Feldberg e Guertzenstein (1986) que foram os primeiros a delimitar e definir as regiões RVL e CVL, também foram os primeiros a descrever esta região situada caudalmente à região CVL, na transição bulbo-espinal, em gatos. Neste trabalho, demonstrou-se que esta região possuía atividade semelhante à região RVL, ou seja, quando estimulada produzia aumento

de pressão arterial e quando inibida, queda. Um achado interessante foi que, aparentemente, essa área não exercia importante papel no controle cardiovascular em animais anestesiados com dose de 600 mg/kg (“cirurgicamente”) de cloralose. No entanto, em animais anestesiados com o dobro dessa dose habitual de cloralose, a manutenção da pressão arterial passaria a depender não somente da região RVL, mas também dessa região pressora situada mais caudalmente (Campos e cols., 1994; Campos, 2001; Campos e cols., 2008).

Informações que reforçam a hipótese proposta por Feldberg e Guertzenstein foram obtidas por Andreatta & Campos (*apud*, Campos e Guertzenstein, 1989) também em gatos profundamente anestesiados. Nesses animais, pode-se observar que a aplicação tópica de leptazol na região RVL produzia aumento de pressão arterial mesmo durante a hipotensão arterial produzida por inibição da área pressora caudal pela aplicação prévia de pentobarbital sódico. Por outro lado, quando se invertia a seqüência, a hipertensão produzida pela aplicação de leptazol na área pressora caudal era abolida quando o pentobarbital sódico era previamente aplicado na região RVL. Os resultados sugerem que esta área mais caudal seria importante para manutenção da pressão arterial, ao menos em animais profundamente anestesiados, no entanto, suas ações seriam dependentes da integridade da região RVL.

Gordon e McCann (1988) foram os primeiros a estudar em ratos esta região localizada mais caudalmente na superfície ventral do bulbo. Neste estudo, os animais foram anestesiados com doses consideradas “cirúrgicas” de uretana e, nesta condição, respostas pressoras eram obtidas quando microinjeções de L-glutamato eram realizadas caudalmente à região CVL. Demonstraram, ainda, que

esse efeito era abolido após o bloqueio ganglionar, mostrando que a resposta obtida era conseqüente ao aumento do tônus simpático vasomotor.

Diferente do observado em gatos, Gordon e McCann não observaram respostas de pressão arterial quando a região mais caudal era inibida pela microinjeção de GABA. Na ocasião, sugeriram que essa área teria ação somente fásica e não tônica sobre o controle da pressão arterial.

Entretanto, em trabalhos realizados por Possas e colaboradores (1994), pode-se observar que a integridade da APC é fundamental para manutenção dos níveis considerados normais de pressão arterial em ratos anestesiados ou descerebrados. Injeções uni ou bilaterais de glicina ou GABA na APC produziam queda da pressão arterial semelhantes às observadas durante inibição da região RVL.

Alguns mecanismos pelos quais a APC participa na manutenção da pressão arterial já foram estudados. Em 1994, Campos e colaboradores mostraram que as ações da APC dependem da região RVL, pois a inibição desta bloqueou a resposta pressora à estimulação da APC. Aparentemente, a APC produz seus efeitos via região CVL que, por sua vez, atuaria sobre a região RVL por mecanismos já bem evidenciados (Gordon, 1987; Guyenet e cols., 1987; Blessing, 1988). Não se pode também descartar a possível atuação direta excitatória de axônios provenientes da APC sobre a região RVL.

Em 2000, Natarajan e Morrison sugeriram que, além de neurônios inibitórios, a região CVL também possuía neurônios excitatórios que se projetam para a região RVL. Dessa forma, quando se estimula a APC, observa-se aumento de pressão arterial por estimulação desses neurônios excitatórios e não por

inibição dos neurônios inibitórios da região CVL. Por outro lado, Horiuchi e Dampney (2002) sugeriram a existência de interneurônio inibitório entre APC e RVL, além da via clássica (NTS-CVL-RVL) já conhecida. Dessa forma, a APC inibiria o CVL e esse interneurônio inibitório, deixando o RVL livre para atuar, dando origem à resposta pressora.

Nesse hipotético mecanismo, os neurônios da APC inibem tonicamente a atividade de interneurônios inibitórios na região CVL. Desse modo, quando a APC é inibida, a região CVL é liberada, produzindo-se maior inibição da região RVL e conseqüente queda da pressão arterial. A estimulação da APC, por outro lado, produziria aumento de pressão arterial por um mecanismo inverso, ou seja, inibição da região CVL. Ainda podemos supor que estes interneurônios ao invés de inibitórios sejam excitatórios; nesse caso, os interneurônios estariam sendo continuamente inibidos pela APC. A inibição da APC, portanto, reduziria essa inibição e dessa forma, os interneurônios estimulariam a região CVL, causando queda da pressão arterial. O mesmo raciocínio pode ser aplicado na condição de estimulação da APC.

Outro mecanismo possível demonstrado por Campos e colaboradores sugere que a APC tenha projeções inibitórias, provavelmente GABAérgicas, que continuamente inibiriam as projeções glutamatérgicas provenientes do NTS, as quais trazem informações dos receptores periféricos envolvidos na regulação cardiovascular. Nesse caso, quando a APC é inibida, as projeções do NTS são liberadas, produzindo excitação da região CVL e, conseqüentemente, queda da pressão arterial. A estimulação da APC produziria efeitos opostos, ou seja, maior inibição das projeções do NTS e, conseqüentemente, aumento de pressão arterial.

Parece ainda controverso o mecanismo pelo qual a APC estaria atuando no que diz respeito às respostas cardiovasculares. A literatura apresenta várias vias neurais (em especial as áreas ventrais do bulbo) que poderiam justificar as respostas cardiovasculares produzidas pela estimulação da APC (Campos e cols., 1994; Possas e cols., 1994; Natarajan e Morrison, 2000; Horiuchi e Dampney, 2002). Será que apenas as áreas ventrais do bulbo estariam envolvidas nas respostas de estimulação da APC? A literatura apresenta apenas uma evidência de que o NTS se conecta, anatomicamente, com a APC (Sun e Panneton, 2005). Logo, fica imprescindível estudar funcionalmente a possível interação entre o NTS e APC em relação ao controle cardiovascular. No presente estudo, procuramos centralizar nossos objetivos no envolvimento do NTS (em especial as subrregiões intermediária e comissural) nas respostas de estimulação da APC. Um outro aspecto importante abordado no presente estudo foi avaliar o envolvimento da APC nos reflexos cardiovasculares (baro e quimiorreflexo). Esse tópico abordado no presente estudo é de extrema importância no campo da fisiologia cardiovascular, uma vez que a APC está localizada na superfície ventral do bulbo, apresenta envolvimento cardiovascular e conecta-se com o NTS.

# OBJETIVOS

Logo, resumindo os estudos discutidos na introdução, temos que:

O NTS apresenta participação fundamental na integração das respostas cardiovasculares e a APC é uma área que possui atividade semelhante à região RVL.

Diante disso, como os mecanismos propostos acima são hipotéticos, na tentativa de elucidar ainda mais a interação da APC com outras regiões do SNC, em especial a região bulbar, esse estudo teve por finalidade investigar a participação do NTS nas respostas produzidas pela estimulação ou inibição da APC.

Dessa forma, os objetivos principais desse estudo foram investigar se:

a) As respostas pressoras mediadas pela APC dependem da integridade do NTS comissural (NTScom) ou do NTS intermediário (NTS int).
b) As respostas de estimulação do NTScom ou NTS int depedem da integridade da APC.
c) As vias ativadas pelo quimiorreflexo dependem da integridade da APC.
d) A ativação do quimiorreflexo promove a ativação de neurônios localizados nas APC.

# MATERIAIS E MÉTODOS

## 1- Animais

Foram utilizados ratos Holtzman ou Sprague-Dawley adultos, com peso variando entre 280 e 350 gramas, procedentes do Biotério Central da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) - Escola Paulista de Medicina ou do Biotério Central da Universidade da Virginia/EUA. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais com acesso livre a água e ração. Todos os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de São Paulo e da Universidade da Virginia/EUA (Processos: CEP 0133/05 e HL 74011 e HL 28785).

## 2- Procedimentos cirúrgicos e anestesia

Os animais foram inicialmente anestesiados com halotana 5% em 100% de oxigênio. Os animais foram, posteriormente, traqueostomizados e colocados em ventilação artificial com 1,4 – 1,5% de halotana em 100% de oxigênio para continuação dos procedimentos cirúrgicos. Todos os animais foram sujeitos aos seguintes procedimentos cirúrgicos:

a) canulação da artéria e veia femoral para registro de pressão arterial media (PAM) e frequência cardíaca (FC) e administração de drogas.

b) colocados em um aparelho estereotáxico (modelo Kopf 900); remoção do osso occipital para inserção de uma pipeta de vidro para injeção de drogas.

Em alguns animais, houve a realização dos seguintes procedimentos experimentais:

a) localização e exposição do nervo frênico via posição dorsolateral (Takakura e cols., 2006; Moreira e cols., 2006).

b) alguns animais foram vagotomizados bilateralmente a fim de prevenir uma influência da ventilação na atividade do nervo frênico.

c) localização e exposição do nervo esplâncnico (Schreihofer e Guyenet, 2000; Moreira e cols., 2006).

Após a finalização dos procedimentos cirúrgicos, a concentração do anestésico halotana foi substituída pelo anestésico endovenoso uretana (1,2 – 1,4 g/kg). Todos os animais foram ventilados com 100% de oxigênio durante todo o período experimental. Os animais receberam uma sonda retal para monitorização da temperatura corpórea e sua temperatura foi mantida em $37^{o}$ C, utilizando-se um colchão com resistência interna para aquecimento. O índice de $CO_2$-expirado foi monitorado durante todo o experimento por meio de um capnômetro (Columbus Instruments, Ohio, USA). O nível da anestesia foi sempre monitorado, testando-se a ausência de efeitos no reflexo de retirada, ausência de mudanças na PAM e/ou na atividade do nervo frênico após o pinçamento da pata do animal. Satisfeito esses critérios, o relaxante muscular (pancurônio) foi administrado endovenosamente com uma dose inicial de 1 mg/kg.

Antes de iniciar os experimentos, a ventilação foi ajustada para níveis de $CO_2$ expirado em 4% (valores basais) (60 a 80 ciclos/s; volume de 1 a 1,2 ml/100 g de rato). Essas condições foram selecionadas porque 4% de $CO_2$ expirado está

abaixo do limiar de disparo do nervo frênico nas nossas condições experimentais (Moreira e cols., 2007).

A estimulação dos quimiorreceptores periféricos foi realizada com a injeção endovenosa de cianeto de sódio (NaCN) (50 μg/kg). Evidências de que a injeção de NaCN promove a ativação dos neurônios bulbares via quimiorreceptores carotídeos foi demonstrada por meio da desnervação desses receptores, eliminando os efeitos excitatórios na atividade do nervo frênico e esplâncnico (Franchini e Krieger, 1993; Takakura e cols., 2006; Moreira e cols., 2006).

**3- Lesão eletrolítica do NTS comissural**

O grupo de animais que tiveram a lesão do NTS comissural medial (NTScom) foram anestesiados com uretana (1,2 g/kg de peso corporal, i.v.) e adaptados a um aparelho estereotáxico Kopf (modelo 900). Os músculos do pescoço foram descolados do osso occipital e foi realizada uma incisão longitudinal na parte média desses músculos. O osso occipital foi parcialmente removido com auxílio de um osteóstomo de forma a se obter uma boa exposição da superfície do tronco cerebral. Após incisão da dura-máter e aracnóide, um eletrodo de tungstênio de 0,2 mm de espessura, isolado em toda a sua extensão, exceto 0,5 mm da extremidade, foi introduzido no cérebro nas posições 0,0 e 0,5 mm caudal ao calamus scriptorius, na linha média e numa profundidade de 0,5 mm abaixo da superfície dorsal do tronco cerebral. A lesão foi feita pela passagem de uma corrente elétrica de 1 mA durante 10 segundos. Animais controles foram submetidos à lesão fictícia do NTScom, ou seja, foram submetidos aos mesmos

procedimentos cirúrgicos, exceto que não houve passagem de corrente elétrica, conforme descrito em Colombari e colaboradores (1996).

**4- Registro da pressão arterial e da freqüência cardíaca**

Para o registro das variáveis cardiovasculares, no dia do experimento, os animais foram anestesiados, inicialmente, com halotana 5% em 100% $O_2$ e submetidos à canulação da artéria e veia femoral com tubo de polietileno (PE-10 conectado a um PE-50) para registro da pressão arterial média (PAM), freqüência cardíaca (FC) e para a administração do anestésico intravenoso uretana (1,2 g/kg de peso corporal, i.v.). A cânula da artéria femoral foi conectada a um transdutor de pressão (Stathan Instruments mod. P23Db) acoplado a um pré-amplificador (modelo ETH-200 Bridge Bio Amplifier) e ao sistema de registro computadorizado Powerlab (modelo Powerlab 8SP ADInstruments) de 8 canais. Foram registradas, simultaneamente, a pressão arterial pulsátil (PAP), PAM e FC.

O animal também recebeu uma sonda retal para monitorização da temperatura corpórea. Sua temperatura foi mantida em $37^{o}$ C, utilizando-se um colchão com resistência interna para aquecimento.

**5- Registro da atividade simpática eferente e do nervo frênico**

Por meio de um modelo de abertura retroperitoneal, o nervo esplâncnico esquerdo foi exposto na saída do gânglio supra-renal. A atividade simpática pós-ganglionar do nervo esplâncnico foi registrada utilizando-se um eletrodo bipolar

em forma de gancho em configuração monopolar. A atividade simpática do nervo esplâncnico foi amplificada em 20K e filtrada de 100 a 3000 Hz.

Por meio de um modelo de abertura dorsolateral, o nervo frênico esquerdo foi exposto e isolado da divisão ventral do quinto plexo cervical. O nervo foi cortado distalmente e colocado num eletrodo bipolar em forma de gancho. A atividade do nervo frênico foi amplificada em 20K e filtrada de 100 a 3000 Hz.

O nervo e o eletrodo de registro foram cobertos com uma pasta de moldagem dental (polyvinylsiloxane; Darby Spencer Mead Dental Supply).

O eletrodo bipolar em que os nervos foram colocados foi conectado a um conversor analógico-digital (modelo CED-1401) da Cambridge Electronics Design (CED, Cambridge, UK) de 8 canais. Este aparelho possui filtro passa-baixo, ligação AC-DC (corrente direta-alternada), filtro de corte, permite variação do ganho e possibilita correção da linha de base. A partir deste aparelho, o sinal foi copiado para um sistema de aquisição de dados versão 5 do Spike 2 software (CED). Os resultados foram gravados em DVD para posterior análise dos resultados. O software Spyke2 CED foi utilizado também para aquisição do histograma da atividade do nervo frênico e do nervo esplâncnico.

**6- Injeção de drogas**

As injeções de drogas no NTS (região comissural – NTScom ou intermediária – NTS int) e na área pressora caudal (APC) foram realizadas sob pressão com nitrogênio, utilizando-se pipetas de vidro (diâmetro interno 0,5 mm, Sutter Instrument Co, CA) acopladas ao aparelho PicoSpritzer II (General Valve

Corporation, NJ). O volume das injeções de drogas na região do NTS (NTS int e NTScom) foram de 60 nl e na região da APC foram de 100 nl.

As coordenadas estereotáxicas utilizadas para o NTScom foram: 0,5 mm caudal, 0,0 mm lateral e 0,3 a 0,5 mm ventral em relação ao *calamus scriptorius.* Para a região do NTS int, as coordenadas foram as seguintes: 0,5 mm rostral, 0,5 mm lateral e 0,5 mm ventral em relação ao *calamus scriptorius.* As coordenadas para a APC foram: 1,0 mm caudal, ±1,5 mm lateral e 2,0 mm ventral em relação ao *calamus scriptorius.*

**7- Drogas utilizadas**

Foram utilizadas as seguintes drogas:

L-glutamato (Sigma Chemical, St. Louis, MO): aminoácido excitatório; 1 mM injetado unilateralmente no NTS int ou no NTScom (volume de 60 nl). Para as injeções na APC, L-glutamato foi injetado unilateralmente ( 1mM – 100nl).

Hidrobrometo de muscimol (RBI - Sigma, USA): agonista GABA-A; 2 mM injetado bilateralmente no NTS int ou unilateralmente no NTScom (volume 60 nl) . Para as injeções na APC, muscimol foi injetado bilateralmente (2 mM - 100 nl).

Hexametônio (Sigma Chemical, St. Louis, MO): bloqueador ganglionar; 10 mg/kg, injetado endovenosamente.

Cianeto de sódio (Sigma Chemical, St. Louis, MO): 50 μg/kg, injetado endovenosamente.

Nitroprussiato de sódio (Sigma Chemical, St. Louis, MO): 30 μg/kg, injetado endovenosamente.

As concentrações das drogas utilizadas no presente estudo foram seleciondas baseando-se em trabalhos da literatura que mostram que as drogas possuem efeitos em áreas bulbares envolvidas no controle cardiovascular (Colombari e cols., 1994; Possas e cols., 2004; Sapru, 1996; Moreira e cols., 2005; 2006; 2007; Takakura e cols., 2006).

**8- Ativação dos quimiorreceptores periféricos**

Os animais foram expostos a situações de hipóxia (8% $O_2$, n = 5) ou normóxia (ar ambiente, n = 4) durante um perído de 3 horas em uma caixa de acrílico. Os animais foram submetidos aos testes de hipóxia aos pares, isto é, os experimentos eram sempre realizados com um animal submetido à hipóxia e o outro à normóxia. Após o período de 3 horas, os animais foram sacrificados e imediatamente perfundidos. A imunorretividade para a proteína Fos foi utilizada para identificação dos neurônios ativados por hipóxia. Os neurônios glutamatérgicos ou gabaérgicos foram definidos devido à expressão, via hibridização in situ, de VGLUT2 mRNA ou GAD67 mRNA, respectivamente.

**9- Histologia**

Ao término dos experimentos, os animais foram profundamente anestesiados com pentobarbital de sódio (60 mg/kg de peso corporal) e perfundidos através do ventrículo cardíaco esquerdo com PBS (pH 7,4) seguido de paraformaldeído (4% em 0,1 M de fosfato, pH 7,4). Os cérebros foram retirados e guardados nesse fixador por 24 horas a 4℃. Os cé rebros foram cortados em microtómo numa espessura de 50 μm e guardados em solução (crioprotetora 20%

de glicerol, 30% de etileno glicol em 50 mM de fostato, pH 7.4) que preserva as qualidades do tecido cerebral para posterior análise (Schreihofer and Guyenet 1997).

Todos os procedimentos histológicos foram realizados em secções dos cortes cerebrais. A imunorreatividade para a proteína Fos foi detectada utilizando-se um anticorpo primáro de coelho anti-c-Fos (sc-52, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, 1:1500) seguido pelo anticorpo secundário de cabra anti-coelho conjugado com Cy3 (Jackson; 1:200).

GAD67 mRNA foi detectado usando-se um marcador 3.2 kb digoxigenina cRNA exatamente como descrito anteriormente (Stornetta e Guyenet, 1999; Takakura e cols., 2006). VGLUT2 mRNA foi detectado usando-se um marcador 3.4 kb digoxigenina cRNA, também como descrito previamente (Stornetta e cols., 2003). Digoxigenina foi revelada com um anticorpo poli-clonal de ovelha anti-digoxigenina conjugado com fosfatase alcalina (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN) e a fosfatase alcalina foi reagida com nitro-azul tetrazolino (NBT) e 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato, sal de 4-toluidina (BCIP). A ausência de marcação no núcleos motores do facial, do hipoglosso e do núcleo ambíguo mostraram a especificidade dos nossos marcadores (Stornetta e cols., 2002). O processo de hibridização foi sempre realizado antes da realização dos protocolos de imunohistoqímica.

Finalmente, os cortes cerebrais foram montados em sequência rostro-caudal em lâminas. Foram desidratados com álcool e xilol e posteriormente cobertos com Krystalon (EMD Chemicals Inc, NJ).

Apenas os animais com injeções ou lesões nas áreas pré-determinadas tiveram os resultados analisados. Toda a nomenclatura anatômica foi baseada no atlas de anatomia cerebral de rato de Paxinos e Watson (1988).

**10- Análise dos resultados**

A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa Sigma Stat 3.0 (Jandel Corporation, Point Richmond**,** CA). Os resultados dos animais com injeções localizadas corretamente nas áreas pré-determinadas foram tabelados e representados em gráficos como média ± erro padrão da média. Teste de Student-Newman-Keuls precedido de análise de variância foi utilizado para comparação entre as médias. O índice de significância foi fixado em $p < 0,05$.

# EXPERIMENTOS REALIZADOS

## 1- Efeitos da lesão eletrolítica do NTS comissural nas respostas de PAM e FC após a estimulação da APC

Em ratos anestesiados com uretana (1,2 g/kg de peso corporal, i.v.) foi registrada a PAM e FC durante 80 minutos começando-se 20 minutos após a conexão da cânula de registro arterial ao transdutor de pressão. Valores controles foram registrados durante 10 minutos. L-glutamato (1 mM - 100 nl) foi injetado unilateralmente na APC antes e 10, 30 e 60 minutos após a lesão eletrolítica no NTScom. Quatro grupos de animais foram utilizados para investigar os efeitos cardiovasculares da combinação da lesão do NTScom e L-glutamato na APC:

- Lesão fictícia do NTScom seguido de salina na APC (grupo controle);
- Lesão fictícia do NTScom seguido de L-glutamato na APC;
- Lesão eletrolítica do NTScom seguido de salina na APC;
- Lesão eletrolítica do NTScom seguido de L-glutamato na APC.

## 2- Efeitos da inibição do NTS comissural nas respostas de PAM e FC após a estimulação da APC

Em ratos anestesiados com uretana (1,2 g/kg de peso corporal, i.v.) foi registrada a PAM e FC durante 80 minutos começando-se 20 minutos após a conexão da cânula de registro arterial ao transdutor de pressão. Valores controles foram registrados durante 10 minutos. L-glutamato (1 mM - 100 nl) foi injetado unilateralmente na APC antes e 10, 30 e 60 minutos após a inibição GABAérgica com o agonista de receptores GABA-A muscimol (2 mM - 60 nl) no NTScom.

Quatro grupos de animais foram utilizados para investigar os efeitos cardiovasculares da combinação de muscimol injetado no NTScom e L-glutamato na APC:

- Salina no NTScom seguido de salina na APC (grupo controle);
- Salina no NTScom seguido de L-glutamato na APC;
- Muscimol no NTScom seguido de salina na APC;
- Muscimol no NTScom seguido de L-glutamato na APC.

**3- Efeitos da inibição do NTS intermediário nas respostas de PAM e FC após a estimulação da APC**

Em ratos anestesiados com uretana (1,2 g/kg de peso corporal, i.v.) foi registrada a PAM e FC durante 80 minutos, começando-se 20 minutos após a conexão da cânula de registro arterial ao transdutor de pressão. Valores controles foram registrados durante 10 minutos. L-glutamato (1 mM - 100 nl) foi injetado unilateralmente na APC antes e 10, 30 e 60 minutos após a inibição GABAérgica com o agonista de receptores GABA-A muscimol (2 mM - 60 nl) no NTS int. Quatro grupos de animais foram utilizados para investigar os efeitos cardiovasculares da combinação de muscimol injetado no NTS int e L-glutamato na APC:

- Salina no NTS int seguido de salina na APC (grupo controle);
- Salina no NTS int seguido de L-glutamato na APC;
- Muscimol no NTS int seguido de salina na APC;
- Muscimol no NTS int seguido de L-glutamato na APC.

**4- Efeitos da estimulação do NTS comissural nas respostas de PAM e FC após a inibição da APC**

Em ratos anestesiados com uretana (1,2 g/kg de peso corporal, i.v.) foi registrada a PAM e FC durante 80 minutos, começando-se 20 minutos após a conexão da cânula de registro arterial ao transdutor de pressão. Valores controles foram registrados durante 10 minutos. L-glutamato (1 mM - 60 nl) foi injetado unilateralmente no NTScom antes e 10, 30 e 60 minutos após a inibição GABAérgica com o agonista de receptores GABA-A muscimol (2 mM - 100 nl) na APC. Quatro grupos de animais foram utilizados para investigar os efeitos cardiovasculares da combinação de muscimol injetado na APC e L-glutamato no NTScom:

- Salina na APC seguido de salina no NTScom (grupo controle);
- Salina na APC seguido de L-glutamato no NTScom;
- Muscimol na APC seguido de salina no NTScom;
- Muscimol na APC seguido de L-glutamato no NTScom.

**5- Efeitos da estimulação do NTS intermediário nas respostas de PAM e FC após a inibição da APC**

Em ratos anestesiados com uretana (1,2 g/kg de peso corporal, i.v.) foi registrada a PAM e FC durante 80 minutos, começando-se 20 minutos após a conexão da cânula de registro arterial ao transdutor de pressão. Valores controles foram registrados durante 10 minutos. L-glutamato (1 mM - 60 nl) foi injetado unilateralmente no NTS int antes e 10, 30 e 60 minutos após a inibição GABAérgica com o agonista de receptores GABA-A muscimol (2 mM - 100 nl) na

APC. Quatro grupos de animais foram utilizados para investigar os efeitos cardiovasculares da combinação de muscimol injetado na APC e L-glutamato no NTS int:

- Salina na APC seguido de salina no NTS int (grupo controle);
- Salina na APC seguido de L-glutamato no NTS int;
- Muscimol na APC seguido de salina no NTS int;
- Muscimol na APC seguido de L-glutamato no NTS int.

**6- Efeitos da inibição da APC nas respostas de ativação do baro e quimiorreflexo**

Em ratos anestesiados com uretana (1,2 g/kg de peso corporal, i.v.) foi registrada a PAM, FC, atividade simpática eferente do nervo esplâncnico e a atividade do nervo frênico. Após um registro basal de 10 minutos, o barorreflexo (injeções endovenosas de fenilefrina (5 μg/kg) e nitroprussiato de sódio (30 μg/kg)) e o quimiorreflexo (injeções endovenosas de cianeto de sódio (50 μg/kg) ou breves períodos de hipóxia (8%$O_2$ - 15 s)) foram testados. Muscimol (2 mM - 100 nl) foi injetado bilateralmente na APC e os reflexos foram testados 10, 30 e 60 minutos após a inibição da APC.

A curva do barorreflexo relacionando-se a PAM e a atividade simpática do nervo esplâncncico foi construída individualmente para cada animal. A atividade simpática basal foi estipulada sendo 100% e a atividade simpática após a injeção do bloqueador ganglionar hexametônio (10 mg/kg, iv) foi estipulado como o valor

mínimo (zero). Curvas sigmóides de Boltzman foram construídas utilizando-se a equação:

Atividade simpática = (A1  A2)/{1 + exp [A3 x (MAP  A4)]} + A2, onde A1 foi definido como sendo o platô superior da curva, A2 como sendo o platô inferior da curva, A3 descreve a distribuição máxima de ganho na curva e A4 é definido como PAM50 (ponto no meio da curva). O ganho máximo (Gmax) foi calculado utilizando-se a fórmula, Gmax = A3 x (A1  A2)/4.

**7- Hipóxia promove a ativação de neurônios glutamatérgicos no NTS e na APC**

Os ratos, não anestesiados, foram expostos a situações de hipóxia (8% $O_2$, n = 5) ou normóxia (ar ambiente, n = 4) durante um perído de 3 horas em uma caixa de acrílico. Após o período de 3 horas, os animais foram sacrificados e imediatamente perfundidos.  A imunorretividade para a proteína Fos foi utilizada para identificação dos neurônios ativados por hipóxia. Os neurônios glutamatérgicos ou gabaérgicos foram definidos devido à expressão, via hibridização in situ, de VGLUT2 mRNA ou GAD67 mRNA, respectivamente. Uma série de cortes coronais de cérebros (30 μm) foram selecionados e realizados os protocolos imuno-histoquímicos para detecção simultânea de imunorreatividade para a proteína Fos e VGLUT2 mRNA.

# RESULTADOS

## 1- Análise histológica

### 1.1- Lesão do núcleo do trato solitário comissural

Lesões eletrolíticas na região commissural do NTS (NTScom) estão localizadas na linha média, acima do canal central e extendem-se do óbex até aproximadamente 1 mm caudal ao óbex (Fig 3A). As lesões destroem o NTScom, mas não destroem a área postrema ou regiões laterais do NTS. A extensão da lesão foi similar às realizadas em estudos anteriores (Colombari e cols., 1996, Sato e cols., 2001; 2003).

### 1.2- Injeções nos núcleos do trato solitário:

***Núcleo do trato solitário comissural***

As injeções no NTS comissural (NTScom) foram realizadas na linha média, caudais à área postrema, região conhecida por conter grande concentração de neurônios de segunda ordem que recebem informações dos quimiorreceptores periféricos (Chitravanshi e Sapru, 1995; Colombari e cols., 1996; Koshiya e Guyenet, 1996; Takakura e cols., 2006, Accorsi Mendonça e cols., 2009) (Figs. 3B e 3E). O corante (Azul de Evans) utilizado para marcar os sítios de injeção espalhou, aproximadamente, 260 μm no sentido rostro-caudal a partir do centro da injeção.

***Núcleo do trato solitário intermediário***

A injeções uni ou bilaterais no NTS intermediário (NTS int) foram realizadas medialmente ao trato solitário na região de área postrema (Figs. 3C e 3F). O corante cobriu a região intermediária do NTS, mais precisamente a região dorso medial. Essa região contém os neurônios barossensíveis de segunda ordem (Chan e Sawchenko, 1998; Weston e cols., 2003), que a injeção de muscimol promoveu a inibição e, consequentemente, aumento de pressão arterial. O corante utilizado para marcar os sítios de injeção espalhou, aproximadamente, 240 μm no sentido rostro-caudal a partir do centro da injeção.

**1.3- Injeções na área pressora caudal:**

As injeções uni ou bilaterais na APC localizaram-se lateralmente às pirâmides e na porção caudal do núcleo reticular lateral do bulbo ventrolateral, como já descrito anteriormente (Possas e cols., 1994; Campos e cols., 1994; Natarajan e Morrison, 2000; Takakura e cols., 2007a) (Figs. 4A, 4B e 4C). Da mesma maneira, o corante utilizado para marcar os sítios de injeção espalhou, aproximadamente, 280 μm no sentido rostro-caudal a partir do centro da injeção.

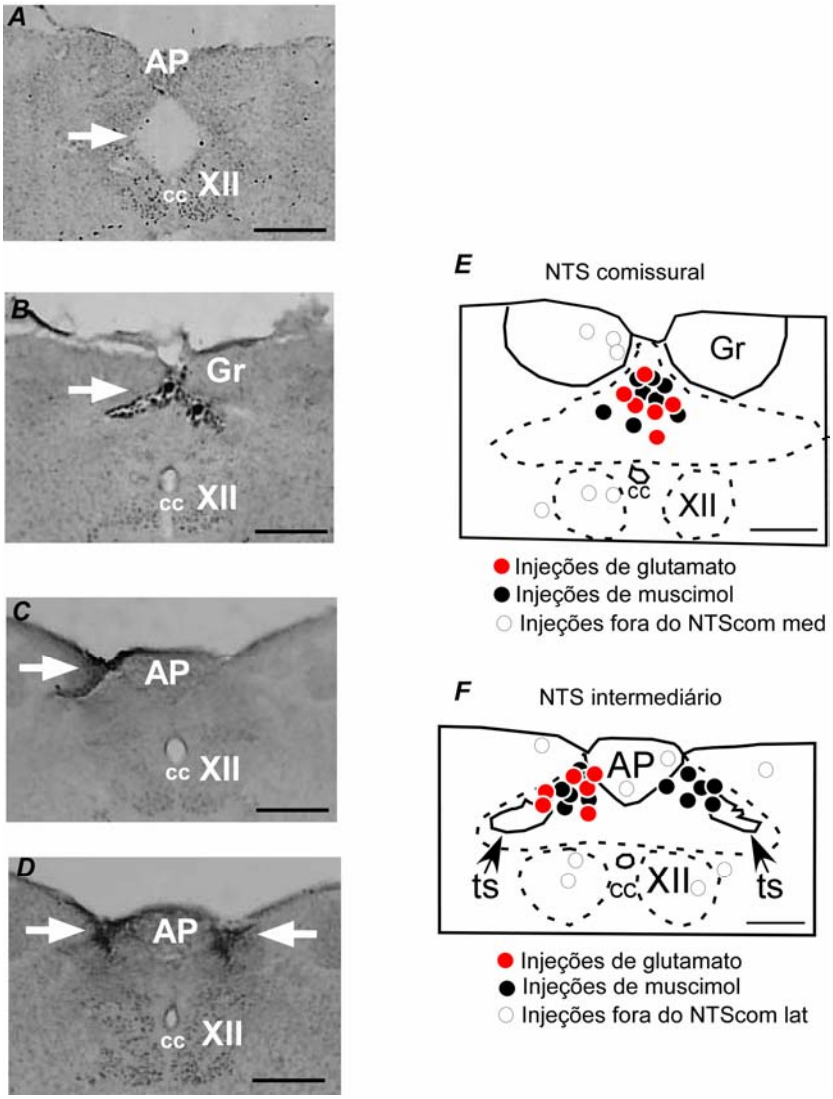


**Figura 3:** A) corte transversal do cérebro de um rato, mostrando o local típico da lesão eletrolítica no NTS comissural (NTScom) (seta). B) corte transversal do cérebro de um rato, mostrando o local típico da injeção unilateral no NTScom (seta). C) corte transversal do cérebro de um rato, mostrando o local típico da injeção unilateral no NTS intermediário (NTS int) (seta). D) corte transversal do cérebro de um rato, mostrando o local típico das injeções bilaterais no NTS int (setas). E) esquema representativo do local das injeções de L-glutamato (círculos vermelhos), injeções de muscimol (círculos pretos) e injeções localizadas fora do NTScom (círculos brancos). F) esquema representativo do local das injeções de L-glutamato (círculos vermelhos), injeções de muscimol (círculos pretos) e injeções localizadas fora do NTS int (círculos brancos). AP, área postrema; cc, canal central; Gr, núcleo gracilis; XII, núcleo do hipoglosso. Escala para as figuras A, B, C e D = 1 mm; Escala para as figuras E e F = 0,4 mm.

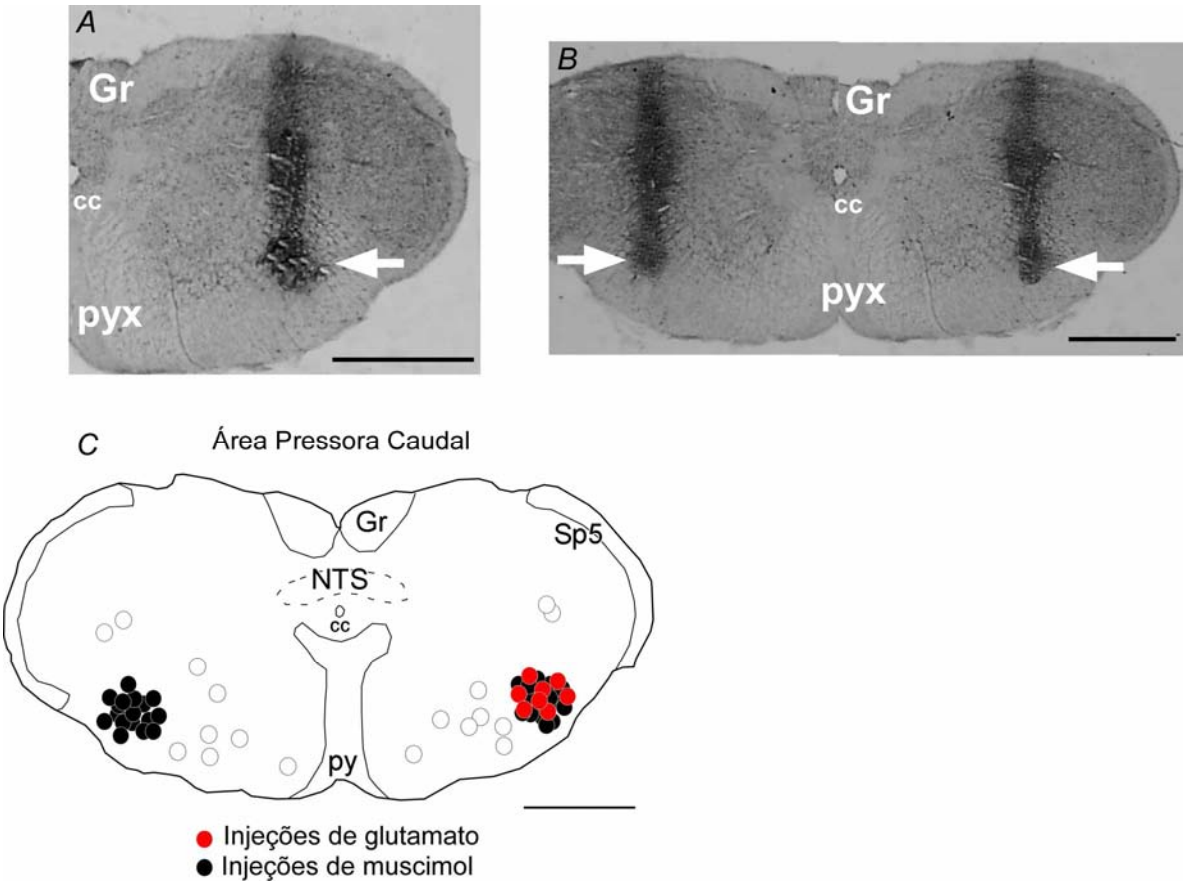


**Figura 4:** A) corte transversal do cérebro de um rato, mostrando o local típico da da injeção unilateral na área pressora caudal (APC) (seta). B) corte transversal do cérebro de um rato, mostrando o local típico das injeções bilaterais na APC (setas). C) esquema representativo do local das injeções de L-glutamato (círculos vermelhos), injeções de muscimol (círculos pretos) e injeções localizadas fora da APC (círculos brancos). cc, canal central; Gr, núcleo gracilis; pyx, decussão piramidal. Escala = 1 mm.

**2- Efeitos da lesão eletrolítica do NTS comissural nas respostas de PAM e FC após a estimulação da APC**

Os níveis basais de PAM e FC foram semelhantes em todos os 4 grupos de animais estudados ([F(3, 37) = 7,215; p>0,05] e [F(3, 37) = 9,851; p>0,05], respectivamente) (Tabela 1).

A lesão fictícia do NTScom seguida da injeção unilateral do aminoácido excitatório L-glutamato (1 mM - 100 nl) na APC produziu resposta pressora (Δ = +28 ± 3 mmHg, vs. controle: Δ = +2 ± 2 mmHg, p<0,05) e taquicárdica (Δ = +20 ± 1 bpm, vs. controle: Δ = +3 ± 3 bpm, p<0,05) (Figs. 5A, 5B e 5C). As respostas pressora e taquicárdica promovidas pela injeção unilateral de L-glutamato na APC foram abolidas 10 (Δ = +5 ± 7 mmHg e □ = +4 ± 3 bpm, respectivamente), 30 (Δ = +7 ± 3 mmHg e Δ = +6 ± 3 bpm, respectivamente) e 60 minutos (Δ = +11 ± 3 mmHg e Δ = +5 ± 1 bpm, respectivamente) após a lesão eletrolítica do NTScom (Figs. 5A, 5B e 5C). Somente a lesão eletrolítica do NTScom, seguida da injeção unilateral de salina na APC não promoveu alterações na PAM e FC basais (Δ = +3 ± 5 mmHg e Δ = +4 ± 6 bpm, respectivamente, p>0,05) (Figs. 5A, 5B e 5C).

**Tabela 1:** PAM e FC basais nos grupos de ratos tratados com L-glutamato (1 mM - 100 nl) ou salina na área pressora caudal (APC) em ratos com lesão eletrolítica do NTS comissural (NTScom).

| Tratamento | PAM basal (mmHg) | FC basal (bpm) |
|---|---|---|
| lesão fictícia NTScom + salina APC (n = 7) | 122 ± 6 | 329 ± 6 |
| lesão NTScom + salina APC (n = 7) | 128 ± 4 | 343 ± 8 |
| lesão fictícia NTScom + L-glutamato APC (n = 7) | 123 ± 4 | 328 ± 7 |
| lesão NTScom + L-glutamato APC (n = 7) | 127 ± 2 | 338 ± 8 |

Os resultados estão expressos em média ± EPM. n = número de ratos.

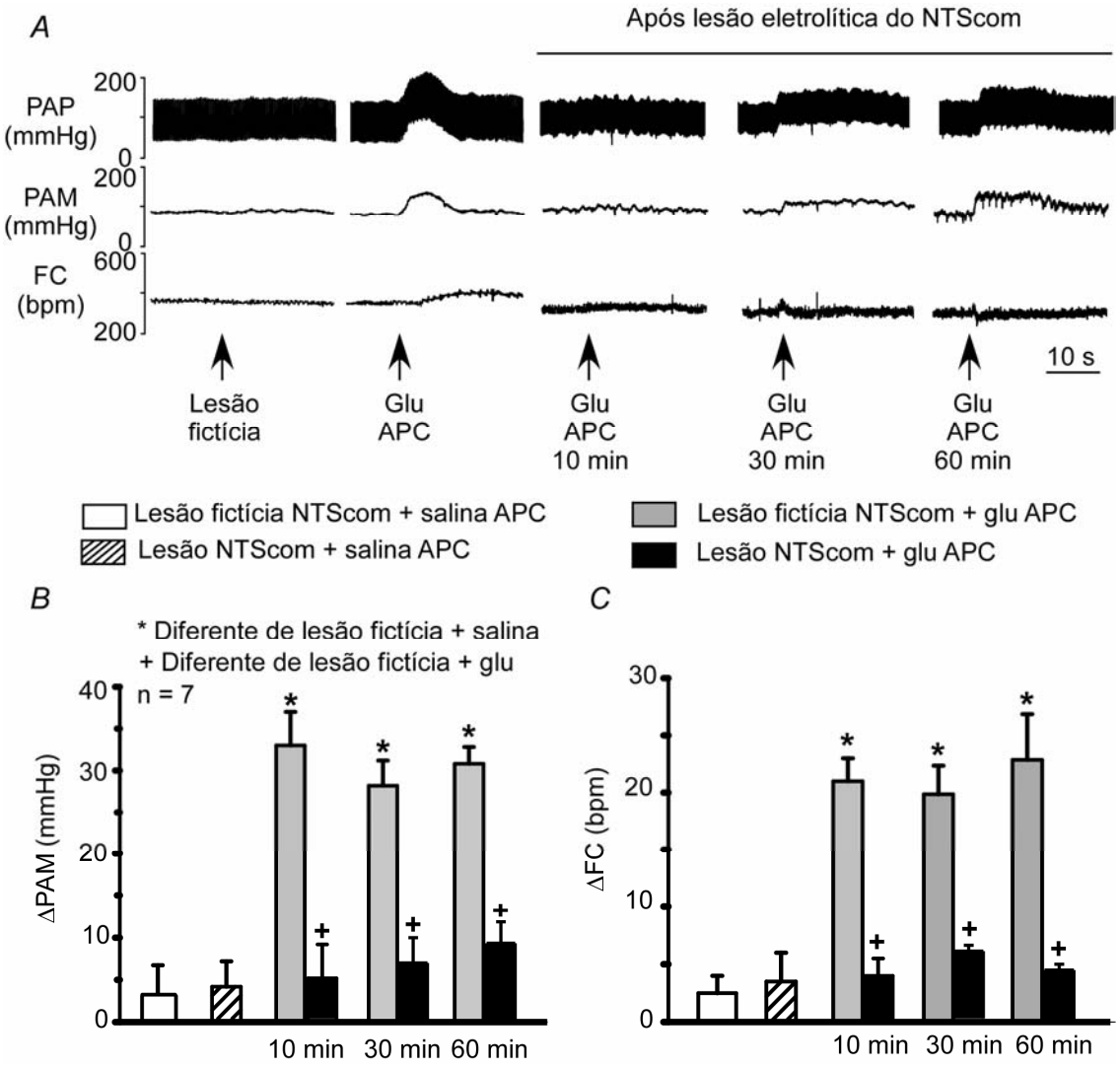


**Figura 5:** A) Traçado representativo mostrando alterações na pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM) e freqüência cardíaca (FC) produzidas pelas injeções de L-glutamato (1 mM - 100 nl) na APC antes e 10, 30 ou 60 minutos após lesão eletrolítica no NTS comissural (NTScom). B) Alterações na PAM e C) FC produzidas pela injeção de L-glutamato ou salina na APC 10, 30 ou 60 minutos após lesão eletrolítica ou fictícia no NTScom. Os resultados estão expressos em média ± EPM. n = número de animais.

**3- Efeitos da inibição do NTS comissural nas respostas de PAM e FC após a estimulação da APC**

O próximo protocolo foi elaborado para comprovar que a região do NTScom é importante nas respostas de ativação da APC. No protocolo anterior foram realizados lesões eletrolíticas do NTScom. Sabe-se que lesões eletrolíticas destroem tanto fibras de passagem quanto corpos celulares. Portanto para uma melhor seletividade nos nossos resultados, no protocolo a seguir foi utilizado o agonista de receptores GABAérgicos muscimol. Os níveis basais de PAM e FC foram semelhantes em todos os 4 grupos de animais estudados ([$F(3, 37) = 8{,}312$; $p>0{,}05$] e [$F(3, 37) = 15{,}151$; $p>0{,}05$], respectivamente) (Tabela 2).

A injeção de salina no NTScom seguida da injeção unilateral do aminoácido excitatório L-glutamato (1 mM - 100 nl) na APC produziu resposta pressora ($\Delta$ = +29 ± 5 mmHg, vs. controle: $\Delta$ = +2 ± 2 mmHg, $p<0{,}05$) e taquicárdica ($\Delta$ = +26 ± 10 bpm, vs. controle: $\Delta$ = +2 ± 3 bpm, $p<0{,}05$) (Figs. 6A, 6B e 6C). As respostas pressora e taquicárdica promovidas pela injeção unilateral de L-glutamato na APC foram abolidas 10 ($\Delta$ = +5 ± 5 mmHg e $\Delta$ = +5 ± 3 bpm, respectivamente), 30 ($\Delta$ = +8 ± 5 mmHg e $\Delta$ = +7 ± 2 bpm, respectivamente) e 60 minutos ($\Delta$ = +11 ± 6 mmHg e $\Delta$ = +5 ± 2 bpm, respectivamente) após injeção do agonista GABAérgico muscimol (2 mM - 60 nL) no NTScom (Figs. 6A, 6B e 6C). Somente a injeção de muscimol no NTScom, seguida da injeção unilateral de salina na APC não promoveu alterações na PAM e FC basais ($\Delta$ = +4 ± 4 mmHg e $\Delta$ = +3 ± 5 bpm, respectivamente, $p>0{,}05$) (Figs. 6A, 6B e 6C).

**Tabela 2:** PAM e FC basais nos grupos de ratos tratados com muscimol (2 mM - 60 nl) ou salina injetado no NTS comissural (NTScom) seguido de L-glutamato (1 mM - 100 nl) ou salina injetado na área pressora caudal (APC).

| Tratamento | PAM basal (mmHg) | FC basal (bpm) |
|---|---|---|
| salina NTScom + salina APC (n = 8) | 111 ± 10 | 351 ± 11 |
| muscimol NTScom + salina APC (n = 8) | 109 ± 12 | 333 ± 10 |
| salina NTScom + L-glutamato APC (n = 8) | 110 ± 8 | 329 ± 13 |
| muscimol NTScom + L-glutamato APC (n = 8) | 117 ± 4 | 325 ± 12 |

Os resultados estão expressos em média ± EPM. n = número de ratos.

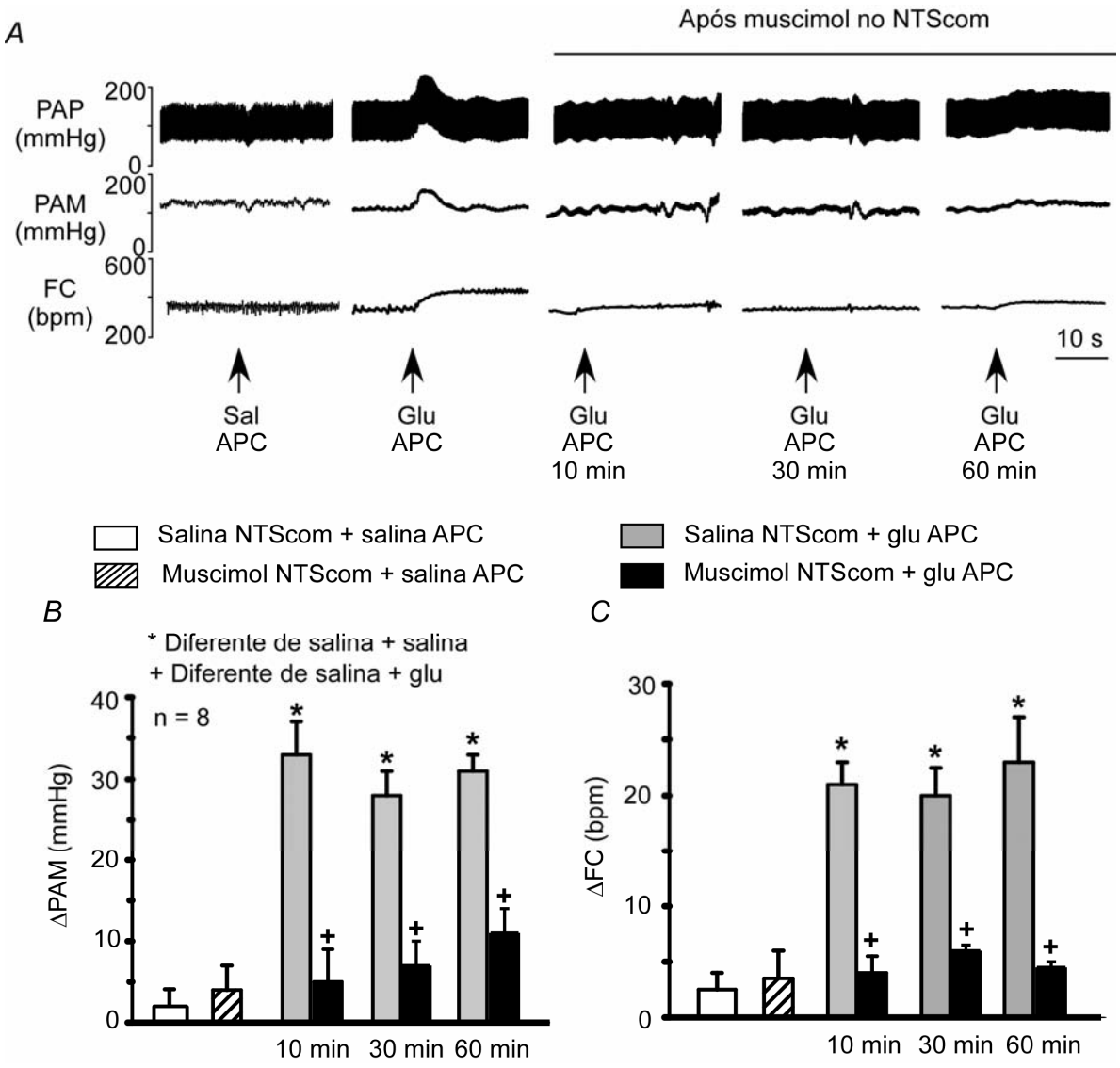


**Figura 6:** A) Traçado representativo mostrando alterações na pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM) e freqüência cardíaca (FC) produzidas pelas injeções de L-glutamato (1 mM - 100 nl) na APC antes e 10, 30 ou 60 minutos após a injeção de muscimol (2 mM – 60 nl) no NTS comissural (NTScom). B) Alterações na PAM e C) FC produzidas pela injeção de L-glutamato ou salina na APC 10, 30 ou 60 minutos após a injeção de muscimol ou salina no NTScom. Os resultados estão expressos em média ± EPM. n = número de animais.

**4- Efeitos da inibição do NTS intermediário nas respostas de PAM e FC após a estimulação da APC**

O próximo protocolo experimental foi idealizado para mostrar uma possível seletividade das respostas de estimulação da APC, isto é, acreditamos que as respostas de estimulação da APC dependam da região comissural do NTS e não da região intermediária.

Os níveis basais de PAM e FC foram semelhantes em todos os 4 grupos de animais estudados ([$F(3, 37) = 11,872$; $p > 0,05$] e [$F(3, 37) = 22,243$; $p>0,05$], respectivamente) (Tabela 3).

A injeção de salina no NTS int seguida da injeção unilateral do aminoácido excitatório L-glutamato (1 mM - 100 nl) na APC produziu resposta pressora ($\Delta$ = +16 ± 5 mmHg, vs. controle: $\Delta$ = +3 ± 2 mmHg, $p<0,05$) e taquicárdica ($\Delta$ = +16 ± 3 bpm, vs. controle: $\Delta$ = +10 ± 7 bpm, $p<0,05$) (Figs. 7A, 7B e 7C). As injeções bilaterais do agonista GABAérgico muscimol (2 mM - 60 nL) no NTS int seguida da injeção de salina na APC promoveu aumento de PAM ($\Delta$ = +41 ± 8 mmHg, $p<0,05$) (Figs. 7A e 7B).

As respostas pressora e taquicárdica promovidas pela injeção unilateral de L-glutamato na APC não foram modificadas 10 ($\Delta$ = +11 ± 2 mmHg e $\Delta$ = +30 ± 12 bpm, respectivamente), 30 ($\Delta$ = +27 ± 4 mmHg e $\Delta$ = +32 ± 15 bpm, respectivamente) e 60 minutos ($\Delta$ = +24 ± 7 mmHg e $\Delta$ = +24 ± 8 bpm, respectivamente) após as injeções bilaterais de muscimol no NTS int (Figs. 7A, 7B e 7C).

**Tabela 3:** PAM e FC basais nos grupos de ratos tratados com muscimol (2 mM - 60 nl) ou salina injetado no NTS intermediário (NTS int) seguido de L-glutamato (1 mM - 100 nl) ou salina injetado na área pressora caudal (APC).

| Tratamento | PAM basal (mmHg) | FC basal (bpm) |
|---|---|---|
| salina NTS int+ salina APC (n = 6) | 121 ± 8 | 348 ± 13 |
| muscimol NTS int + salina APC (n = 7) | 119 ± 11 | 343 ± 21 |
| salina NTS int + L-glutamato APC (n = 6) | 123 ± 2 | 332 ± 22 |
| muscimol NTS int + L-glutamato APC (n = 8) | 120 ± 2 | 345 ± 19 |

Os resultados estão expressos em média ± EPM. n = número de ratos.

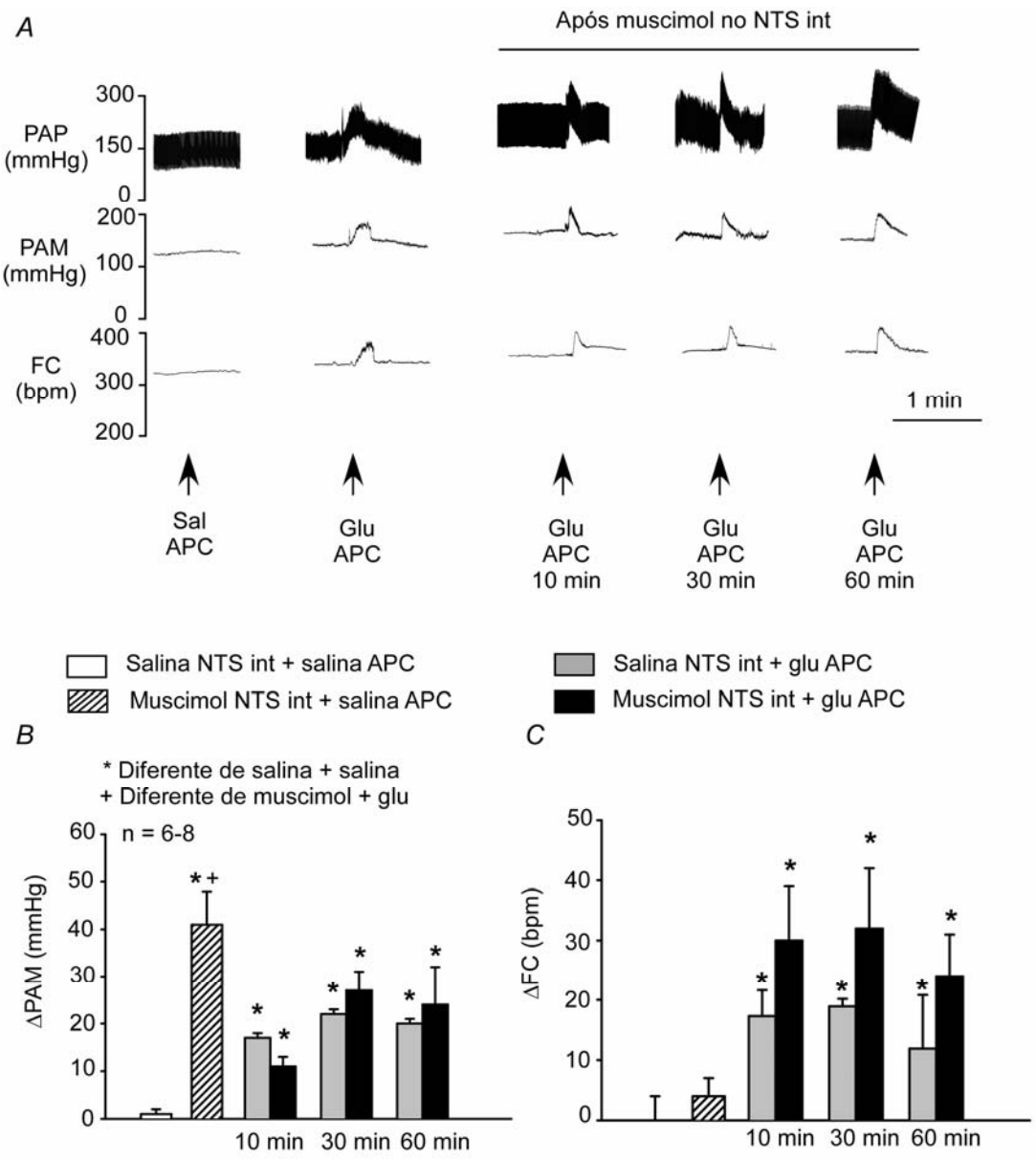


**Figura 7:** A) Traçado representativo mostrando alterações na pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM) e freqüência cardíaca (FC) produzidas pelas injeções de L-glutamato (1 mM - 100 nl) na APC antes e 10, 30 ou 60 minutos após a injeção de muscimol (2 mM – 60 nl) no NTS intermediário (NTS int). B) Alterações na PAM e C) FC produzidas pela injeção de L-glutamato ou salina na APC 10, 30 ou 60 minutos após a injeção de muscimol ou salina no NTS int. Os resultados estão expressos em média ± EPM. n = número de animais.

**5- Efeitos da estimulação do NTS comissural nas respostas de PAM e FC após a inibição da APC**

As repostas de estimulação da APC dependem da integridade dos neurônios localizados no NTScom. Nossa próxima pergunta foi: Será que a integridade da APC é importante para as respostas de estimulação do NTScom? Para isso, o próximo protocolo foi investigar as respostas de estimulação da região comissural do NTS antes e após a inibição da APC com o agonista GABAérgico muscimol.

Os níveis basais de PAM e FC foram semelhantes em todos os 4 grupos de animais estudados ([$F(3, 37) = 15,12$; $p > 0,05$] e [$F(3, 37) = 13,0541$; $p>0,05$], respectivamente) (Tabela 4).

A injeção de salina na APC seguida da injeção do aminoácido excitatório L-glutamato (1 mM - 60 nl) no NTScom produziu resposta depressora ($\Delta$ = -15 ± 4 mmHg, vs. controle: $\Delta$ = +2 ± 4 mmHg, $p<0,05$) e bradicárdica ($\Delta$ = -9 ± 5 bpm, vs. controle: $\Delta$ = +3 ± 3 bpm, $p<0,05$) (Figs. 8A, 8B e 8C). Apenas as injeções bilaterais do agonista GABAérgico muscimol (2 mM - 100 nl) na APC promoveram queda de PAM ($\Delta$ = -18 ± 6 mmHg, $p<0,05$) e FC ($\Delta$ = -21 ± 8 bpm, $p<0,05$) (Figs. 8A, 8B e 8C).

As respostas depressora e bradicárdica promovidas pela injeção unilateral de L-glutamato no NTScom foram abolidas 10 ($\Delta$ = -5 ± 3 mmHg e $\Delta$ = +8 ± 9 bpm, respectivamente), 30 ($\Delta$ = -5 ± 2 mmHg e $\Delta$ = +7 ± 4 bpm, respectivamente) e 60

minutos ($\Delta$ = -6 ± 4 mmHg e $\Delta$ = +10 ± 6 bpm, respectivamente) após as injeções bilaterais de muscimol na APC (Figs. 8A, 8B e 8C).

**Tabela 4:** PAM e FC basais nos grupos de ratos tratados com muscimol (2 mM - 100 nl) ou salina injetado na APC seguido de L-glutamato (1 mM - 60 nl) ou salina injetado no NTS comissural (NTScom).

| Tratamento | PAM basal (mmHg) | FC basal (bpm) |
|---|---|---|
| salina NTScom + salina APC (n = 6) | 118 ± 8 | 353 ± 13 |
| L-glutamato NTScom + salina APC (n = 6) | 116 ± 10 | 348 ± 22 |
| salina NTScom + muscimol APC (n = 6) | 122 ± 6 | 341 ±18 |
| L-glutamato NTScom + muscimol APC (n = 6) | 124 ± 7 | 344± 12 |

Os resultados estão expressos em média ± EPM. n = número de ratos.

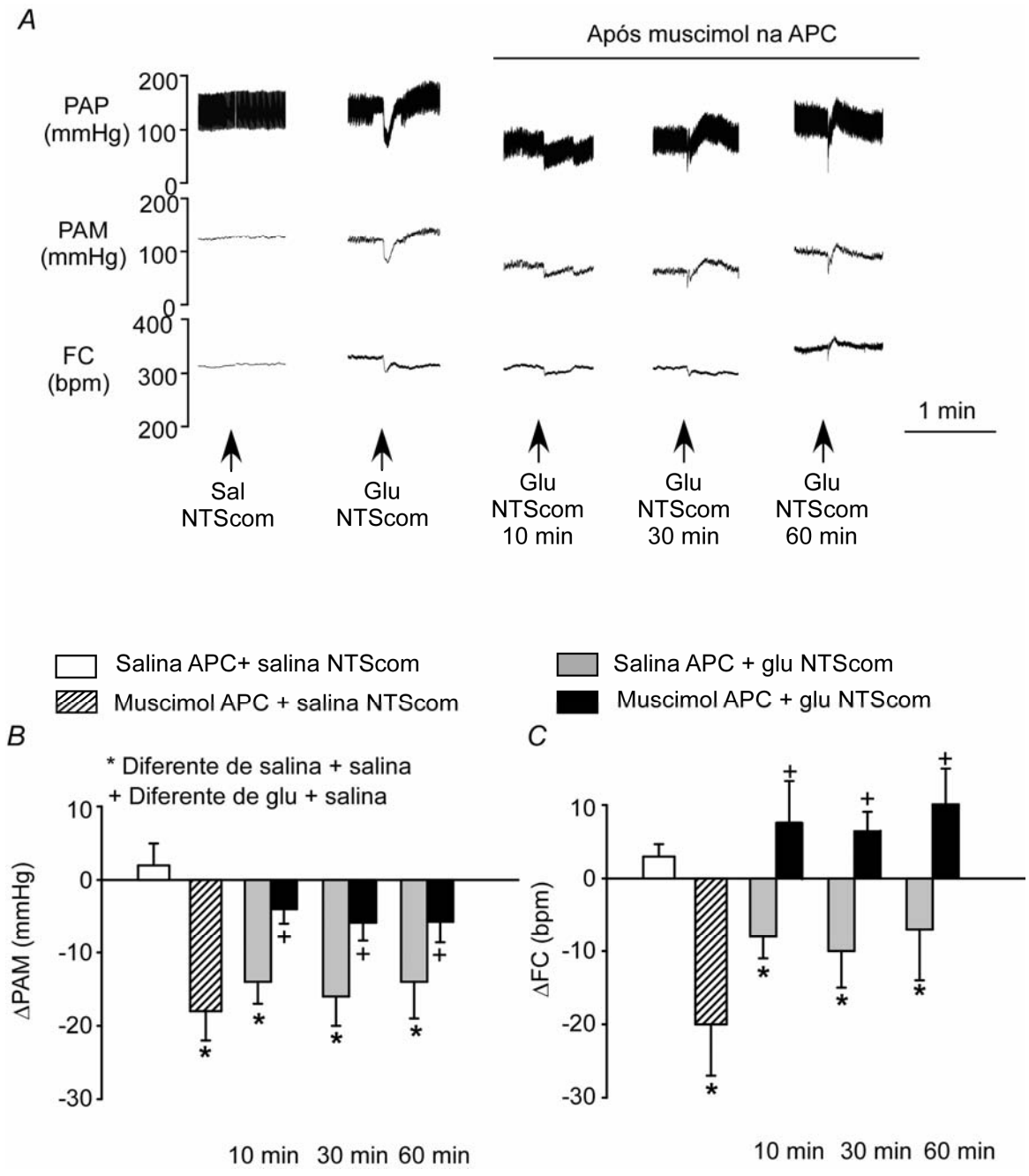


**Figura 8:** A) Traçado representativo mostrando alterações na pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM) e freqüência cardíaca (FC) produzidas pelas injeções de L-glutamato (1 mM - 60 nl) no NTS comissural (NTScom) antes e 10, 30 ou 60 minutos após a injeção de muscimol (2 mM – 100 nl) na APC. B) Alterações na PAM e C) FC produzidas pela injeção de L-glutamato ou salina no NTScom 10, 30 ou 60 minutos após a injeção de muscimol ou salina na APC. Os resultados estão expressos em média ± EPM. n = número de animais.

**6- Efeitos da estimulação do NTS intermediário nas respostas de PAM e FC após a inibição da APC**

Os níveis basais de PAM e FC foram semelhantes em todos os 4 grupos de animais estudados ([$F(3, 37) = 18,724$; $p > 0,05$] e [$F(3, 37) = 25,543$; $p>0,05$], respectivamente) (Tabela 5).

A injeção de salina na APC seguida da injeção unilateral do aminoácido excitatório L-glutamato (1 mM - 60 nl) no NTS int produziu resposta depressora ($\Delta$ = -30 ± 5 mmHg, vs. controle: $\Delta$ = +1 ± 2 mmHg, $p<0,05$) e bradicárdica ($\Delta$ = -34 ± 14 bpm, vs. controle: $\Delta$ = +3 ± 2 bpm, $p<0,05$) (Figs. 9A, 9B e 9C). Apenas as injeções bilaterais do agonista GABAérgico muscimol (2 mM - 100 nl) na APC promoveu queda de PAM ($\Delta$ = -14 ± 4 mmHg, $p<0,05$) e FC ($\Delta$ = -18 ± 8 bpm, $p<0,05$) (Figs. 9A, 9B e 9C).

As respostas depressora e bradicárdica promovidas pela injeção unilateral de L-glutamato no NTS int não foram modificadas 10 ($\Delta$ = -41 ± 9 mmHg e $\Delta$ = -67 ± 26 bpm, respectivamente), 30 ($\Delta$ = -31 ± 12 mmHg e $\Delta$ = -23 ± 4 bpm, respectivamente) e 60 minutos ($\Delta$ = -32 ± 8 mmHg e $\Delta$ = -21 ± 3 bpm, respectivamente) após as injeções bilaterais de muscimol na APC (Figs. 9A, 9B e 9C).

**Tabela 5:** PAM e FC basais nos grupos de ratos tratados com muscimol (2 mM - 100 nl) ou salina injetado na APC seguido de L-glutamato (1 mM - 60 nl) ou salina injetado no NTS intermediário (NTS int).

| Tratamento | PAM basal (mmHg) | FC basal (bpm) |
|---|---|---|
| salina NTSint + salina APC (n = 5) | 119 ± 6 | 329 ± 19 |
| L-glutamato NTSint + salina APC (n = 6) | 128 ± 8 | 313 ± 12 |
| salina NTSint + muscimol APC (n = 5) | 124 ± 6 | 326 ±25 |
| L-glutamato NTSint + muscimol APC (n = 6) | 117 ± 10 | 318± 17 |

Os resultados estão expressos em média ± EPM. n = número de ratos.

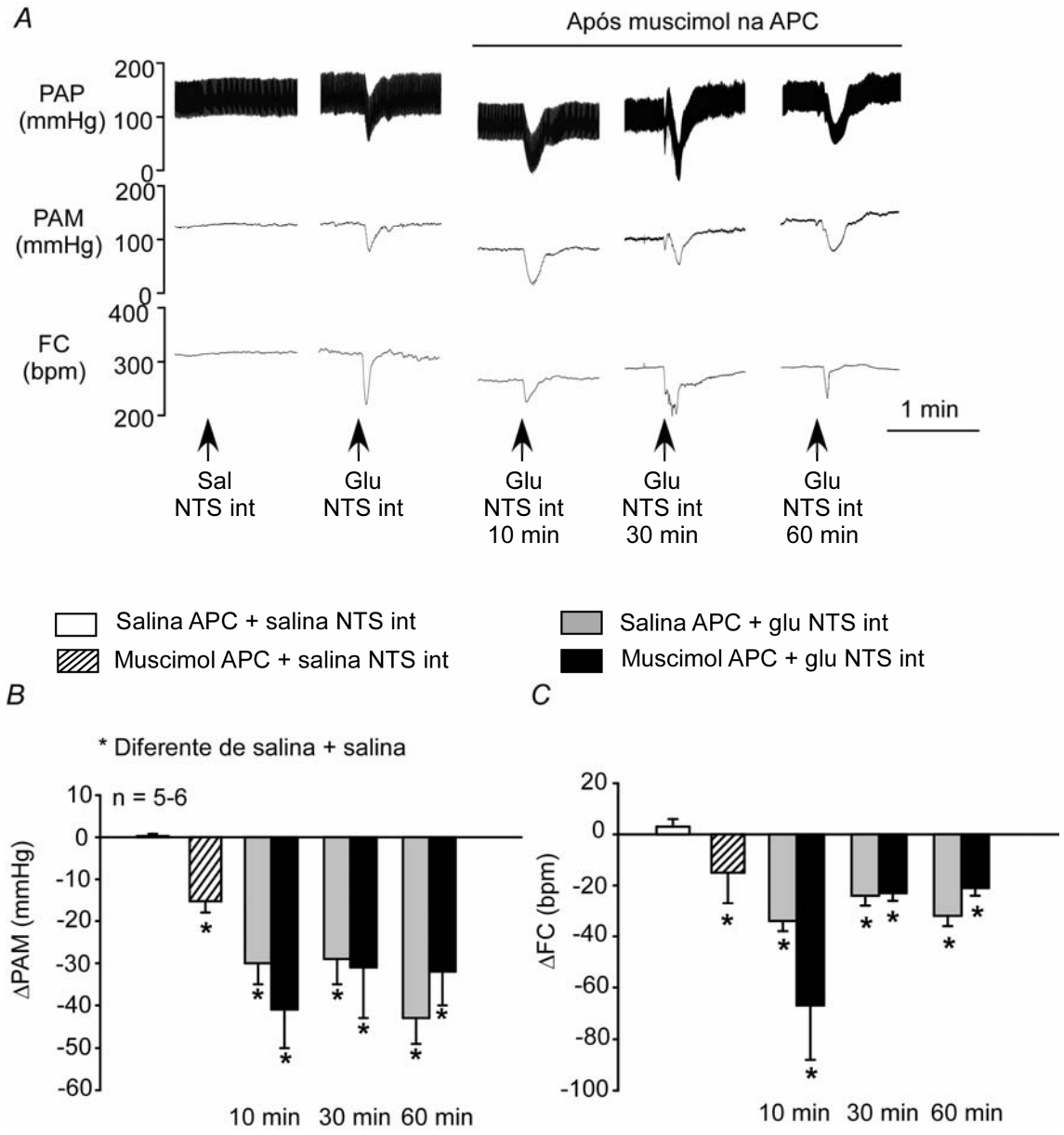


**Figura 9:** A) Traçado representativo mostrando alterações na pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM) e freqüência cardíaca (FC) produzidas pelas injeções de L-glutamato (1 mM - 60 nl) no NTS intermediário (NTS int) antes e 10, 30 ou 60 minutos após a injeção de muscimol (2 mM – 100 nl) na APC. B) Alterações na PAM e C) FC produzidas pela injeção de L-glutamato ou salina no NTS int 10, 30 ou 60 minutos após a injeção de muscimol ou salina na APC. Os resultados estão expressos em média ± EPM. n = número de animais.

## 7- Efeitos da inibição da APC nas respostas de ativação do baro e quimiorreflexo

### 7.1- Barorreflexo

A curva do barorreflexo foi construída com injeções endovenosas de dose depressora de nitroprussiato de sódio (30 μg/kg) e com a inflação de um balão na aorta torácica (Fig. 10A).

A relação de atividade simpática e PAM (curva do barorreflexo) não revelou nenhum efeito significativo alterado após a injeção de muscimol na APC (Tabela 6, Figs. 10B, 10C, 11A e 11B). Após a inibição da APC o barorreflexo continuou operando nos mesmos valores de PAM50 quando comparado ao grupo controle (Tabela 6). Os valores de platô superior e inferior, bem como o ganho também não tiveram diferença quando comparados com o grupo controle (Tabela 6).

A ativação do barorreflexo não promoveu alterações respiratórias. Após a injeção bilateral de muscimol na APC ocorreu apenas uma redução na amplitude da atividade do nervo frênico (76 ± 3% em relação ao controle, $p>0,05$) (Figs. 10A, 11A e 11D).

Da mesma maneira, injeções de muscimol (2 mM - 60 nl) no NTScom não revelou nenhum efeito significativo na análise do barorrelfexo, isto é, o mecanismo do barorreflexo continuou operando nos mesmo valores que o animal controle (injeção de salina no NTScom) (Figs. 10D e 10E). Por outro lado, injeções bilaterais de muscimol (2 mM - 60 nl) no NTS int promoveu uma completa inibição da atividade do barorreflexo (Fig. 10F).

A injeção de muscimol no NTScom não promoveu nenhuma alteração na atividade basal do nervo frênico, sendo que a atividade do nervo frênico permaneceu sincronizada com a ventilação, a sua amplitude não foi alterada (98 ± 6% em relação ao controle, $p>0,05$) e a duração do tempo de inspiração também não foi alterado (0.31 ± 0.04 para 0.34 ± 0.05s, $p>0,05$).

As injeções bilaterais de muscimol no NTS int promoveram um pequeno aumento na amplitude do nervo frênico, mas que não se mostrou significante (102 ± 3% em relação ao controle, $p>0,05$); entretanto a inibição do NTS int promoveu um aumento significante no tempo de inspiração (0.32 ± 0.02 para 0.53 ± 0.02s; $p<0,05$). Ocorreu também uma dessincronização da atividade do nervo frênico com o ciclo ventilatório.

**Tabela 6:** Parâmetros da curva sigmóide do barorreflexo em ratos tratados com muscimol (2 mM - 100 nl) ou salina injetados na APC.

| Tratamento | PAM basal (mmHg) | PAM50 (mmHg) | Plato sup. (%) | Plato inf. (%) | Variação (%) | Ganho máx. (%/PAM) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Salina APC | 123 ± 6 | 121 ± 5 | 159 ± 14 | 19 ± 4 | 140 ± 12 | 4.4 ± 0.1 |
| Musc APC | 122 ± 5 | 119± 11 | 160 ± 20 | 24 ± 11 | 151 ± 38 | 4.0 ± 1 |

Os resultados estão expressos em média ± EPM. PAM basal, pressão arterial média imediatamente antes da ativação do barorreflexo; PAM 50, PAM no ponto médio da curva do barorreflexo.

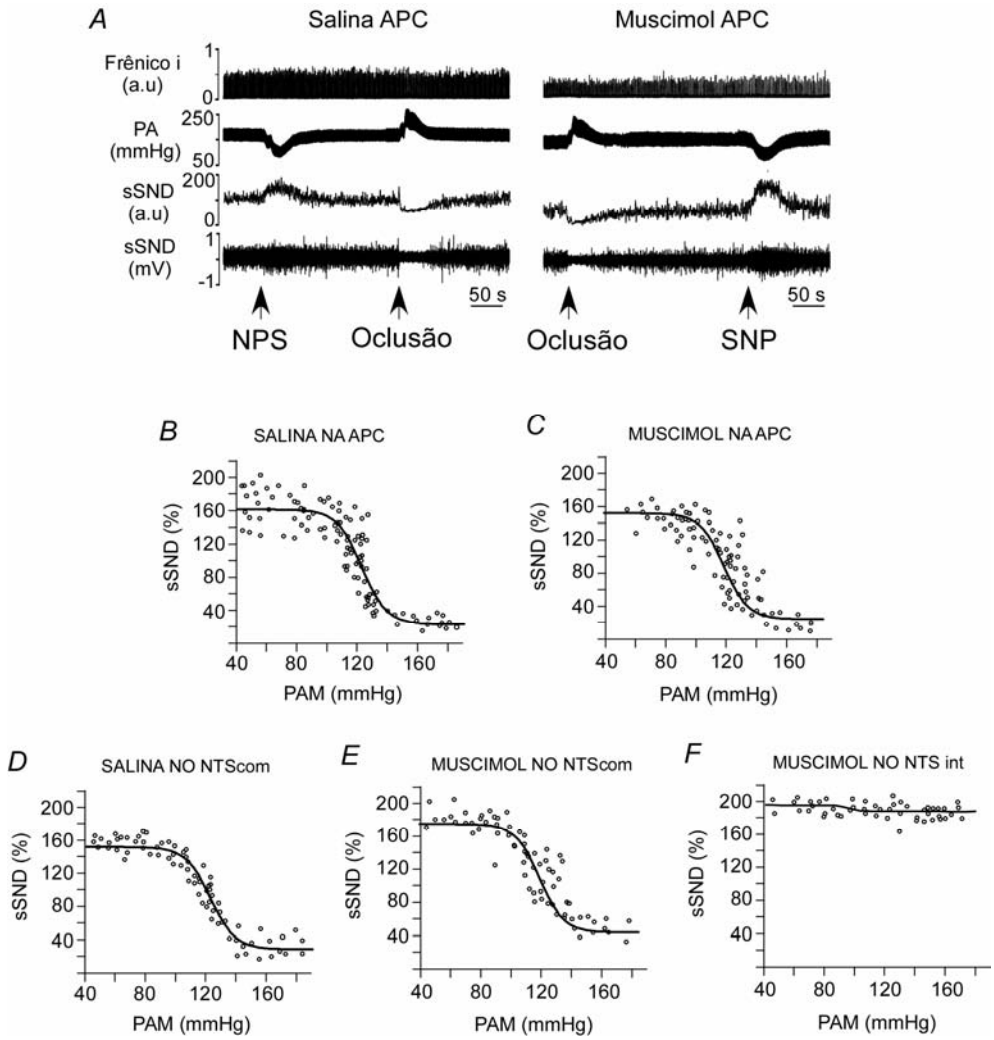


**Figura 10:** A) Traçado representativo mostrando alterações na atividade integrada do nervo frênico, pressão arterial (PA), atividade integrada do nervo esplâncnico (sSND) e atividade do nervo esplâncnico (sSND) produzidas pela injeção endovenosa de nitroprussiato de sódio (NPS – 30 μg/kg) e pela oclusão da aorta torácica (AOc) antes e após as injeções bilaterais de muscimol na APC. A relação entre a atividade simpática e pressão arterial média (PAM), mostrando a curva do barorreflexo em diversas situações B) após as injeções bilaterais de salina na APC; C) após as injeções bilaterais de muscimol na APC; D) após a injeção de salina no NTScom; E) após a injeção de muscimol no NTScom e F) após as injeções bilaterais de muscimol no NTS int.

**7.2- Quimiorreflexo**

A ativação do quimiorreflexo foi realizada com injeções endovenosas de cianeto de sódio (NaCN – 50 μg/kg). A ativação do quimiorreflexo com NaCN produziu resposta pressora (Δ = +16 ± 4 mmHg, vs. salina Δ = +2 ± 2 mmHg, p<0,05), aumento da atividade simpática do nervo esplâncnico (Δ = +236 ± 11% em relação ao controle, p<0,01) e aumento da atividade do nervo frênico (Figs. 11 A, 11B, 11 C e 11D).

As injeções bilaterais do agonista GABA-A muscimol (2 mM – 100 nl) na APC produziram uma redução da PAM basal (Δ = -19 ± 3 mmHg, vs. salina Δ = +3 ± 2 mmHg, p<0,05) e da atividade simpática do nervo esplâncnico (Δ = -39 ± 2% em relação ao controle, p<0,05) (Figs. 11A, 11B e 11C). A injeção de muscimol promoveu apenas uma redução na amplitude da atividade do nervo frênico, como já descrito anteriormente (Figs. 10A, 11A e 11D). Muscimol na APC promoveu uma redução da resposta pressora (Δ = +9 ± 2 mmHg, vs. salina Δ = +18 ± 4 mmHg, p<0,05), da resposta simpatoexcitatória (Δ = +88 ± 18%, vs. salina Δ = +217 ± 33 %, p<0,01) e do aumento da atividade do nervo frênico produzido pela ativação dos quimiorreceptores periféricos com NaCN (Figs. 11A, 11B e 11C).

Por motivos de comparação, foi realizado um outro protocolo experimental com injeções de muscimol (2 mM- 60 nl) no NTScom e avaliou-se as respostas de ativação do quimiorreflexo periférico. A injeção de muscimol no NTScom não alterou a PAM basal (Δ = +4 ± 5 mmHg, vs. salina Δ = +3 ± 3 mmHg, p>0,05), a atividade simpática do nervo esplâncnico (Δ = 99 ± 5% em relação ao controle, p>0,05) e a atividade do nervo frênico. A injeção de muscimol no NTScom

bloqueou a resposta pressora (Δ = +2 ± 2 mmHg, vs. salina Δ = +21 ± 4 mmHg, p<0,01), a resposta simpatoexcitatória (Δ = +15 ± 6%, vs. salina Δ = +224 ± 19 %, p<0,01) e o aumento da atividade do nervo frênico produzido pela ativação dos quimiorreceptores periféricos com NaCN.

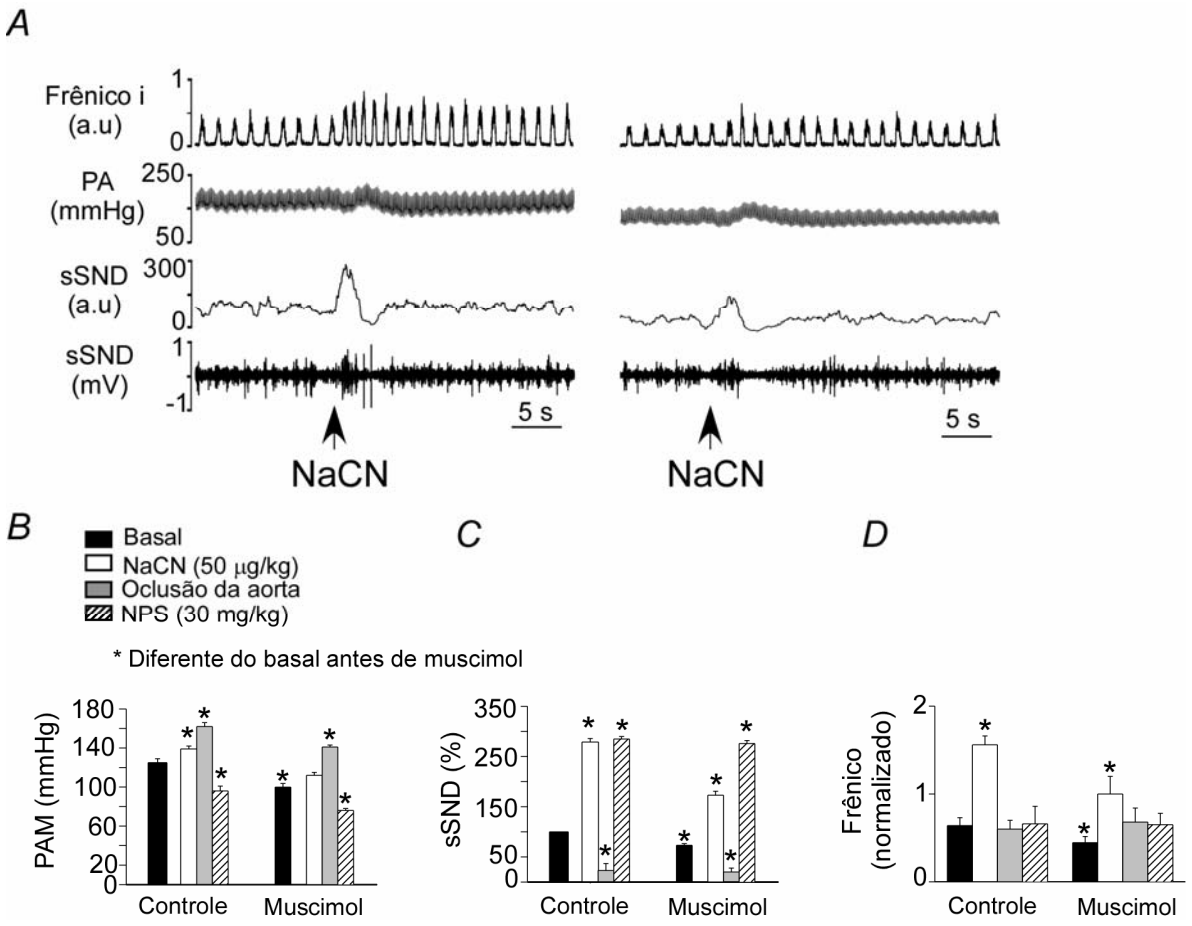


**Figura 11:** A) Traçado representativo mostrando alterações na atividade integrada do nervo frênico, pressão arterial (PA), atividade integrada do nervo esplâncnico (sSND) e atividade do nervo esplâncnico (sSND) produzidas pela injeção endovenosa de cianeto de sódio (NaCN - 50 μg/kg) antes e após as injeções bilaterais de muscimol na APC. B) PAM basal e após oclusão da aorta ou injeções de NaCN e nitroprussiato de sódio (NPS - 30 μg/kg) antes e após as injeções bilaterais de muscimol na APC; C) Alterações na sSND produzidas pela oclusão da aorta e pelas injeções de NaCN e NPS antes e após as injeções bilaterais de muscimol na APC; D) Alterações na atividade do nervo frênico produzidas pela oclusão da aorta e pelas injeções de NaCN e NPS antes e após as injeções bilaterais de muscimol na APC.