

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS – UFSCar
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

Importância da região AV3V e de mecanismos colinérgicos e angiotensinérgicos centrais para os efeitos cardiovasculares produzidos pela ativação da área rostroventrolateral do bulbo.

Alexandre Antonio Vieira

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos como requisito para obtenção do grau de Doutor em Ciências Fisiológicas, área de concentração Fisiologia.

São Carlos
2008

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

V658ir

Vieira, Alexandre Antonio.

Importância da região AV3V e de mecanismos colinérgicos e angiotensinérgicos centrais para os efeitos cardiovasculares produzidos pela ativação da área rostroventrolateral do bulbo / Alexandre Antonio Vieira. -- São Carlos : UFSCar, 2008.

130 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2008.

1. Sistema cardiovascular. 2. Equilíbrio hidroeletrólítico. 3. AV3V. 4. RVL. 5. Hipertensão. 6. Angiotensina II. I. Título.

CDD: 612.1 (20^a)

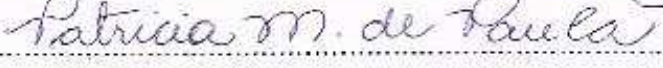
Universidade Federal de São Carlos
Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

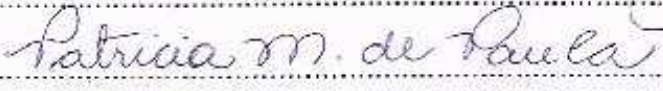
Defesa de Tese de Alexandre Antonio Vieira

Prof. Dr. José Vanderlei Menani..... 

Prof. Dr. Osvaldo Ubriaco Lopes..... 

Prof. Dr. Vagner Roberto Antunes..... 

Prof. Dr. Ruy Ribeiro de Campos..... 

Profª. Drª. Patrícia Maria de Paula..... 

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS – UFSCar
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

Importância da região AV3V e de mecanismos colinérgicos e angiotensinérgicos centrais para os efeitos cardiovasculares produzidos pela ativação da área rostroventrolateral do bulbo.

Alexandre Antonio Vieira

Orientador: Prof. Dr. José Vanderlei Menani

Apoio financeiro: FAPESP, Pronex e CNPq
Bolsa de doutorado: FAPESP

AGRADECIMENTOS:

Primeiramente a Deus, fonte de toda energia positiva do universo que me propicia saúde e prosperidade na vida;

Ao Professor José Vanderlei Menani pela confiança em meu trabalho;

A todos os professores e funcionários do departamento de Fisiologia de Araraquara que me receberam de braços abertos e me ajudaram todos esses anos;

A todos os meus amigos, por fazerem do laboratório um ambiente alegre e próspero para se trabalhar;

Aos meus pais Pedro e Luzia;

A minha irmã Nerita e aos meus sobrinhos Nicky e Samira.

**Dedico esta tese a minha linda e
amada esposa Elaine Cristina
Graves Vieira**

PROSPERIDADE

ÍNDICE DE ABREVIATURA E SÍMBOLOS

ANG II -	angiotensina II;
ADH -	vasopressina;
AV3V -	anteroventral do terceiro ventrículo;
BHE -	barreira hemato encefálica;
bpm -	batimentos por minuto;
ca -	comissura anterior;
CIL -	coluna intermédia lateral;
CVL -	caudo ventrolateral do bulbo;
EPM -	erro padrão da média
FC -	frequência cardíaca;
i.c.v. -	intracerebroventricular;
i.v. -	endovenosa;
KCN -	cianeto de potássio;
Kg -	kilograma;
mg -	miligrama(s);
ml -	mililitro(s);
mm -	milímetro(s);
mmHg -	milímetros de mercúrio;
na -	núcleo ambíguo;
nl -	nanolitro(s);
nmol -	nanomolar;
NPBL -	núcleo parabraquial lateral;
NPM -	núcleo preóptico mediano;
NPV -	núcleo paraventricular;
NSO -	núcleo supraóptico;
NTS -	núcleo do trato solitário;
OSF -	órgão subfornical;
OVLT -	órgão vascular da lâmina terminal;
PAP -	pressão arterial pulsátil;
PAM -	pressão arterial média;
RVL -	rostro ventrolateral do bulbo;
SNC -	sistema nervoso central
VL -	ventrículo lateral;
µg -	micrograma(s);
µm -	micrometro(s);
± -	mais ou menos;
> -	maior;
< -	menor.

INDICE

RESUMO.....	9
ABSTRACT	14
INTRODUÇÃO	18
MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
1-Animais	28
2-Cirurgia cerebral.....	28
2.1- Ratos com lesão eletrolítica aguda (1 dia) da região AV3V.....	28
2.2- Ratos com lesão eletrolítica crônica (15 dias) da região AV3V.....	29
2.3- Ratos com bloqueio colinérgico ou angiotensinérgico central (VL).....	29
2.4- Ratos com bloqueio colinérgico ou angiotensinérgico local (RVL).....	30
2.5- Ratos com bloqueio bilateral na área RVL.....	31
3-Injeção das drogas no cérebro.....	31
4-Drogas utilizadas.....	32
5- Medida da pressão arterial e frequência cardíaca.....	32
6-Histologia cerebral	33
7- Análise dos resultados	33
EXPERIMENTOS REALIZADOS	34
1- Efeitos da lesão da região AV3V aguda (1 dia) nas respostas cardiovasculares produzidas pela injeção de ANG II ou carbachol na área RVL.	34
2- Efeitos da lesão da região AV3V crônica (15 dias) nas respostas cardiovasculares produzidas pela injeção de ANG II ou carbachol na área RVL.	34
3- Efeitos do bloqueio colinérgico ou angiotensinérgico central (VL) nas respostas cardiovasculares produzidas pela injeção de glutamato na área RVL.....	35
4- Efeitos do bloqueio colinérgico ou angiotensinérgico da área RVL (bloqueio local) nas respostas cardiovasculares produzidas pela injeção de glutamato na mesma área.	35
5 - Efeitos do bloqueio angiotensinérgico central (VL) ou local com ZD 7155 nas respostas cardiovasculares produzidas pela injeção de glutamato na área RVL.....	36
6 - Efeitos do bloqueio angiotensinérgico local (RVL) com ZD 7155 nas respostas cardiovasculares produzidas pela injeção de glutamato na área RVL.....	36
7- Efeitos do bloqueio angiotensinérgico central (VL) nas respostas cardiovasculares produzidas pela injeção de ANG II na área RVL.....	37
8 - Efeitos da prévia injeção de ANG II na área RVL nas respostas cardiovasculares produzidas pela injeção de glutamato na mesma área.....	37

9- Efeitos de bloqueio glutamatérgico bilateralmente na área RVL nas respostas cardiovasculares produzidas pela injeção de ANG II ou carbacol no VL.....	38
10- Efeitos de bloqueio glutamatérgico bilateralmente na área RVL nos parâmetros respiratórios (Volume corrente, frequência respiratória e ventilação pulmonar)	38
11 - Teste do baro e quimiorreflexo.....	40
RESULTADOS	41
1- Efeitos da lesão aguda (1 dia) da região AV3V nas respostas cardiovasculares produzidas pela injeção de ANG II ou carbacol na área RVL.	41
2- Efeitos da lesão crônica (15 dias) da região AV3V nas respostas cardiovasculares produzidas pela injeção de ANG II ou carbacol na área RVL.	43
3- Efeitos do bloqueio colinérgico ou angiotensinérgico central (VL) nas respostas cardiovasculares produzidas pela injeção de glutamato na área RVL.	48
4- Efeitos do bloqueio colinérgico ou angiotensinérgico da área RVL nas respostas cardiovasculares produzidas pela injeção de glutamato na mesma área.	53
5 - Efeitos do bloqueio angiotensinérgico central (VL) com ZD 7155 nas respostas cardiovasculares produzidas pela injeção de glutamato na área RVL.	60
6 - Efeitos do bloqueio angiotensinérgico local (RVL) com ZD 7155 nas respostas cardiovasculares produzidas pela injeção de glutamato na área RVL.	64
7- Efeitos dos bloqueios angiotensinérgicos centrais (VL) nas respostas cardiovasculares produzidas pela injeção de ANG II na área RVL.....	68
8 - Efeitos da prévia injeção de ANG II na área RVL nas respostas cardiovasculares produzidas pela injeção de glutamato na mesma área.....	70
9– Efeitos de bloqueio glutamatérgico bilateralmente na área RVL nas respostas cardiovasculares produzidas pela injeção de carbacol ou ANG II no VL.	73
10- Efeitos de bloqueio glutamatérgico bilateralmente na área RVL nos parâmetros respiratórios (Volume corrente, frequência respiratória e ventilação pulmonar)	80
11- Teste do baro e quimiorreflexo nos diferentes grupos	84
10 – Análise histológica	88
DISCUSSÃO	93
CONCLUSÃO.....	116
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	117

RESUMO

Respostas cardiovasculares podem ser integradas em diferentes níveis do sistema nervoso central (SNC). No bulbo existem várias áreas importantes para o controle cardiovascular e dentre elas o principal sítio de ativação dos neurônios pré-ganglionares simpáticos para a coluna intermédia lateral (CIL), a área rostroventrolateral (RVL) cuja ativação glutamatérgica provoca resposta pressora. Semelhante à ativação glutamatérgica, também a ativação de receptores colinérgicos e angiotensinérgicos em diferentes áreas centrais incluindo a área RVL provoca aumento na pressão arterial, colaborando para a manutenção da atividade simpática. Projeções inibitórias e excitatórias direcionadas à área RVL garantem uma sintonia fina dos parâmetros cardiovasculares e dentre essas projeções destacam-se aquelas que se originam em áreas hipotalâmicas como a região anteroventral do terceiro ventrículo (AV3V), cuja lesão impede o desenvolvimento de diversas formas de hipertensão experimental em animais e reduz vários tipos de respostas pressoras como, por exemplo, induzida pela ativação angiotensinérgica e colinérgica central.

Em estudo recente demonstramos que a lesão da região AV3V atenua a resposta pressora à ativação glutamatérgica da área RVL em ratos não anestesiados. Sabendo-se que a exemplo do glutamato, injeções de angiotensina II (ANG II) ou carbacol (agonista colinérgico muscarínico) na área RVL produzem respostas pressoras, no presente estudo investigamos os efeitos de lesões agudas (1 dia) ou crônicas (15 dias) da região AV3V nas respostas pressoras produzidas pela injeção de ANG II (200 ng/100 nl) ou carbacol (1 nmol/100 nl) na área RVL de ratos não anestesiados. Para isso foram utilizados ratos Holtzman

(280 a 320 g) com lesão eletrolítica ou lesão fictícia da região AV3V aguda ou crônica e com cânulas de aço inoxidável implantadas na área RVL. A pressão arterial média (PAM) e a frequência cardíaca (FC) foram registradas em ratos não anestesiados que tiveram a artéria femoral canulada com tubo de polietileno (PE 10) no dia anterior ao do registro. A veia femoral também foi canulada para injeções das drogas endovenosas (i.v) para os testes de baro e quimiorreflexo. As injeções na área RVL foram feitas em um volume de 100 nl com auxílio de uma seringa Hamilton de 5 μ l.

Os resultados mostraram que tanto a lesão eletrolítica aguda quanto a crônica da região AV3V atenuaram as respostas pressoras da ANG II (12 ± 3 e 12 ± 5 vs. controle: 26 ± 4 mmHg) mas não as respostas pressoras do carbacol (38 ± 4 e 29 ± 3 vs. controle: 34 ± 4 mmHg) sugerindo que alguns mecanismos pressores presentes na área RVL não são influenciados pela lesão da região AV3V. Além disso, a lesão da região AV3V não alterou os reflexos cardiovasculares como o barorreflexo induzido pelas injeções i.v de fenilefrina e nitroprussiato de sódio e o quimiorreflexo induzido pelo cianeto de potássio (KCN) i.v.

Visto que a integridade da região AV3V é importante para algumas respostas pressoras causadas pela ativação da área RVL, como por exemplo, glutamatérgica e angiotensinérgica, uma questão que surgiu foi quais seriam os possíveis mecanismos que atuariam facilitando o aparecimento dessas respostas pressoras e que prejudicados pela lesão, diminuiriam sua atividade e consequentemente essas respostas pressoras.

Sabendo-se que a região AV3V é importante para a ativação de mecanismos pressores como aumento da atividade simpática e secreção de vasopressina produzidas pela ativação de receptores colinérgicos e angiotensinérgicos centrais, foi testada a resposta pressora do glutamato injetado na área RVL frente ao bloqueio colinérgico central com injeção de atropina (4 nmol/1 μ l) ou angiotensinérgico central com injeção de losartan (100 μ g/1 μ l) ou ZD 7155 (50 μ g/1 μ l) no ventrículo lateral (VL). Para isso foram utilizados ratos com cânulas implantadas tanto no VL, para as injeções dos antagonistas colinérgico ou angiotensinérgicos e unilateralmente na área RVL para a injeção do glutamato. A PAM e a FC foram registradas em ratos não anestesiados que tiveram um dia antes dos experimentos a canulação da artéria e veia femoral. O volume das injeções no VL foram sempre de 1 μ l. Os resultados demonstram que a resposta pressora do glutamato injetado na área RVL (51 ± 4 mmHg) em condição controle foi atenuada após a injeção de atropina (36 ± 5 mmHg), losartan (22 ± 5 mmHg) ou ZD 7155 (26 ± 7 mmHg) no VL.

Porém, como os antagonistas foram injetados no VL, uma dúvida que surgiu foi sobre um possível espalhamento dos mesmos atuando nos receptores presentes na área RVL. Por essa razão, houve a necessidade de testarmos a resposta pressora do glutamato na área RVL depois do bloqueio colinérgico ou angiotensinérgico na própria área RVL. A PAM e FC foram registradas em ratos não anestesiados, implantados com cânulas unilaterais na área RVL e que tiveram canulação da artéria femoral um dia antes dos experimentos. Os resultados mostraram que a injeção de atropina (4 nmol/100 nl) na área RVL não alterou a

resposta pressora do glutamato na mesma área (49 ± 4 vs. controle: 50 ± 4 mmHg) indicando nesse caso que apenas os mecanismos colinérgicos presentes no prosencéfalo são importantes para a resposta pressora do glutamato na área RVL. No entanto, a resposta pressora do glutamato na área RVL foi praticamente abolida e atenuada depois do bloqueio angiotensinérgico com injeção de losartan (5 ± 3 mmHg) ou ZD 7155 (33 ± 4 mmHg), respectivamente na própria área RVL. Por isso, um novo experimento foi realizado e nele verificou-se que a resposta pressora da ANG II injetada na área RVL em condição controle (26 ± 3 mmHg) não foi diferente daquela observada depois da injeção do losartan ou ZD 7155 no VL (20 ± 3 e 23 ± 1 mmHg, respectivamente) o que sugere que ambos antagonistas losartan e ZD 7155 injetados no VL nas doses utilizadas não estariam atuando diretamente na área RVL. Dessa forma, pode-se sugerir que mecanismos angiotensinérgicos presentes no prosencéfalo ou na área RVL são importantes para as respostas do glutamato na área RVL. Porém, com esses resultados ainda não podemos concluir se a lesão da região AV3V atenua as respostas pressoras produzidas pela ANG II na área RVL prejudicando os mesmos mecanismos centrais bloqueados pelos antagonistas injetados no VL, pois a resposta pressora da ANG II foi atenuada pela lesão da região AV3V, mas não pelos bloqueios farmacológicos centrais.

Outro objetivo foi estudar se a ativação de receptores glutamatérgicos presentes na área RVL seria importante para a resposta pressora produzida pela ativação colinérgica ou angiotensinérgica central. Para tanto, utilizamos ratos com cânulas implantadas bilateralmente na área RVL e no VL. Os resultados demonstraram que depois da injeção do antagonista de receptores

glutamatérgicos ácido quinurênico (1 nmol/100 nl) bilateralmente na área RVL não houve diferenças nas respostas cardiovasculares produzidas pela injeção de carbacol (36 ± 1 mmHg e 22 ± 10 bpm vs. controle: 39 ± 2 mmHg e 23 ± 14 bpm) e ANG II (28 ± 3 mmHg e 10 ± 13 bpm vs. controle: 26 ± 2 mmHg e -12 ± 5 bpm) no VL. Essa dose de ácido quinurênico praticamente bloqueou a resposta pressora do glutamato (2 nmol/100 nl) na área RVL, porém não alterou os reflexos cardiovasculares como barorreflexo e quimiorreflexo. Assim, sugere-se que a resposta pressora produzida pelo aumento da atividade colinérgica ou angiotensinérgica de áreas prosencefálicas não depende de sinapses glutamatérgicas na área RVL. Além disso, os resultados também sugerem que a resposta pressora do quimiorreflexo não depende da liberação de glutamato na área RVL.

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 such as the rostral ventrolateral medulla (RVLM) that activates sympathetic pre-ganglionic neurons in the spinal cord (IML) inducing pressor response. Like glutamatergic activation, central cholinergic and angiotensinergic activation modulates sympathetic activity and increases arterial pressure. The RVLM receives inhibitory and excitatory projections from different areas of the central nervous system that are important to modulate cardiovascular responses. One of the areas that send projection to the RVLM is the anteroventral third ventricle (AV3V) region. AV3V lesion impairs many forms of hypertension and reduces pressor responses like those produced by central cholinergic and angiotensinergic activation.

Recent study in unanesthetized rats has shown that the AV3V lesion attenuates the pressor response to glutamatergic activation into the RVLM. Besides glutamate, injections of angiotensin II (ANG II) or carbachol (cholinergic agonist) into the RVLM evoke increase in the sympathetic activity and blood pressure. For this reason, in the present study, we investigated the effects of acute (1 day) or chronic (15 days) AV3V lesions on pressor responses produced by ANG II (200 ng/100 nl) or carbachol (1 nmol/100 nl) into the RVLM. Male Holtzman rats (280 a 320 g) with sham or electrolytic AV3V lesions and a stainless steel cannula implanted into the RVLM were used. Mean arterial pressure (MAP) and heart rate (HR) were recorded in unanesthetized rats that had polyethylene tubing (PE 10) implanted into the abdominal aorta through the femoral artery on day before the

experiments. A second polyethylene tubing was inserted in the femoral vein for baroreflex and chemoreflex tests. Central injections were made using 5 μ l Hamilton syringes. The volume of the central injections into the RVLM was 100 nl. The results have shown that both acute and chronic AV3V lesion attenuate the pressor responses to ANG II (12 ± 3 and 12 ± 5 vs. control: 26 ± 4 mmHg) but not the pressor responses to carbachol (38 ± 4 and 29 ± 3 vs. control: 34 ± 4 mmHg) suggesting that some mechanisms belonging to the RVLM are affected and other are not affected by AV3V lesions. Besides, AV3V lesion does not alter baro and chemoreflex responses produced by endovenous (i.v) injections of phenylephrine, sodium nitroprusside and potassium cyanide.

After these results, another question arose: which would be the possible mechanisms impaired by the AV3V lesion that attenuate the pressor responses to RVLM activation? The AV3V region is important for the activation of pressor mechanism like sympathetic activity and vasopressin secretion produced by central cholinergic and angiotensinergic activation. Therefore, the pressor response to glutamate into the RVLM was tested in rats with central cholinergic blockade produced by the injection of atropine (4 nmol/1 μ l) or angiotensinergic blockade produced by injection of losartan (100 μ g/1 μ l) or ZD 7155 (50 μ g/1 μ l) into the lateral ventricle (LV). Male Holtzman rats with stainless steel cannula implanted into the LV and unilaterally into the RVLM were used. MAP and HR were recorded in unanesthetized rats with polyethylene tubing inserted into the abdominal aorta through the femoral artery and vein. The volume of the central injections into the LV was 1 μ l. The results showed that the pressor response to glutamate injected

into the RVLM (51 ± 4 mmHg) in control condition was attenuated after injection of atropine (36 ± 5 mmHg), losartan (22 ± 5 mmHg) or ZD 7155 (26 ± 7 mmHg) into the LV. However, a question that remained was about the possible spreading of these antagonists into the brain blocking the receptors directly into the RVLM. For this reason, we tested the pressor responses to glutamate into the RVLM after cholinergic or angiotensinergic blockade into the own RVLM.

Mean arterial pressure (MAP) and heart rate (HR) were recorded in unanesthetized rats with cannula only into the RVLM and polyethylene tubing implanted into the abdominal aorta through the femoral artery. The results showed that atropine (4 nmol/100 nl) injected into the RVLM did not alter the pressor response to glutamate into the same site (49 ± 4 vs. control: 50 ± 4 mmHg). So, only cholinergic mechanisms belonging to forebrain or areas outside the RVLM are important for the pressor response to glutamate into the RVLM. However, the pressor response to glutamate into the RVLM was almost abolished and attenuated after injection of the losartan (5 ± 3 mmHg) or ZD 7155 (33 ± 4 mmHg), respectively, into the RVLM, which did not solve the question about the possible spread of losartan or ZD 7155. With the same purpose we tested the pressor response to ANG II into the RVLM after losartan or ZD 7155 into the LV. In this experiment, the pressor response to ANG II into the RVLM in control condition (26 ± 3 mmHg) was not impaired after losartan or ZD 7155 into the LV (20 ± 3 e 23 ± 1 mmHg, respectively) suggesting that these antagonists injected into the LV do not reach the RVLM. Therefore, angiotensinergic mechanisms belonging in the RVLM or from outside the RVLM (probably forebrain) are important for the pressor

response to glutamate into the RVLM. However, it is important to consider that AV3V lesion reduces the pressor response to ANG II into the RVLM, while icv injection of the angiotensinergic antagonists showed no effect in this response, which suggests that the effects of AV3V lesion reducing the pressor response to ANG II into the RVLM are not related to any impairment of forebrain angiotensinergic mechanisms by the lesion.

Another aim was to study if glutamatergic receptor activation in the RVLM was necessary for the pressor response to central cholinergic or angiotensinergic activation. For this, male Holtzman rats with stainless steel cannulas implanted into the LV and bilaterally into the RVLM were used. The results showed no difference between the cardiovascular responses produced by carbachol into the LV after kynurenic acid (1 nmol/100 nl) bilaterally into the RVLM (36 ± 1 mmHg and 22 ± 10 bpm) when compared with control condition (39 ± 2 mmHg and 23 ± 14 bpm). Also, there was not difference between the cardiovascular responses produced by ANG II into the LV after kynurenic acid (1 nmol/100 nl) into the RVLM (28 ± 3 mmHg and 10 ± 13 bpm) when compared with control condition (26 ± 2 mmHg and -12 ± 5 bpm). This dose of kynurenic acid almost abolished the pressor response to glutamate (2 nmol/100 nl) injected into the RVLM but not the cardiovascular reflexes produced by baro and chemoreflex activation. Therefore, the pressor response to forebrain cholinergic or angiotensinergic activation does not depend on glutamatergic synapses in the RVLM. Besides, the results also showed that the pressor response to chemoreflex activation does not depend on release of glutamate into the RVLM.

INTRODUÇÃO

O bom funcionamento do sistema cardiovascular e, em particular, a manutenção de uma pressão arterial média (PAM) dentro de estreitas faixas de variação é importante para o fornecimento adequado de nutrientes para as células, garantindo a sobrevivência das mesmas. Mesmo que o sistema cardiovascular pudesse desenvolver seu papel na ausência do sistema nervoso central (SNC), é este último que detém os mecanismos refinados de ajustes capazes de regular e manter em níveis adequados a PAM, a resistência periférica, a frequência cardíaca (FC) e o débito cardíaco. Aferências dos receptores periféricos que partem dos pressorreceptores, quimiorreceptores arteriais ou dos receptores cardiopulmonares, enviam continuamente informações para SNC sobre como se encontram a PAM, a concentração de gases no sangue, como por exemplo, o oxigênio (O_2) e o gás carbônico (CO_2) e o potencial hidrogeniônico (pH) do sangue. Os impulsos nervosos dos receptores periféricos relacionados com o controle cardiovascular são conduzidos pelos nervos vago e glossofaríngeo até o SNC, ou mais precisamente até a região dorsal do bulbo chamada de núcleo do trato solitário (NTS), onde essas aferências neurais fazem a primeira conexão sináptica, (Palkovits e Zaborsky, 1974). A partir do NTS, as informações provenientes dos receptores periféricos podem ser distribuídas para diversas áreas do encéfalo, dentre as quais destacam-se as áreas localizadas na região ventral do bulbo, como por exemplo, a área rostro ventrolateral do bulbo (RVL) e a área caudo ventrolateral do bulbo (CVL) que controlam a atividade simpática bem como o núcleo ambíguo (NA) que controla a atividade parassimpática sobre o sistema cardiovascular.

A área RVL localizada ventralmente ao NA contém os elementos necessários para a geração e manutenção do tônus vasomotor simpático (Guertzeinstein e Silver, 1974; Brown e Guyenet, 1984). Estudos eletrofisiológicos (Morrison e cols., 1989) bem como estudos anatômicos (Blessing e cols., 1981; Ross e cols., 1981) demonstraram que os neurônios pertencentes à área RVL projetam-se monossinápticamente para a coluna intermédio lateral (CIL) ativando o sistema nervoso simpático (Willette e cols., 1983; Arneric e cols., 1990; Guyenet, 1990; Araújo e cols., 1999; De Paula e Machado, 2001). Estimulação elétrica da área RVL produz aumento na pressão arterial e nas concentrações plasmáticas de vasopressina (ADH) e catecolaminas enquanto que inibição bilateral dos neurônios da área RVL com a neurotoxina tetrodoxina reduz a pressão arterial a níveis similares ao produzido pelo completo bloqueio do sistema nervoso autonômico (Ross e cols., 1984), confirmando o importante papel que a área RVL exerce sobre a PAM.

Uma outra área localizada na porção ventral do bulbo e que é importante na manutenção da atividade simpática é a área CVL (Granata e cols., 1986). Porém, o envolvimento da área CVL na manutenção da atividade simpática não parece ser através de conexões diretas para a CIL (Jansen e cols., 1995) mas sim sobre a atividade da área RVL que diretamente projeta-se para a CIL (Blessing e cols., 1981; Ross e cols., 1981; Morrison e cols., 1989). A área CVL contém neurônios que possuem atividade inibitória sobre a área RVL via projeções gabaérgicas (Urbanski e Sapru, 1988). Em outras palavras, através da conexão monossináptica direta existente entre a área CVL e a área RVL (Ross e cols., 1985), a atividade simpática é modulada momento a momento por meio do barorreflexo (Agarwal e

Calaresu, 1991) quanto por mecanismos independentes de barorreflexo (Cravo e cols., 1991). Em última análise, a área CVL possui atividade antagônica a área RVL, ou seja, a ativação da área CVL promove queda na PAM, frequência cardíaca (FC) e atividade simpática (Ciriello e cols., 1986; Maeda e cols., 1991).

Porém, mesmo sabendo da importância que as áreas bulbares possuem na manutenção da atividade simpática e pressão arterial, em ratos não anestesiados, discute-se a possibilidade de outras áreas também participarem de maneira decisiva nos ajustes cardiovasculares influenciando a atividade de áreas bulbares (Guyenet, 2006). Além disso, estudo de Dampney e cols., (2000) mostra que a área RVL recebe influências tanto excitatórias quanto inibitórias e essas influências vindas de outras áreas do SNC bem como dos receptores periféricos exercem um controle regulatório nas atividades cardiovasculares (Lovick e Li, 1989; Guyenet, 1990). Estudos já demonstraram existir conexões entre as áreas bulbares envolvidas na regulação cardiovascular e as áreas localizadas nas porções anteriores do encéfalo, ou seja, áreas prosencefálicas (Ricardo e Koh, 1978; Lind e cols., 1982; Saper e cols., 1983; Saper e Levisohn, 1983; Hardy, 2001; Babic e cols., 2004; Card e cols., 2006).

Recentes estudos feitos em ratos não anestesiados mostraram que a integridade da região anteroventral do terceiro ventrículo (AV3V) localizada no prosencéfalo é importante para o aparecimento das respostas pressoras produzidas pela injeção do aminoácido excitatório glutamato em área bulbares, como por exemplo, no NTS intermediário (Vieira e cols., 2004) e na área RVL (Vieira e cols., 2006). O aminoácido excitatório glutamato é considerado o principal neurotransmissor liberado nas áreas bulbares ventrais envolvidas na regulação

cardiovascular (Talman e cols., 1980; Machado e Bonagamba, 1992; Gordon e Talman, 1992; Vardhan e cols., 1993; Zhang e Mifflin, 1993; Sved e Gordon, 1994; Colombari e cols., 1994; Haibara e cols., 1995).

A região AV3V é constituída pelo órgão vascularizado da lâmina terminal (OVLT), que é altamente vascularizado e livre de barreira hemato-encefálica (BHE) e está localizado na parede anterior do terceiro ventrículo. Por estar livre de BHE, o OVLT tem a capacidade de detectar alterações de substâncias químicas presentes no sangue, como por exemplo, ANG II (Mckinley e cols., 2001). Além disso, a região AV3V é formada pelo tecido periventricular da região preóptica e da porção anterior da área hipotalâmica anterior e pela parte ventral do núcleo preóptico mediano (Brody e cols., 1978,1984; Brody e Johnson, 1980). A região AV3V tem destacada importância no controle cardiovascular e no equilíbrio hidroeletrólítico. Além da atenuação das respostas pressoras produzidas pela injeção de glutamato no NTS e na área RVL (Vieira e cols., 2004,2006), a lesão eletrolítica da região AV3V impede o desenvolvimento de diversas formas de hipertensão experimental em ratos, com exceção da hipertensão espontânea (Brody e cols, 1978; Brody e cols, 1984; Brody & Johnson, 1980; Menani e cols, 1988a; Menani e cols, 1988b).

Esta mesma lesão também bloqueia as respostas pressoras, assim como a ingestão de água induzida por ANG II periférica ou central ou também por injeção central do agonista colinérgico carbacol (Brody e cols, 1978; Brody & Johnson, 1980; Menani e cols, 1990; Colombari e cols, 1992a; Colombari e cols, 1992b; Valladão e cols, 1992). A lesão eletrolítica da região AV3V também atenua a resposta pressora produzida pela oclusão bilateral das carótidas comuns em ratos

(Menani e cols, 1988a). Desta forma podemos observar que a integridade da região AV3V é importante para muitas das respostas dependentes do aumento de atividade simpática (Vieira e cols., 2004,2006; Menani, 1990).

A resposta pressora do glutamato injetado tanto no NTS quanto na área RVL é abolida e atenuada, respectivamente, em ratos não anestesiados e com lesão aguda (1 dia) ou crônica (15 dias) da região AV3V (Vieira e cols., 2004,2006). Esses dados sugerem a existência de algum mecanismo funcional facilitatório localizado no prosencéfalo, nesse caso dependente da região AV3V, que é importante para a resposta pressora produzida pela ativação glutamatérgica em áreas bulbares de ratos não anestesiados.

Porém, além da neurotransmissão glutamatérgica, existem outros neurotransmissores que agindo na área RVL contribuem para a regulação cardiovascular como a serotonina, as catecolaminas, os opióides, os corticosteróides (Li e cols., 1995; Rattan e Tejwani, 1996), os aminoácidos inibitórios (Lacerda e cols., 2003; Menezes e Fontes, 2007) bem como a acetilcolina e o peptídeo ANG II (Kubo e cols., 2000; Dampney e cols., 2002).

Particularmente, a acetilcolina e a ANG II recebem maior atenção, pois trabalhos mostram que mecanismos colinérgicos e angiotensinérgicos podem estar envolvidos em quadros de hipertensão (Kubo e cols., 1995; Philips e cols., 1996; Kubo e cols., 1997; Tanaka, 2003; Kubo e Hagiwara, 2004) até mesmo em co-atividade com a neurotransmissão glutamatérgica (Willette e cols., 1984; Morrison e cols., 1989; Bazil e Gordon, 1991; Feldman e Bucaffusco, 1997; Kubo e cols., 2000; Carvalho e cols., 2003). A área RVL possui receptores colinérgicos e angiotensinérgicos (Arneric e cols., 1990; Allen e cols., 1998; Hu e cols., 2002).

Agindo na área RVL, a exemplo do glutamato (De Paula e Machado 2001, Vieira e cols., 2006), tanto a acetilcolina quanto a ANG II ativam o sistema nervoso simpático e aumentam a pressão arterial (Punnen e cols., 1986; Giuliano e cols., 1989; Hirooka e cols., 1997; Sasaki e Dampney, 1990; Fontes e cols., 1997; Kubo e cols., 2000; Becker e cols., 2005).

Por essa razão, torna-se bastante interessante estudar se a exemplo do glutamato, as respostas pressoras da injeção de ANG II e do agonista colinérgico carbacol na área RVL dependem da integridade da região AV3V.

Além daqueles localizados na área RVL, os receptores colinérgicos e angiotensinérgicos estão presentes em diversas áreas do SNC (Levey e cols., 1995; Lenkei e cols., 1997) e são importantes na regulação cardiovascular.

Em se tratando de receptores colinérgicos, uma grande parte são dos subtipos muscarínicos e estes se dividem em 5 tipos (subtipo M1 a subtipo M5). Os diferentes subtipos de receptores colinérgicos muscarínicos possuem diferentes localizações no SNC (Martin, 1992; Levey e cols., 1995). Ainda, os receptores colinérgicos estão presentes em áreas hipotalâmicas e prosencefálicas e dentre essas áreas inclui-se o órgão subfornical (OSF) e as áreas pertencentes à região AV3V (Li e cols., 1997; Xu e cols., 2000; Shibata e cols., 2006). A injeção de carbacol no ventrículo lateral (VL) de ratos não anestesiados produz resposta pressora por aumento de atividade simpática e secreção de ADH e esta resposta é dependente da integridade da região AV3V (Menani e cols., 1990). Além disso, um estudo utilizando a técnica de C-Fos (marcação neuronal) demonstrou que os principais sítios de ação do carbacol injetado no VL são as áreas pertencentes à região AV3V (Xu e cols., 2000). Ademais, trabalhos anteriores (De Luca Jr e cols.,

1991; Colombari e cols., 1992a; Colombari e cols., 1992b; Valladão e cols., 1992; Gonçalves e cols., 1992) mostraram que muitas respostas produzidas pela estimulação colinérgica em diferentes áreas encefálicas, como por exemplo, OSF, área septal, hipotálamo ventromedial, área preóptica lateral e locus coeruleus são abolidas com a lesão da região AV3V que também reduz a resposta pressora produzida pela injeção de glutamato na área RVL (Vieira e cols., 2006).

Além dos receptores colinérgicos, estão presentes na região AV3V receptores angiotensinérgicos (Lenkei e cols., 1997) importantes na regulação cardiovascular (Buggy e Johnson, 1978; De Luca Jr e cols., 2000). É bem conhecido na literatura que mecanismos angiotensinérgicos estão envolvidos na regulação da atividade simpática (Dampney e cols., 2002) e na neurotransmissão em áreas pertencentes a região AV3V (Plunkett e cols., 1987). A injeção intracerebroventricular (i.c.v.) de ANG II causa aumento na PAM (De Luca Jr., 2000) e esse aumento é atenuado após bloqueio do sistema nervoso simpático com injeção endovenosa de prazosin e totalmente bloqueado após duplo bloqueio com prazosin e antagonista vasopressinérgico V1 (Lappe e cols., 1984).

Visto que a integridade da região AV3V é importante para as respostas pressoras da injeção i.c.v. de carbacol e ANG II bem como para as respostas pressoras da injeção de glutamato na área RVL, uma questão a ser estudada é se o comprometimento da resposta pressora do glutamato na área RVL é devido ao fato de que mecanismos angiotensinérgicos ou colinérgicos centrais estejam sendo prejudicados pela lesão da região AV3V. Uma das maneiras interessantes para se testar essa hipótese seria injetando centralmente através de injeções i.c.v. os antagonistas específicos para receptores colinérgico ou angiotensinérgico.

Porém, é preciso considerar que injetando-se i.c.v. os antagonistas colinérgicos ou angiotensinérgicos, dependendo da dose utilizada, pode-se bloquear tanto os receptores prosencefálicos quanto os presentes em áreas bulbares, inclusive na área RVL. Por esse motivo, para se tentar discriminar os possíveis sítios de ação dos antagonistas, torna-se necessário se testar também o efeito do bloqueio local dos receptores colinérgicos e angiotensinérgicos da área RVL frente à ativação dos neurônios glutamatérgicos na área RVL.

A injeção i.c.v. de carbacol ou ANG II ativa principalmente os neurônios pertencentes à região AV3V para produzir respostas pressoras que é dependente de atividade simpática e secreção de vasopressina (Hoffman e cols., 1977; Lappe e cols., 1984; Imai e cols., 1989; Menani e cols., 1990; Xu e cols., 2000). O principal sítio de ativação dos neurônios pré-ganglionares simpáticos é a área RVL (Willette e cols., 1983; Arneric e cols., 1990; Guyenet, 1990) e um dos principais neurotransmissores envolvidos na manutenção da atividade simpática na área RVL é o glutamato (Talman e cols., 1980; Gordon e Talman, 1992).

Porém, trabalho de Kiely e Gordon (1994) mostrou que mecanismos glutamatérgicos localizados na área RVL são importantes para a resposta pressora à estimulação do nervo ciático, mas não para a resposta pressora à estimulação elétrica do NPV. Esses dados sugerem que existem mecanismos localizados no hipotálamo que causam respostas pressoras, mas não dependem de sinapses glutamatérgicas na área RVL. No entanto, a estimulação elétrica é inespecífica, ou seja, pode estimular diferentes neurônios e mecanismos o que dificulta a interpretação dos resultados. O NPV possui mecanismos angiotensinérgicos e colinérgicos importantes na regulação cardiovascular (Kubo e

cols., 2000; Chen e Pan, 2007). A injeção de carbacol e ANG II no VL ativa neurônios hipotalâmicos, principalmente os localizados na região AV3V causando resposta pressora (Lappe e cols., 1984; Menani e cols., 1990; Xu e cols., 2000). Por isso, uma questão a ser respondida seria sobre o envolvimento dos mecanismos glutamatérgicos na área RVL nas respostas pressoras produzidas pela ativação específica dos mecanismos colinérgicos e angiotensinérgicos centrais através da injeção i.c.v. de carbacol ou ANG II, respectivamente.

OBJETIVOS

Os objetivos do presente estudo foram estudar em animais não anestesiados: 1) se a integridade da região AV3V é importante para as respostas cardiovasculares produzidas pela injeção de carbacol ou ANG II na área RVL; 2) os efeitos do bloqueio colinérgico central com injeção de atropina (antagonista colinérgico muscarínico) ou bloqueio angiotensinérgico com losartan ou ZD 7155 (antagonistas angiotensinérgicos) no ventrículo lateral (VL) nas respostas pressoras produzidas pela injeção de glutamato na área RVL; 3) os efeitos produzidos por injeções bilaterais do antagonista glutamatérgico ácido quinurênico na área RVL nas respostas pressoras produzidas pela injeção de carbacol ou ANG II no VL.

MATERIAIS E MÉTODOS

1-Animais

Foram utilizados ratos Holtzman pesando entre 280-300 g, fornecidos pelo Biotério das Faculdades de Odontologia e Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, campus de Araraquara. Os ratos foram mantidos em gaiolas individuais em sala com temperatura (22 ± 2 °C) e humidade ($55 \pm 10\%$) controlada e ração Guabi e água *ad libitum*. Os protocolos experimentais utilizados para os presentes estudos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual Paulista (UNESP-Araraquara – processo n°. 01/05).

2-Cirurgia cerebral

2.1- Ratos com lesão eletrolítica aguda (1 dia) da região AV3V.

Os ratos foram anestesiados com ketamina (80 mg/kg de peso corporal) + xilazina (7 mg/kg de peso corporal) e adaptados a um aparelho estereotáxico (modelo Kopf 900). O lambda e o bregma foram utilizados como referência para nivelar as cabeças dos ratos. Utilizando-se o bregma foi determinado o ponto de introdução do eletrodo na cabeça dos ratos. Nesse ponto foi feita trepanação do osso do crânio com uma broca esférica, abrindo-se um orifício de aproximadamente 1,5 mm de diâmetro. Para a lesão eletrolítica da região AV3V, um eletrodo de tungstênio (0,4 mm de diâmetro) foi introduzido no cérebro do rato 0,0 mm do bregma, na linha média e numa profundidade de 7 mm abaixo da dura-

máter. A lesão foi feita pela passagem de uma corrente elétrica de 2 mA durante 10 segundos. Ratos com lesão fictícia foram submetidos aos mesmos procedimentos cirúrgicos, com exceção da passagem da corrente elétrica.

Imediatamente após a lesão da região AV3V, utilizando-se do segundo braço do estereotáxico, foi implantada cânula unilateralmente na área RVL utilizando-se as mesmas coordenadas citadas acima.

2.2- Ratos com lesão eletrolítica crônica (15 dias) da região AV3V.

Quinze dias antes dos experimentos, os ratos foram anestesiados com ketamina (80 mg/kg de peso corporal) + xilazina (7 mg/kg de peso corporal) e adaptados a um aparelho estereotáxico (modelo Kopf 900). Os procedimentos para a lesão da região AV3V foram os mesmos citados no item acima. Os ratos foram colocados em gaiolas individuais para recuperação.

Cinco dias antes dos experimentos, os ratos foram novamente anestesiados e adaptados ao estereotáxico para implante de cânula unilateralmente na área RVL utilizando-se as mesmas coordenadas citadas acima.

2.3- Ratos com bloqueio colinérgico ou angiotensinérgico central (VL).

Os ratos foram anestesiados com ketamina (80 mg/kg de peso corporal) + xilazina (7 mg/kg de peso corporal) e adaptados a um aparelho estereotáxico (modelo Kopf 900) com dois braços. Utilizando-se o bregma foram determinados os pontos de introdução da cânula de aço inoxidável nas cabeças dos ratos.

Nesses pontos foram feitas trepanações do osso do crânio com uma broca esférica. Para a área RVL, as cânulas foram posicionadas 3,6 mm caudal ao lambda, 1,9 mm lateral e 7,0 mm abaixo da dura-máter. Nesses ratos, além do implante de cânulas unilateralmente na área RVL também foi implantada cânula no ventrículo lateral (VL) utilizando-se do outro braço do estereotáxico. Para o implante no VL foram utilizadas as seguintes coordenadas: -0,3 mm caudal ao bregma, 1,6 mm lateral e -3,7 mm abaixo do osso do crânio. As cânulas foram fixadas nas cabeças dos ratos com resina acrílica presa a dois parafusos presos na calota craniana.

2.4- Ratos com bloqueio colinérgico ou angiotensinérgico local (RVL).

Os ratos foram anestesiados com ketamina (80 mg/kg de peso corporal) + xilazina (7 mg/kg de peso corporal) e adaptados a um aparelho estereotáxico (modelo Kopf 900). O lambda e o bregma foram utilizados como referência para nivelar as cabeças dos ratos.

Utilizando-se o bregma foi determinado o ponto de introdução da cânula de aço inoxidável nas cabeças dos ratos. Nesse ponto foi feita uma trepanação do osso do crânio com uma broca esférica. Para a área RVL, as cânulas foram posicionadas 3,6 mm caudal ao lambda, 1,9 mm lateral e 7,0 mm abaixo da dura-máter. As cânulas foram fixadas nas cabeças dos ratos com resina acrílica presa a dois parafusos presos na calota craniana.

2.5- Ratos com bloqueio bilateral na área RVL.

Os ratos foram anestesiados com ketamina (80 mg/kg de peso corporal) + xilazina (7 mg/kg de peso corporal) e adaptados a um aparelho estereotáxico (modelo Kopf 900) com dois braços. Utilizando-se o bregma foram determinados os pontos de introdução da cânula de aço inoxidável nas cabeças dos ratos. A primeira área implantada foi o VL utilizando-se as coordenadas citadas no item 2.1. Imediatamente o implante no VL e utilizando-se do segundo braço do estereotáxico, foram implantadas bilateralmente as cânulas na área RVL utilizando-se as seguintes coordenadas: 3,6 mm caudal ao lambda, 1,9 e -1,9 mm lateral e 7,0 mm abaixo da dura-máter. As cânulas foram fixadas nas cabeças dos ratos com resina acrílica presa a dois parafusos presos na calota craniana.

3-Injeção das drogas no cérebro

As drogas dissolvidas em solução salina fisiológica estéril foram injetadas no cérebro dos ratos utilizando-se uma seringa Hamilton (5 µl), conectada por um tubo de polietileno PE-10 a uma agulha injetora que foi introduzida no cérebro pela cânula guia previamente fixada no cérebro. A agulha injetora utilizada para a área RVL e para o VL foi 1,5 e 2,0 mm mais longa do que a cânula fixada no cérebro, respectivamente. O volume de injeção foi de 100 nl na área RVL e 1 µl no VL.

4-Drogas utilizadas

Glutamato sódico (2 e 5 nmol), acetilcolina (10 nmol), cloridrato de carbacol (1 nmol), ANG II (200 ng), metil brometo de atropina (4 nmol), losartan (10 µg), ZD 7155 (5 µg) ou ácido quinurênico (1 nmol) foram injetados na área RVL. Cloridrato de carbacol (4 nmol), ANG II (50 ng), metil brometo de atropina (4 nmol), losartan (100 µg) ou ZD 7155 (50 µg) foram injetados no VL. As drogas foram dissolvidas em salina estéril. Salina estéril foi injetada como controle.

Cloridrato de fenilefrina (5 µg/kg de peso corporal), nitroprussiato de sódio (30 µg/kg de peso corporal) e cianeto de potássio (KCN, 40 µg/0,1 ml/rato) foram injetados i.v. para se testar os reflexos cardiovasculares.

5- Medida da pressão arterial e frequência cardíaca

A pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) foram registradas em ratos não anestesiados submetidos a canulação prévia (um dia antes do registro) da artéria femoral com um tubo de polietileno PE 10, o qual estava conectado com um tubo de polietileno PE 50 que, conduzido subcutaneamente, foi exteriorizada pelo dorso do animal. O tubo PE 50 foi conectado a um transdutor de pressão (Stathan P 23 Db) acoplado a um sistema computadorizado de registro (Mac Lab/Power Lab). A veia femoral também foi canulada com tubo de PE 10 conectado com PE 50 e exteriorizado pelo dorso do animal para injeção das drogas periféricas (testes reflexos).

6-Histologia cerebral

Terminados os experimentos, os ratos foram profundamente anestesiados com tiopental sódico (70 mg/kg). A seguir foram submetidos a uma perfusão cerebral por meio de injeção no coração de solução salina tamponada (50 ml) seguida de perfusão com solução de formalina a 10% (50 ml). A seguir, os cérebros foram retirados e fixados em formalina 10% por alguns dias. Cortes transversais (50 μ m de espessura) nos pontos de injeção (área RVL e VL) bem como no sítio de lesão da região AV3V foram feitos com auxílio de um micrótomo de congelamento (Leica). Os cortes histológicos foram montados em lâminas, corados pelo método de Giemsa e analisados para se localizar os pontos das injeções na área RVL e VL e lesão da região AV3V.

7- Análise dos resultados

Os resultados foram tabelados nas planilhas do Excel. A média e o erro padrão da média foram representados em gráficos usando-se o programa Sigma-Plot. Foram utilizados a análise de variância e o teste de Newman Keuls para as comparações entre diferentes tratamentos. Diferenças foram consideradas significantes para $p < 0,05$.

EXPERIMENTOS REALIZADOS

1- Efeitos da lesão da região AV3V aguda (1 dia) nas respostas cardiovasculares produzidas pela injeção de ANG II ou carbacol na área RVL.

Em ratos com cânulas implantadas na área RVL e com lesão aguda (1 dia) da região AV3V, após um período de pelo menos 20 minutos de registro controle da PAM e FC foi injetada salina (100 nl) na área RVL. Passados 20 minutos foi injetada ANG II (200 μ g/100 nl) na área RVL e a PAM e FC foram registradas por mais 30 minutos.

No período da tarde, a PAM e FC foram novamente registradas nos mesmos animais e o mesmo procedimento executado pela manhã foi repetido, exceto que a injeção de ANG II na área RVL foi substituída pela injeção de carbacol (1 nmol/100 nl). No final dos experimentos, foram testados baro e quimiorreflexo com injeções iv de fenilefrina (5 μ g/kg de peso corporal), nitroprussiato de sódio (30 μ g/kg de peso corporal) e KCN (40 μ g/0.1 ml/rato). Foi aguardado sempre um período de no mínimo 5 minutos entre as duas injeções i.v.

2- Efeitos da lesão da região AV3V crônica (15 dias) nas respostas cardiovasculares produzidas pela injeção de ANG II ou carbacol na área RVL.

O mesmo protocolo citado no item 1 foi repetido nos animais com lesão crônica (15 dias) da região AV3V.

3- Efeitos do bloqueio colinérgico ou angiotensinérgico central (VL) nas respostas cardiovasculares produzidas pela injeção de glutamato na área RVL.

Em ratos com cânulas implantadas simultaneamente no VL e na área RVL, após um período de pelo menos 20 minutos de registro controle da PAM e FC foi injetada salina (100 nl) na área RVL. Após 15 minutos, foi injetada salina (1 µl) no VL e passados 15 minutos foi injetado glutamato (5 nmol/100 nl) na área RVL. No mesmo rato, uma hora após a primeira injeção de glutamato, foi realizado o bloqueio dos receptores colinérgicos ou angiotensinérgicos centrais com injeção de atropina metilada (4 nmol/1 µl) ou losartan (100 µg/1 µl), respectivamente no VL e 15 minutos após foi novamente injetado glutamato na área RVL. Dez minutos após a injeção de glutamato, baro e quimiorreflexo foram testados injetando-se fenilefrina (5 µg/kg), nitroprussiato de sódio (30 µg/kg) e cianeto de potássio (KCN - 40 µg/0,1 ml). Em seguida, carbacol (4 nmol/1 µl) ou ANG II (50 ng/1 µl) foi injetado no VL para se testar a eficiência do bloqueio colinérgico ou angiotensinérgico central, respectivamente.

4- Efeitos do bloqueio colinérgico ou angiotensinérgico da área RVL (bloqueio local) nas respostas cardiovasculares produzidas pela injeção de glutamato na mesma área.

Em ratos com cânulas unilaterais implantadas na área RVL, após um período de pelo menos 20 minutos de registro controle da PAM e FC, foi injetada salina (100 nl) e em seguida glutamato (5 nmol/100 nl). Após a injeção de glutamato, acetilcolina (10 nmol/100 nl) ou ANG II (200 ng/100 nl) foi injetado na

área RVL. O intervalo de tempo entre cada uma dessas injeções na área RVL foi de 15 minutos. Uma hora após, foi injetada atropina metilada (4 nmol/100 nl) ou losartan (10 µg/100 nl) na área RVL e 15 minutos após foi novamente injetado glutamato na área RVL, seguido da injeção de acetilcolina (10 nmol/100 nl) ou ANG II (200 ng/100 nl) também na área RVL 15 minutos após para se testar a eficiência do bloqueio colinérgico ou angitensinérgico local (RVL).

5 - Efeitos do bloqueio angiotensinérgico central (VL) ou local com ZD 7155 nas respostas cardiovasculares produzidas pela injeção de glutamato na área RVL.

O protocolo utilizado foi o mesmo citado acima, no item 3. A única mudança foi o uso de um outro antagonista angiotensinérgico de receptores do subtipo AT1 ZD 7155 (50 µg/1 µl) no VL.

6 - Efeitos do bloqueio angiotensinérgico local (RVL) com ZD 7155 nas respostas cardiovasculares produzidas pela injeção de glutamato na área RVL.

O protocolo utilizado foi o mesmo citado acima, no item 4. A única mudança foi o uso de um outro antagonista angiotensinérgico de receptores do subtipo AT1 ZD 7155 (5 µg/100 nl) na área RVL.

7- Efeitos do bloqueio angiotensinérgico central (VL) nas respostas cardiovasculares produzidas pela injeção de ANG II na área RVL.

Em ratos com cânulas implantadas simultaneamente no VL e na área RVL, após um período de pelo menos 20 minutos de registro controle da PAM e FC foi injetada salina (100 nl) na área RVL. Após 15 minutos, foi injetada salina (1 µl) no VL e passados mais 15 minutos foi injetada ANG II (200 ng/100 nl) na área RVL. Uma hora depois, realizou-se o bloqueio dos receptores angiotensinérgicos centrais com injeção de losartan (100 µg/1 µl) no VL e 15 minutos após foi novamente injetada ANG II (200 ng/100 nl) na área RVL. Dez minutos após, ANG II (50 ng/1 µl) foi injetada no VL para se testar a eficiência do bloqueio angiotensinérgico central.

8 - Efeitos da prévia injeção de ANG II na área RVL nas respostas cardiovasculares produzidas pela injeção de glutamato na mesma área.

Em ratos com cânulas unilaterais implantadas na área RVL, após um período de pelo menos 20 minutos de registro controle da PAM e FC, foi injetada salina (100 nl) e em seguida glutamato (5 nmol/100 nl). Uma hora após a injeção de glutamato, ANG II (50 ng/ 100 nl) foi injetado na área RVL. Passados 10 minutos, novamente foi injetado glutamato (5 nmol/100 nl) na área RVL.

9- Efeitos de bloqueio glutamatérgico bilateralmente na área RVL nas respostas cardiovasculares produzidas pela injeção de ANG II ou carbacol no VL.

Em ratos com cânulas implantadas simultaneamente na área RVL (bilateralmente) e no VL, após um período de pelo menos 20 minutos de registro controle da PAM e da FC, foi injetado ácido quinurênico (1 nmol/100 nl) bilateralmente na área RVL. Após 10 minutos, foi injetado glutamato (2 nmol/100 nl) na área RVL. Passados mais 10 minutos foi injetado ANG II (50 ng/1 µl) ou carbacol (4 nmol/1 µl) no VL. No final do experimento, foram testados baro e quimiorreflexo injetando-se fenilefrina (5 µg/kg), nitroprussiato de sódio (30 µg/kg) e cianeto de potássio (KCN - 40 µg/0,1 ml). No outro dia, nos mesmos ratos, após um período de pelo menos 20 minutos de registro controle da PAM e da FC, foi injetada salina bilateralmente na área RVL. Após 10 minutos, foi injetado glutamato (2 nmol/100 nl) na área RVL para se obter a resposta pressora controle. Passados mais 10 minutos foi injetado ANG II (50 ng/1 µl) ou carbacol (4 nmol/1 µl) no VL. No final do experimento, foram testados baro e quimiorreflexo.

10- Efeitos de bloqueio glutamatérgico bilateralmente na área RVL nos parâmetros respiratórios (Volume corrente, frequência respiratória e ventilação pulmonar)

Em alguns animais, simultaneamente ao registro da PAM e FC, também foram registrados os parâmetros respiratórios antes e após injeções de salina ou ácido quinurênico (1 nmol/100 nl) bilateralmente na área RVL.

As medidas da ventilação pulmonar (VE) foram obtidas por pletismografia de corpo inteiro (Bartlett e Tenney, 1970). Os ratos permaneceram dentro de uma câmara vedada. O volume de ar corrente que o animal inspira é aquecido, da temperatura da câmara à temperatura corporal e saturado com vapor de água. Ao expirar, o volume de corrente do animal é esfriado até a temperatura da câmara, havendo perda de vapor de água. Nessa situação de aquecimento e umedecimento do ar inspirado e o esfriamento e a desidratação do ar expirado ocorrem pequenas mudanças de pressão, que podem ser detectadas por um transdutor sensível conectado à câmara de acrílico, onde o animal pode se locomover livremente. A câmara tinha conexão com o transdutor diferencial de pressão e com outra câmara de referência, a qual evita artefatos de medida provocados pela variação de pressão dentro do laboratório, como a abertura de portas. Além disto, a câmara estava equipada com um termômetro e uma seringa para calibração.

Durante as medidas de ventilação, o fluxo foi interrompido e a câmara selada por curtos períodos de tempo (~ 2 min) e as oscilações na temperatura do ar causadas pela respiração puderam ser medida como oscilações na pressão. Os sinais detectados pelo transdutor diferencial de pressão foram coletados por um registrador o qual foi conectado a um conversor analógico-digital. Isto permitiu a digitalização dos sinais em um microcomputador, utilizando um programa de aquisição de dados. Os dados foram analisados através do excel, permitindo a obtenção da frequência respiratória (f_R) e da amplitude do sinal (P_T). O volume corrente (V_T) foi calculado através da fórmula abaixo (Bartlett e Tenney, 1970). A calibração do volume foi feita antes e durante cada experimento por injeção na

câmara de uma quantidade conhecida de ar (1 ml) usando uma seringa graduada. A ventilação pulmonar foi calculada multiplicando o V_T pela f_R . Segundo Bartlett e Tenney (1970) medidas diretas de VE por pneumotacografia resultam em valores bastante próximos daqueles obtidos por pletismografia.

$$V_T = \frac{PT}{PK} \times VK \times \frac{TC}{TR} \times \frac{(PB - PC)}{(PB-PC) - \frac{TC}{T_b} \times (PB-PR)}$$

Símbolos da equação:

VT: Volume de ar corrente.

VK: Volume de ar injetado na câmara do animal para calibração.

PT: Deflexão de pressão associada com cada volume de ar corrente.

PK: Deflexão de pressão associada ao volume injetado para calibração.

T_b: Temperatura corporal (em Kelvin)

TC: Temperatura do ar dentro da câmara do animal.

PB: Pressão barométrica.

PR: pressão de vapor de água a temperatura corporal.

PC: pressão de vapor de água na camara do animal.

TR: temperatura ambiente

11 - Teste do baro e quimiorreflexo

O barorreflexo foi testado através da injeção (iv) de uma dose pressora de fenilefrina (5 µg/Kg) e depressora de nitroprussiato de sódio (30 µg/Kg). O quimiorreflexo foi testado através da injeção (iv) de cianeto de potássio (40 µg/0,1 ml/rato).

RESULTADOS

1- Efeitos da lesão aguda (1 dia) da região AV3V nas respostas cardiovasculares produzidas pela injeção de ANG II ou carbacol na área RVL.

A PAM basal dos animais não foi modificada pela lesão aguda (1 dia) da região AV3V (117 ± 5 vs. lesão fictícia: 111 ± 2 mmHg), [F(1,12) = 1,284; $p > 0,05$].

A resposta pressora produzida pela injeção de ANG II (200 ng/100 nl) na área RVL dos ratos com lesão aguda da região AV3V (12 ± 3 mmHg) foi menor do que aquela produzida pela mesma dose de ANG II injetada na área RVL dos animais com lesão fictícia (26 ± 4 mmHg). A resposta pressora produzida pela injeção de carbacol (1 nmol/100 nl) na área RVL não foi modificada pela lesão aguda da região AV3V (38 ± 4 mmHg vs. lesão fictícia: 34 ± 4 mmHg), [F(5,38) = 37,610; $p < 0,05$], (Figura 1). A FC basal dos animais com lesão aguda da região AV3V (408 ± 22 bpm) foi maior do que a FC basal dos animais com lesão fictícia (350 ± 14 bpm), [F(1,12) = 5,331; $p < 0,05$].

As injeções de ANG II ou carbacol na área RVL de ratos com lesão aguda da região AV3V ou lesão fictícia não produziram modificações significantes da FC, [F(5,38) = 1,627; $p > 0,05$], (Figura 1).

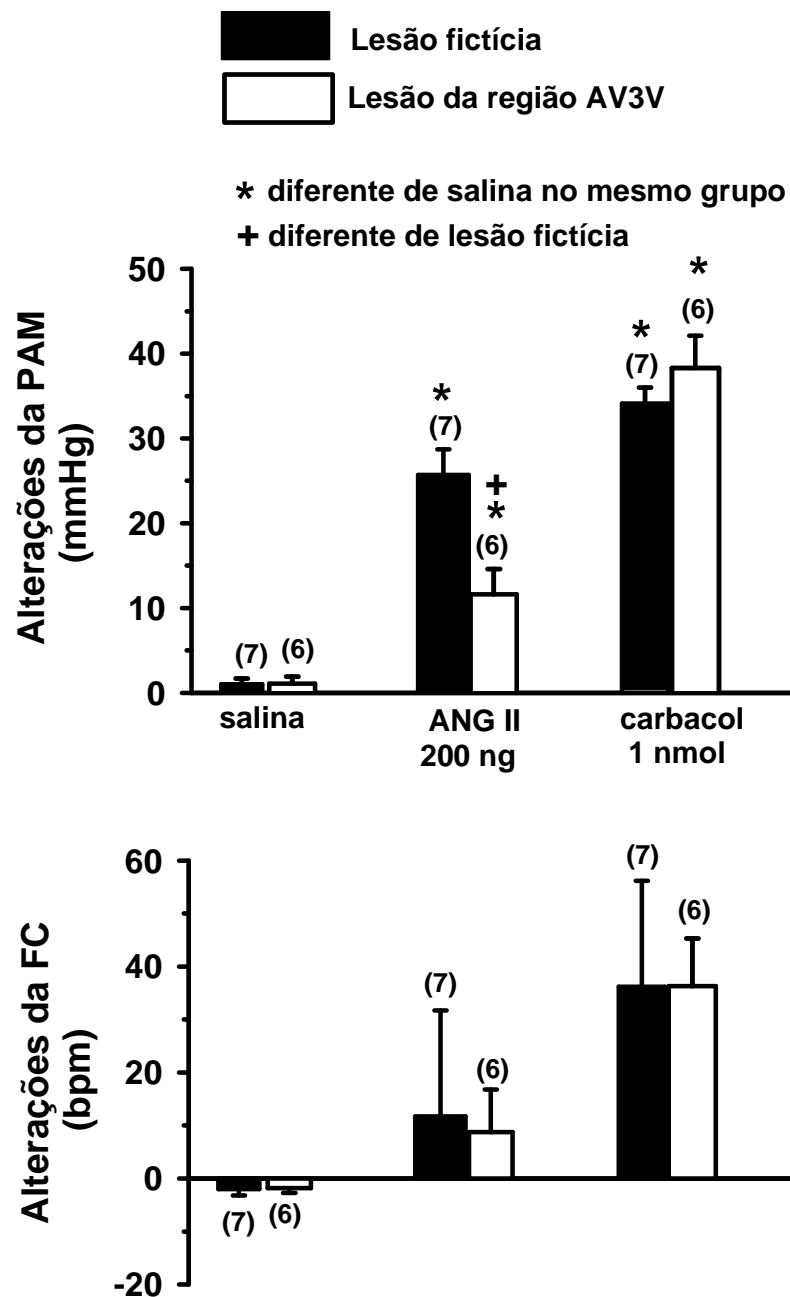


Figura 1: Alterações da pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) produzidas pela injeção de ANG II (200 ng/100 nl) ou carbacol (1 nmol/100 nl) na área RVL de ratos com lesão aguda (1 dia) da região AV3V ou lesão fictícia. Os resultados estão expressos como médias \pm EPM. Entre parênteses está indicado o número de animais.

2- Efeitos da lesão crônica (15 dias) da região AV3V nas respostas cardiovasculares produzidas pela injeção de ANG II ou carbacol na área RVL.

A PAM basal dos animais não foi modificada pela lesão crônica da região AV3V (107 ± 3 vs. lesão fictícia: 112 ± 4 mmHg), [F(1,14) = 0,939; $p > 0,05$].

A resposta pressora produzida pela injeção de ANG II (200 ng/100 nl) na área RVL dos ratos com lesão crônica da região AV3V (12 ± 5 mmHg) foi menor do que aquela produzida pela mesma dose de ANG II injetada na área RVL dos animais com lesão fictícia (27 ± 4 mmHg). A resposta pressora produzida pela injeção de carbacol (1 nmol/100 nl) na área RVL não foi modificada pela lesão crônica da região AV3V (29 ± 3 mmHg vs. lesão fictícia: 34 ± 5 mmHg), [F(5,43) = 16,736; $p < 0,05$], (Figura 2).

A FC basal dos animais com lesão crônica da região AV3V não foi diferente da FC basal dos animais com lesão fictícia (371 ± 12 vs. lesão fictícia: 353 ± 15 bpm), [F(1,14) = 0,850; $p > 0,05$].

As injeções de ANG II ou carbacol na área RVL de ratos com lesão crônica da região AV3V ou lesão fictícia não produziram modificações significantes da FC, [F(5,43) = 1,007; $p > 0,05$], (Figura 2).

Na figura 3 estão apresentados os registros da PAP, PAM e FC de um rato controle, um rato com lesão da região AV3V aguda e um rato com lesão da região AV3V crônica ilustrando as respostas típicas produzidas pelas injeções de ANG II e carbacol na área RVL em cada um dos respectivos grupos.

As injeções de ANG II (200 ng/100 nl) ou carbacol (1 nmol/100 nl) fora da área RVL não produziram alterações na PAM e FC (Tabela 1). Nesses animais 5

injeções foram feitas lateralmente à área RVL, 3 medialmente à área RVL e 5 dorsalmente à área RVL.

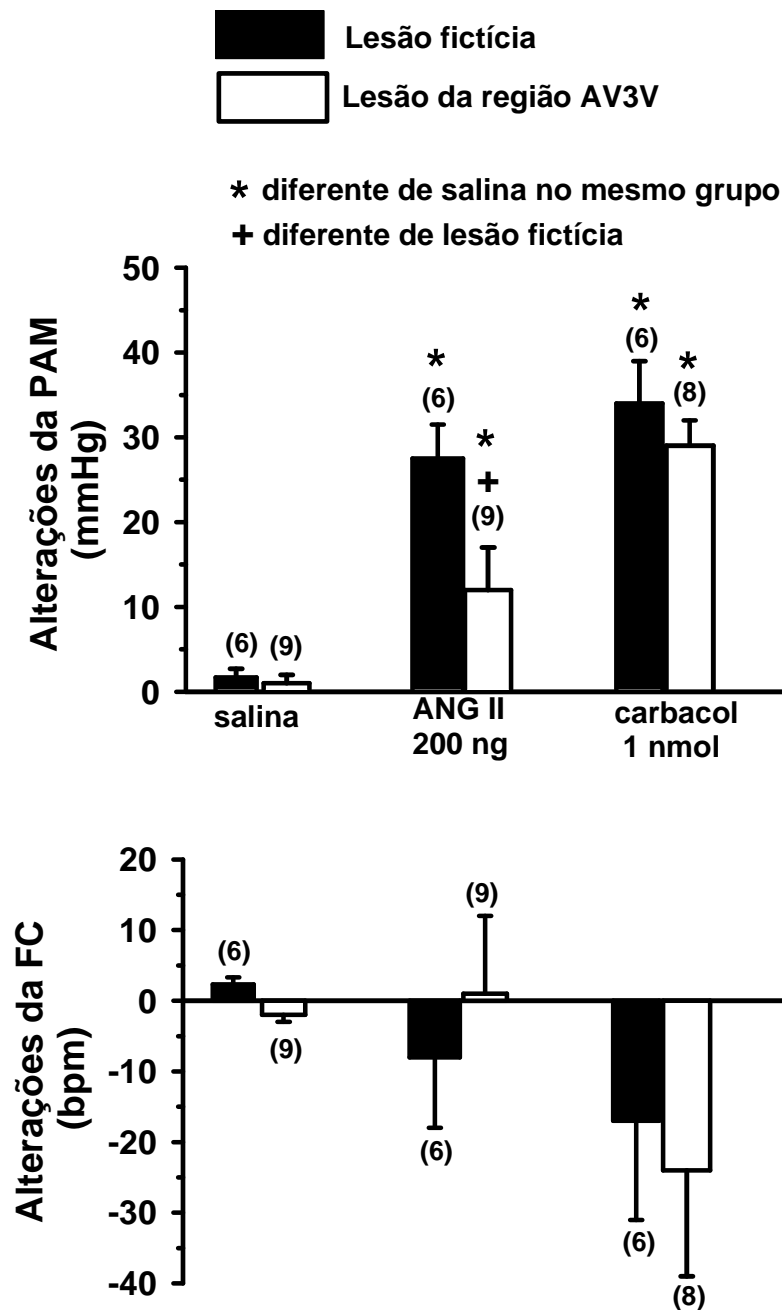


Figura 2: Alterações da pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) produzidas pela injeção de ANG II (200 ng/100 nl) ou carbacol (1 nmol/100 nl) na área RVL de ratos com lesão crônica (15 dias) da região AV3V ou lesão fictícia. Os resultados estão expressos como médias \pm EPM. Entre parênteses está indicado o número de animais.

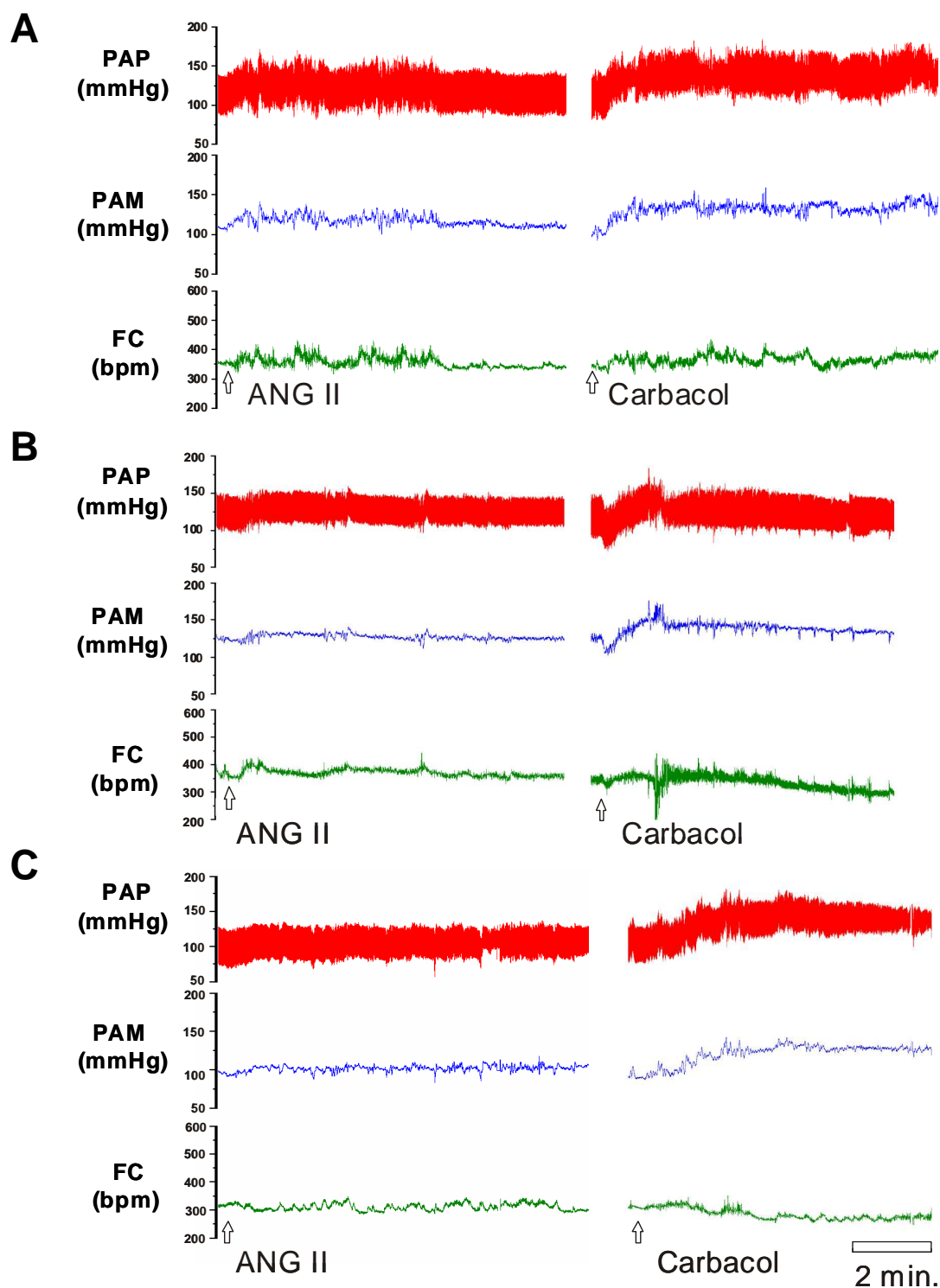


Figura 3: Registros representativos mostrando as alterações da pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) produzidas pela injeção de ANG II (200 ng/100 nl) ou carbacol (1 nmol/100 nl) na área RVL. (A) ratos controles, (B) ratos com lesão aguda (1 dia) e (C) ratos com lesão crônica (15 dias) da região AV3V.

Tabela 1: Alterações da PAM e FC produzidas pela injeção unilateral de ANG II ou carbacol fora da área RVL.

<u>Tratamento</u>	<u>ΔPAM (mmHg)</u>	<u>ΔFC (bpm)</u>
Salina	+1 \pm 1	+2 \pm 1
ANG II	+4 \pm 2	+2 \pm 3
Carbacol	+3 \pm 1	+4 \pm 3

Salina, ANG II (200 ng/100 nl) ou carbacol (1 nmol/100 nl). Δ PAM = alterações da pressão arterial média (mmHg); Δ FC = alterações da frequência cardíaca (bpm). Os resultados estão expressos como média \pm EPM. n = 13.

3- Efeitos do bloqueio colinérgico ou angiotensinérgico central (VL) nas respostas cardiovasculares produzidas pela injeção de glutamato na área RVL.

A PAM basal dos animais após a injeção de atropina (4 nmol/1 μ l) ou losartan (100 μ g/1 μ l) no VL (121 ± 3 e 119 ± 4 mmHg, respectivamente) não foi diferente da PAM basal dos animais antes do bloqueio colinérgico ou angiotensinérgico no início dos experimentos (123 ± 3 e 115 ± 4 mmHg, respectivamente), [F(3,39) = 0,80; p > 0,05].

A resposta pressora produzida pela injeção de glutamato (5 nmol/100 nl) na área RVL após o bloqueio colinérgico ou angiotensinérgico central com injeção de atropina ou losartan no VL (36 ± 5 e 22 ± 5 mmHg, respectivamente) foi menor do que aquela produzida pela mesma dose em condições controles (51 ± 4 mmHg) [F(3,43) = 28,17; p < 0,001] (Figura 4). Injeção de salina na área RVL não modificou a PAM (Figura 4).

A FC basal dos animais após a injeção de atropina (4 nmol/1 μ l) ou losartan (100 μ g/1 μ l) no VL (369 ± 12 e 354 ± 11 bpm, respectivamente) não foi diferente da FC basal dos animais antes do bloqueio colinérgico ou angiotensinérgico no início dos experimentos (342 ± 10 e 352 ± 16 bpm, respectivamente), [F(3,39) = 0,96; p > 0,05].

A injeção de glutamato (5 nmol/100 nl) na área RVL antes ou depois do bloqueio colinérgico ou angiotensinérgico central com injeção de atropina ou losartan, respectivamente, no VL não produziu modificações significantes da FC

[F(3,43) = 1,18; $p > 0,05$] (Figura 4). Injeção de salina na área RVL não modificou a FC (Figura 4).

Para confirmar se os receptores colinérgicos ou angiotensinérgicos estavam eficientemente bloqueados, no final dos experimentos foram feitas as injeções de carbacol (4 nmol/1 μ l) ou ANG II (50 ng/1 μ l) no VL nos diferentes grupos estudados. Após a injeção de atropina (4 nmol/1 μ l), a resposta pressora do carbacol no VL foi atenuada 78% [F(2,25) = 48,700; $p < 0,001$] (Figura 5) enquanto que a injeção do losartan (100 μ g/1 μ l) no VL praticamente aboliu a resposta pressora da ANG II no VL [F(2,23) = 72,038; $p < 0,001$] (Figura 6).

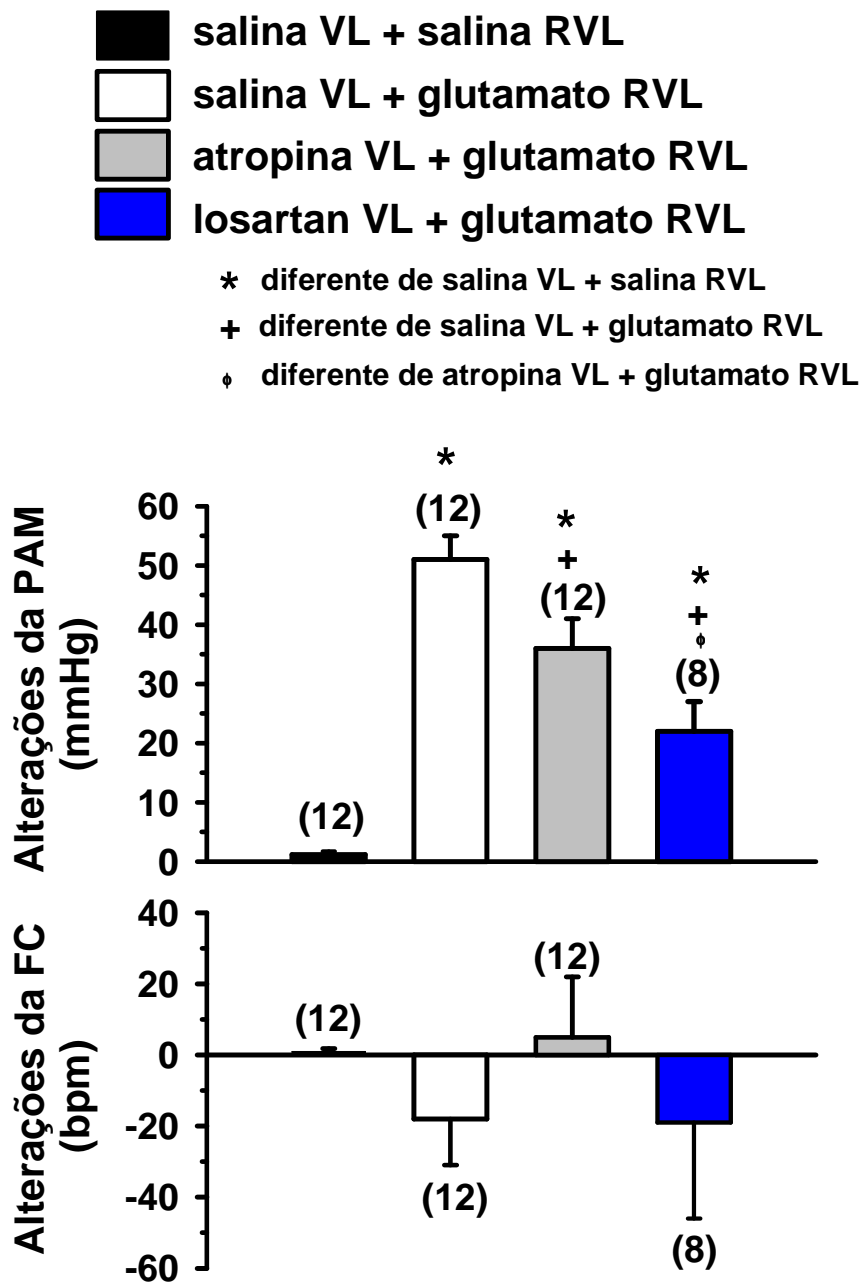


Figura 4: Alterações da pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) produzidas pela injeção de glutamato (5 nmol/100 nl) ou salina na área RVL após a injeção de salina, atropina (4 nmol/1 µl) ou losartan (100 µg/1 µl) no VL. Os resultados estão expressos como médias ± EPM. Entre parênteses está indicado o número de animais.

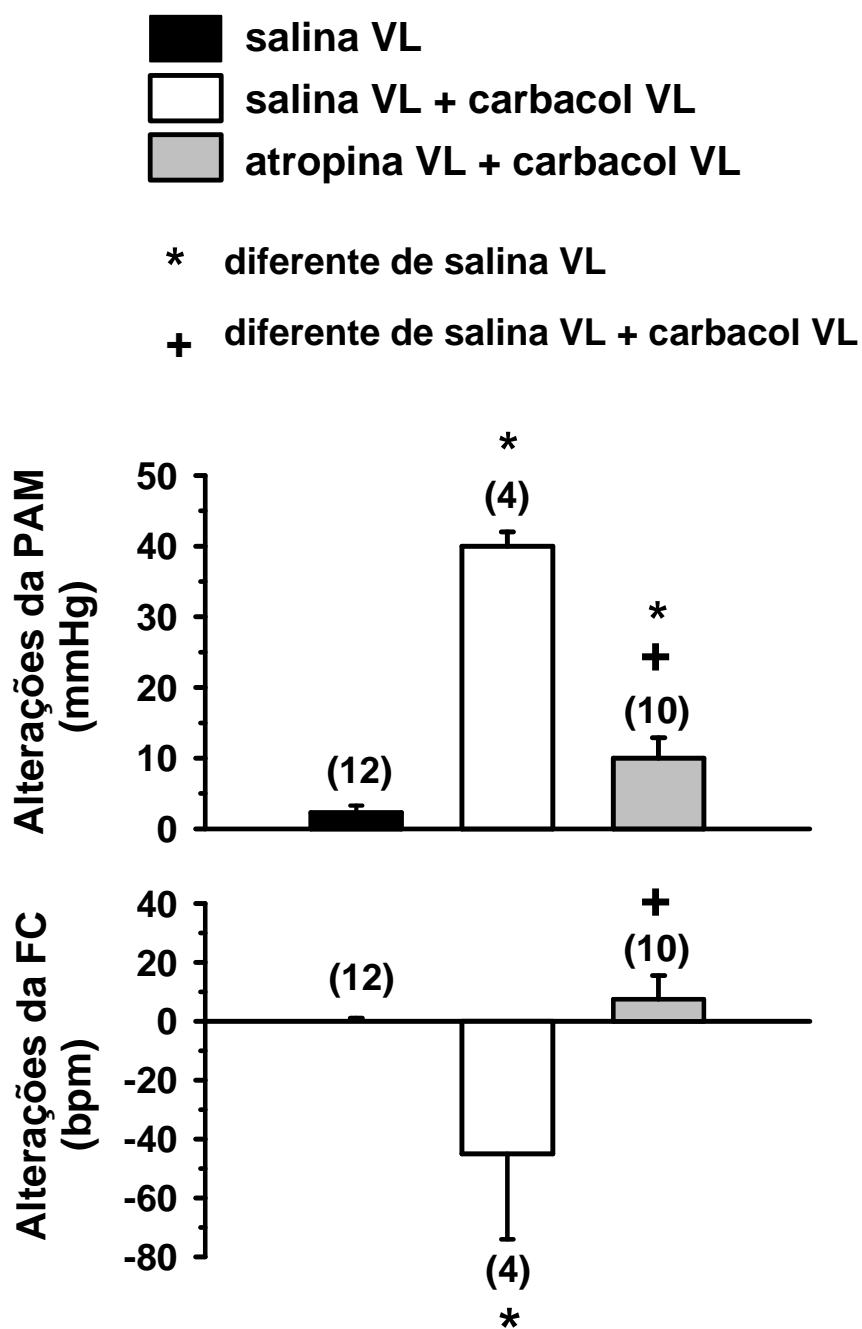


Figura 5: Alterações da pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) produzidas pela injeção de salina ou carbaccol (4 nmol/1 μ l) combinado com a injeção prévia de atropina (4 nmol/1 μ l) ou salina no VL. Os resultados estão expressos como médias \pm EPM. Entre parênteses está indicado o número de animais.

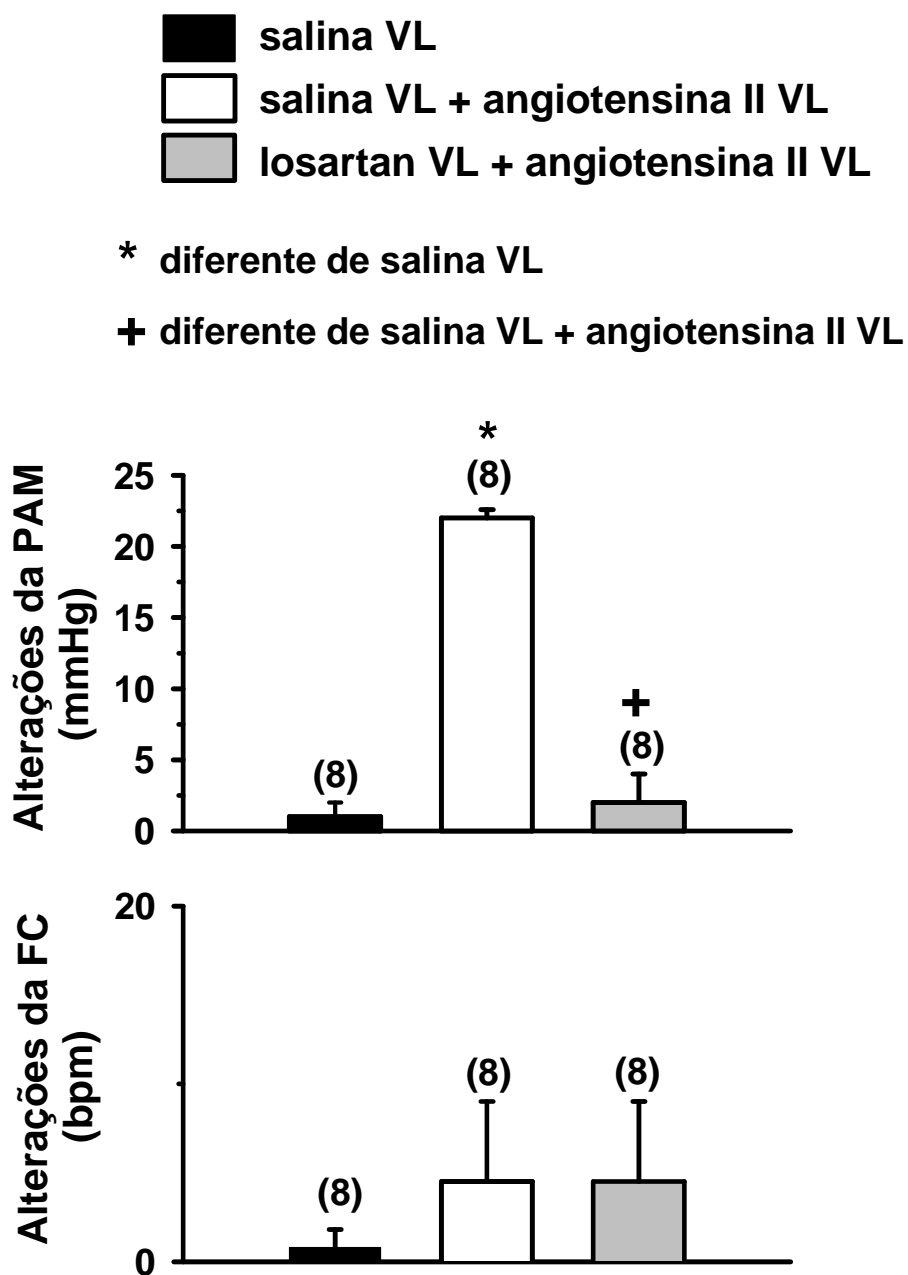


Figura 6: Alterações da pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) produzidas pela injeção de salina ou ANG II (50 ng/1 μ l) no VL combinada com a injeção prévia de losartan (100 μ g/1 μ l) ou salina no VL. Os resultados estão expressos como médias \pm EPM. Entre parênteses está indicado o número de animais.

4- Efeitos do bloqueio colinérgico ou angiotensinérgico da área RVL nas respostas cardiovasculares produzidas pela injeção de glutamato na mesma área.

Com injeções de atropina ou losartan no VL não se poderia descartar a possibilidade de que as alterações na resposta pressora do glutamato injetado na área RVL se devesse à ação dessas drogas diretamente na área RVL uma vez que pelos ventrículos encefálicos elas poderiam se espalhar e atingir diferentes áreas encefálicas. Por isso, foram testados os efeitos das injeções de atropina e losartan sobre a resposta pressora do glutamato na mesma área.

A PAM basal dos animais após a injeção de atropina (4 nmol/100 nl) ou losartan (10 µg/100 nl) na área RVL (116 ± 2 e 124 ± 7 mmHg, respectivamente) não foi diferente da PAM basal dos animais antes do bloqueio colinérgico ou angiotensinérgico no início dos experimentos (113 ± 3 e 119 ± 6 mmHg, respectivamente), [F(3,33) = 1,13; $p > 0,05$].

A resposta pressora produzida pela injeção de glutamato (5 nmol/100 nl) na área RVL após o bloqueio colinérgico local com injeção de atropina na área RVL (49 ± 4 mmHg) não foi diferente da resposta pressora produzida pela mesma dose de glutamato em condições controles (50 ± 4 mmHg). Porém, a resposta pressora produzida pela injeção de glutamato (5 nmol/100 nl) na área RVL dos ratos depois do bloqueio angiotensinérgico local com injeção de losartan na área RVL (5 ± 3 mmHg) foi menor quando comparada com condições controles [F(3,38) = 73,869; $p < 0,001$] (Figura 7). Injeção de salina na área RVL não produziu efeitos na PAM, (Figura 7).

A FC basal dos animais após a injeção de atropina (4 nmol/100 nl) ou losartan (10 µg/100 nl) na área RVL (350 ± 9 e 319 ± 10 bpm, respectivamente) não foi diferente da FC basal dos animais antes do bloqueio colinérgico ou angiotensinérgico no início dos experimentos (342 ± 7 e 340 ± 24 bpm, respectivamente), [F(3,33) = 1,13; $p > 0,05$].

A injeção de glutamato (5 nmol/100 nl) na área RVL antes ou depois das injeções de atropina ou losartan na área RVL não produziu modificações significantes da FC, [F(3,38) = 1,217; $p > 0,05$], (Figura 7).

Para nos certificarmos se realmente mecanismos colinérgicos ou angiotensinérgicos da área RVL estavam bloqueados, no final dos experimentos foram feitas injeções de acetilcolina (10 nmol/ 100 nl) ou ANG II (200 ng/100 nl) na área RVL. Após a injeção de atropina (4 nmol/100 nl) na área RVL, tanto a resposta pressora [F(2, 32) = 23,439; $p < 0,001$], quanto a taquicárdica [F(2, 32) = 11,023; $p < 0,001$] da acetilcolina injetada na área RVL foram abolidas (Figura 8). Assim, também foram abolidas tanto a resposta pressora [F(2,17) = 32,617; $p < 0,05$], quanto a taquicárdica [F(2,17) = 4,082; $p < 0,05$] da ANG II injetada na área RVL após a injeção de losartan (10 µg/100 nl) na mesma área (Figura 9).

Nas figuras 10 e 11 estão apresentados os registros da PAP, PAM e FC de ratos controles e ratos que receberam bloqueio colinérgico ou angiotensinérgico central (VL) ou local (RVL) ilustrando as respostas típicas produzidas pelas injeções de salina e glutamato em cada um dos respectivos grupos.

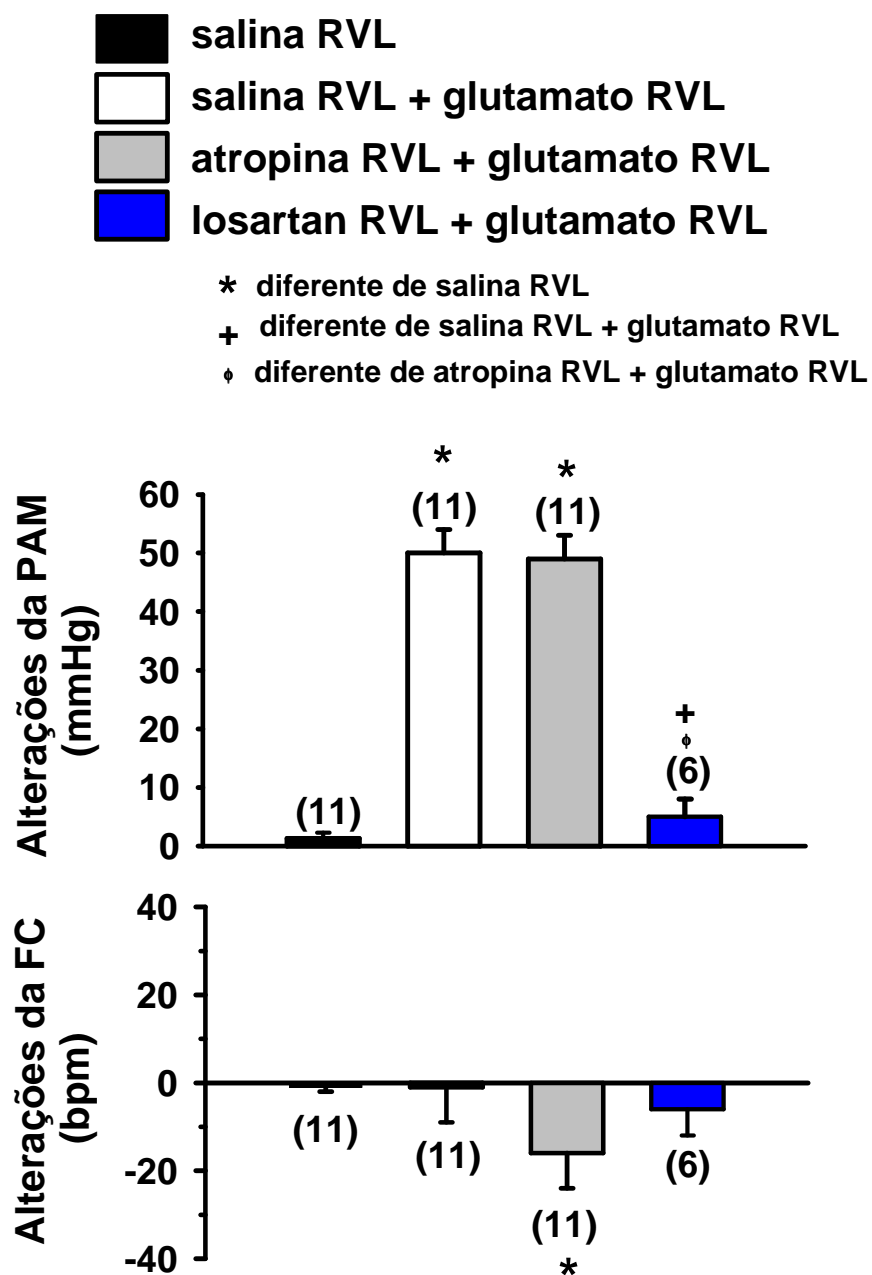


Figura 7: Alterações da pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) produzidas pela injeção de salina ou glutamato (5 nmol/100 nl) na área RVL após a injeção de salina, atropina (4 nmol/100 nl) ou losartan (10 µg/100 nl) na área RVL. Os resultados estão expressos como médias \pm EPM. Entre parênteses está indicado o número de animais.

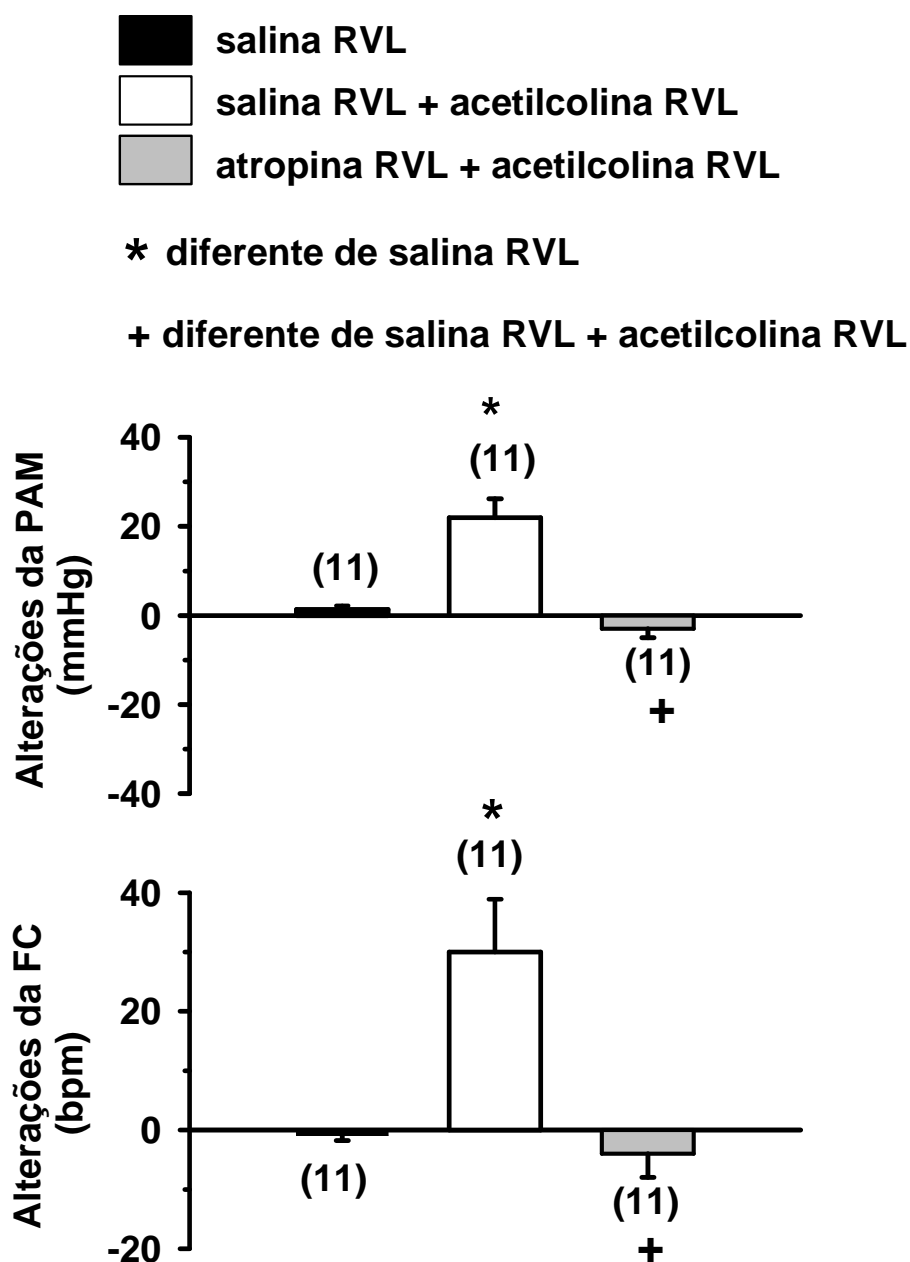


Figura 8: Alterações da pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) produzidas pela injeção de salina ou acetilcolina (10 nmol/100 nl) na área RVL combinada com a injeção prévia de atropina (4 nmol/100 nl) ou salina na área RVL. Os resultados estão expressos como médias \pm EPM. Entre parênteses está indicado o número de animais.

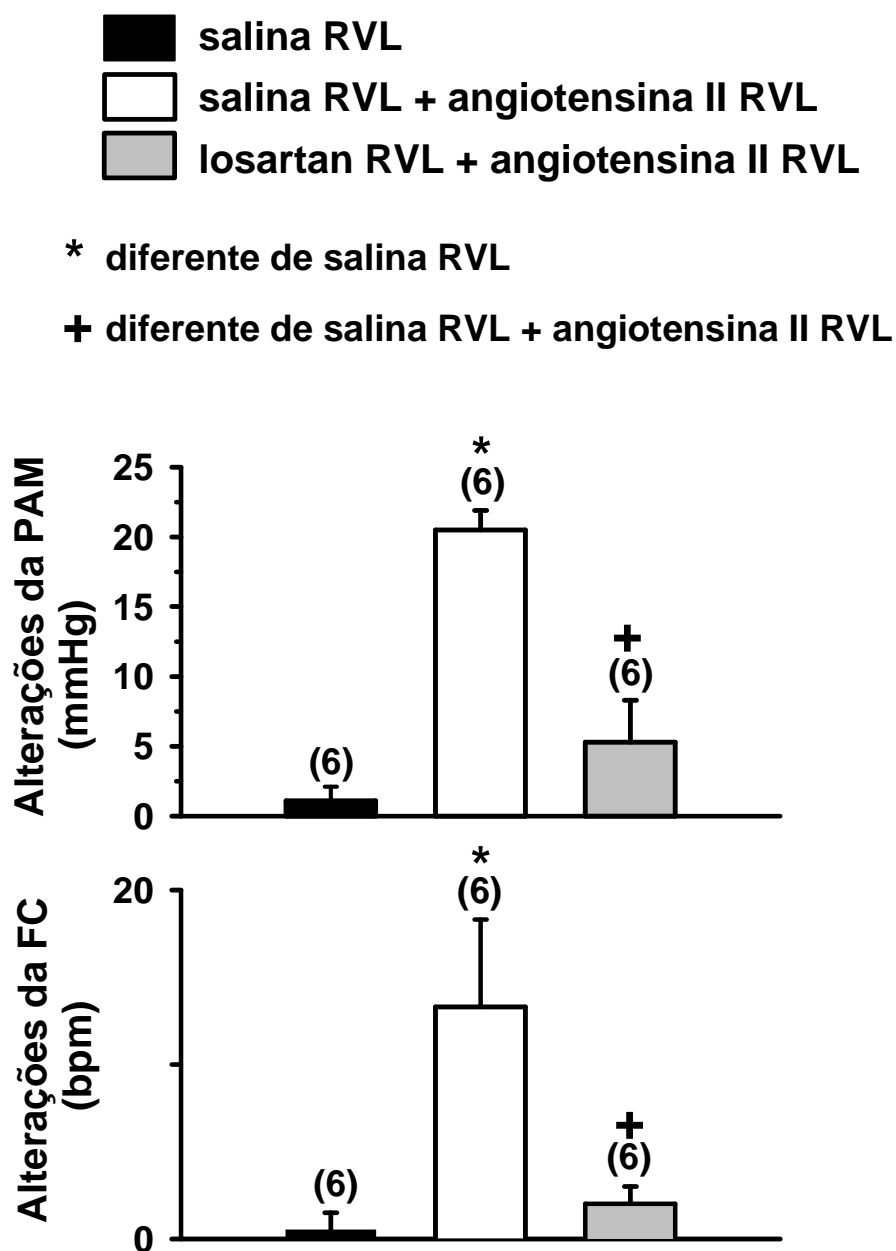


Figura 9: Alterações da pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) produzidas pela injeção de salina ou ANG II (200 ng/100 nl) na área RVL combinada com a injeção prévia de losartan (10 µg/100 nl) ou salina na área RVL. Os resultados estão expressos como médias \pm EPM. Entre parênteses está indicado o número de animais.

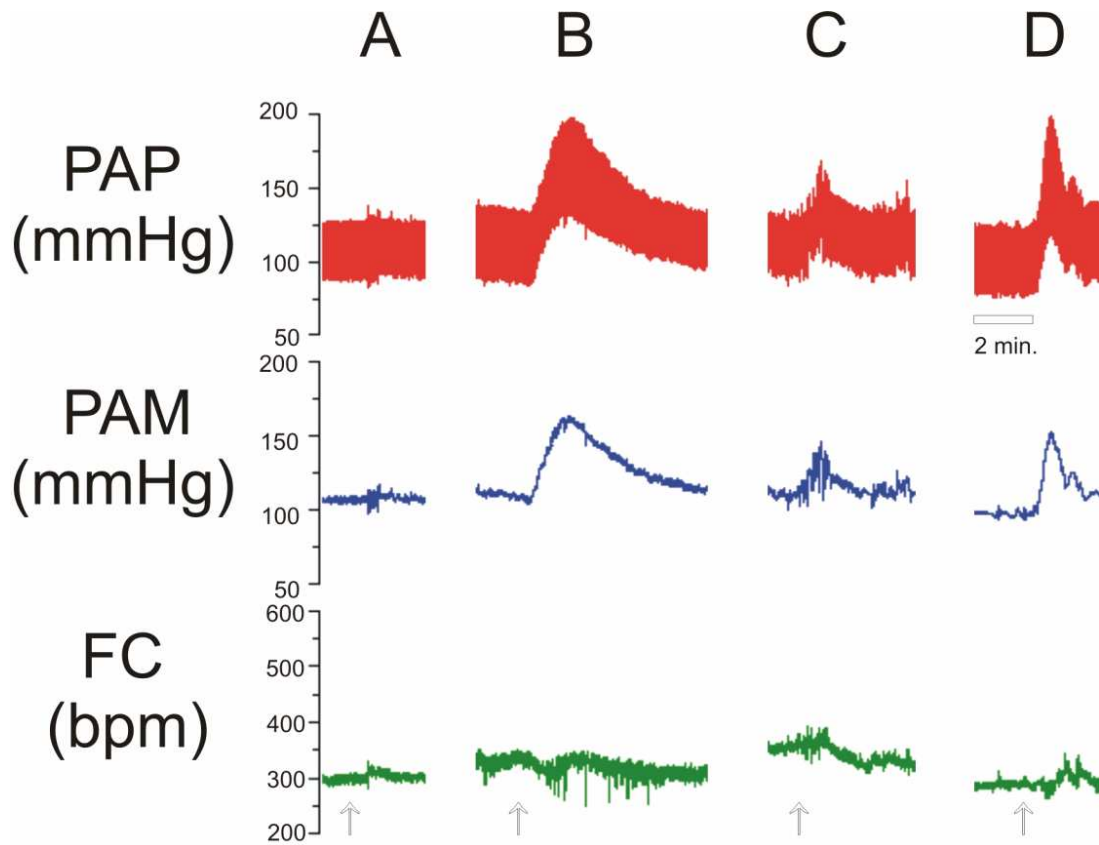


Figura 10: Registros representativos mostrando as alterações da pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) produzidas pelas injeções de: (A) salina na área RVL, (B) glutamato (5 nmol/100 nl) na área RVL após salina no VL, (C) glutamato na área RVL após atropina (4 nmol/1 μ l) no VL e (D) glutamato na área RVL após atropina (4 nmol/100 nl) na área RVL (setas).

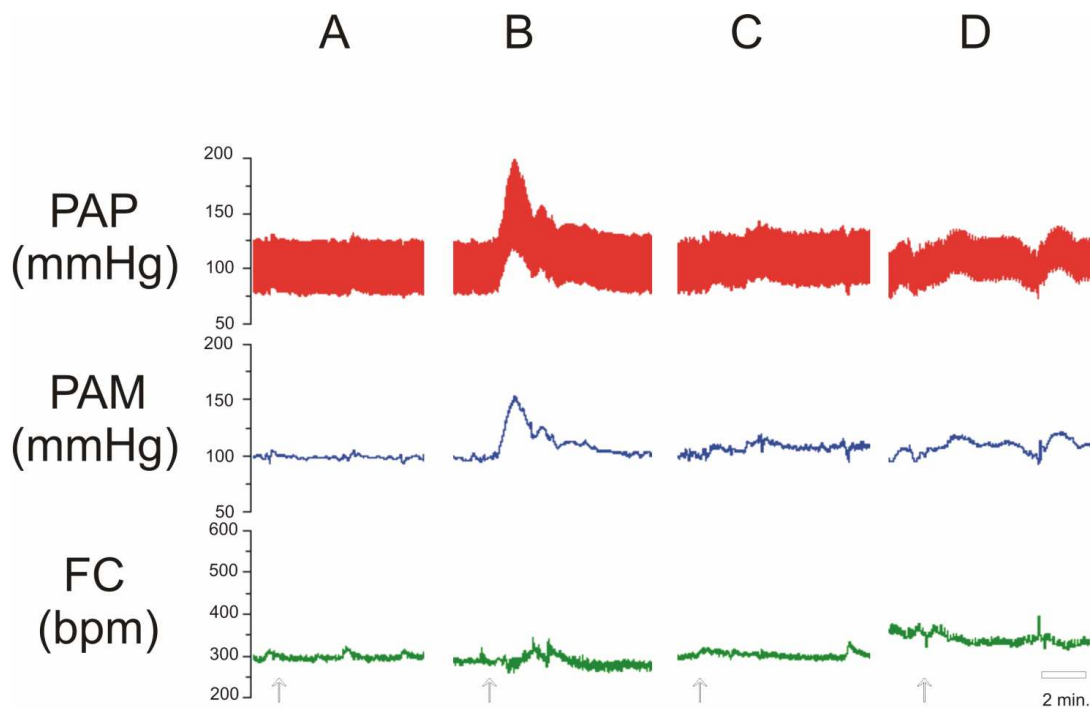


Figura 11: Registros representativos mostrando as alterações da pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) produzidas pelas injeções de: (A) salina na área RVL, (B) glutamato (5 nmol/100 nl) na área RVL após salina no VL, (C) glutamato na área RVL após losartan (100 µg/1 µl) no VL e (D) glutamato na área RVL após losartan (10 µg/100 nl) na área RVL (setas).

5 - Efeitos do bloqueio angiotensinérgico central (VL) com ZD 7155 nas respostas cardiovasculares produzidas pela injeção de glutamato na área RVL.

A PAM basal dos animais após a injeção de ZD 7155 (50 µg/1 µl) no VL (115 ± 2 mmHg) não foi diferente da PAM basal dos animais antes do bloqueio angiotensinérgico no início dos experimentos (111 ± 2 mmHg), [F(1,15) = 1,151; p > 0,05].

A resposta pressora produzida pela injeção de glutamato (5 nmol/100 nl) na área RVL após a injeção de ZD 7155 no VL (26 ± 7 mmHg) foi menor do que aquela produzida pela mesma dose em condições controles (52 ± 5 mmHg) [F(2,23) = 22,263; p < 0,001]. Injeção de salina na área RVL não modificou a PAM (Figura 12).

A FC basal dos animais após a injeção de ZD 7155 (50 µg/1 µl) no VL (378 ± 8 bpm) não foi diferente da FC basal dos animais antes do bloqueio angiotensinérgico no início dos experimentos (375 ± 10 bpm) [F(1,15) = 0,05; p > 0,05].

A injeção de glutamato (5 nmol/100 nl) na área RVL antes ou depois do bloqueio angiotensinérgico central com injeção de ZD 7155 no VL não produziu modificações significantes da FC [F(2,23) = 0,629; p > 0,05]. Injeção de salina na área RVL não modificou a FC (Figura 12).

Para confirmar se os receptores angiotensinérgicos estavam eficientemente bloqueados, no final dos experimentos foram feitas as injeções de ANG II (50 ng/1 µl) no VL nos diferentes grupos estudados. Após a injeção de ZD 7155 (50 µg/1

μ l), tanto a resposta pressora da ANG II [$F(2,23) = 14,037$; $p < 0,05$] quanto a taquicardia foram abolidas [$F(2,23) = 7,721$; $p < 0,05$] (Figura 13).

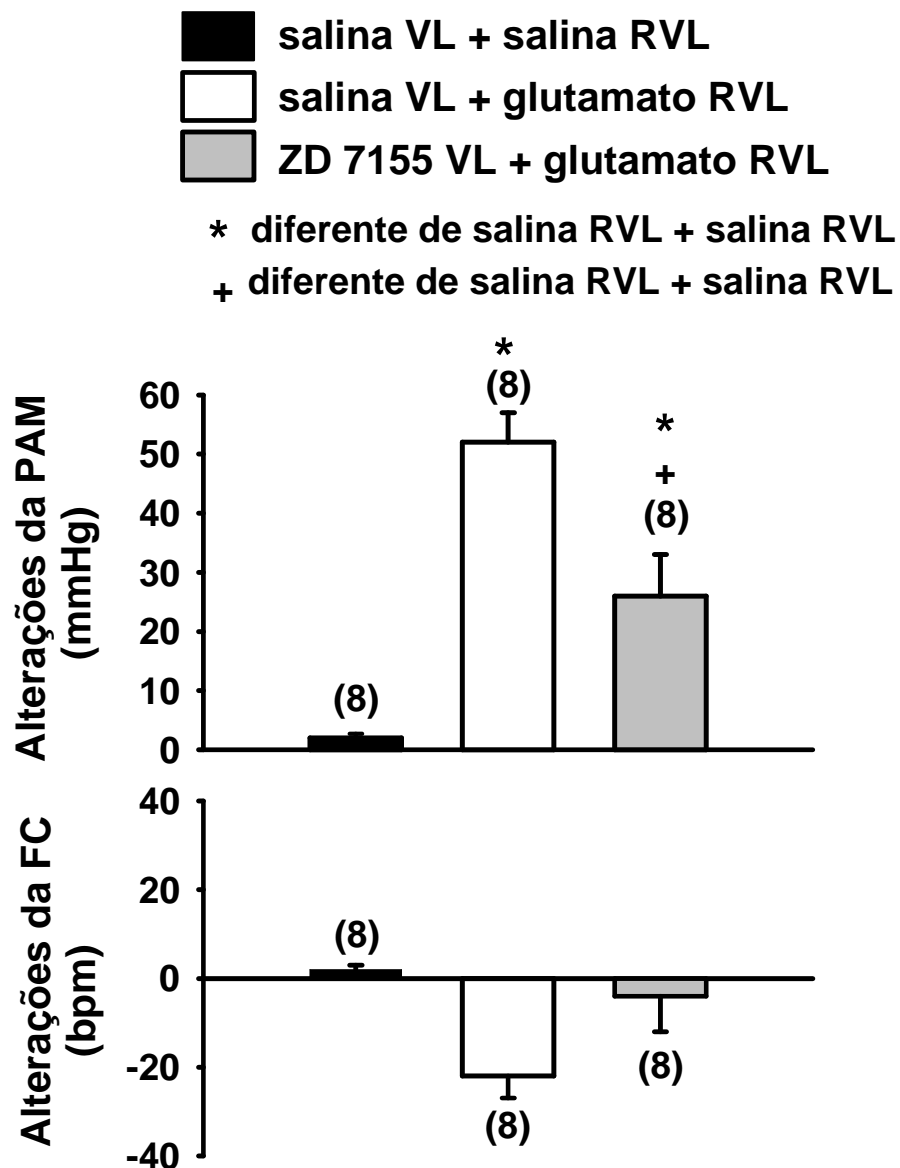


Figura 12: Alterações da pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) produzidas pela injeção de salina ou glutamato (5 nmol/100 nl) na área RVL após a injeção de salina ou ZD 7155 (50 μ g/1 μ l) no VL. Os resultados estão expressos como médias \pm EPM. Entre parênteses está indicado o número de animais.

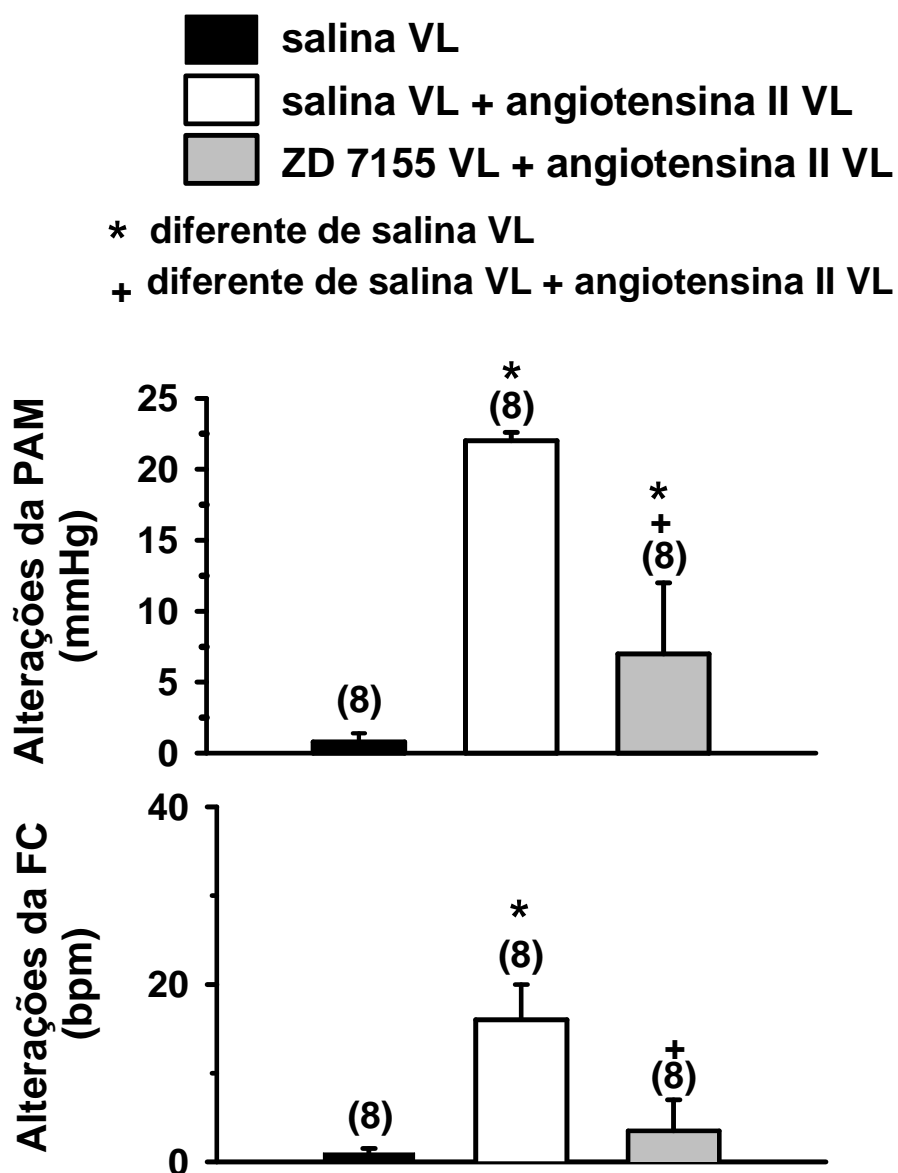


Figura 13: Alterações da pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) produzidas pela injeção de salina ou ANG II (50 ng/1 μ l) no VL combinada com a injeção prévia de ZD 7155 (50 μ g/1 μ l) ou salina no VL. Os resultados estão expressos como médias \pm EPM. Entre parênteses está indicado o número de animais.

6 - Efeitos do bloqueio angiotensinérgico local (RVL) com ZD 7155 nas respostas cardiovasculares produzidas pela injeção de glutamato na área RVL.

A PAM basal dos animais após a injeção de ZD 7155 (5 µg/100 nl) na área RVL (117 ± 3 mmHg) não foi diferente da PAM basal dos animais antes do bloqueio angiotensinérgico no início dos experimentos (115 ± 3 mmHg) [F(1,7) = 0,380; p > 0,05].

A resposta pressora produzida pela injeção de glutamato (5 nmol/100 nl) na área RVL após a injeção de ZD 7155 na área RVL (33 ± 4 mmHg) foi menor do que aquela produzida pela mesma dose em condições controles (54 ± 8 mmHg) [F(2,11) = 22,109; p < 0,001]. Injeção de salina na área RVL não modificou a PAM (Figura 14).

A FC basal dos animais após a injeção de ZD 7155 (5 µg/100 nl) na área RVL (361 ± 27 bpm) não foi diferente da FC basal dos animais antes do bloqueio angiotensinérgico no início dos experimentos (376 ± 15 bpm) [F(1,7) = 0,232; p > 0,05].

A injeção de glutamato (5 nmol/100 nl) na área RVL antes ou depois do bloqueio angiotensinérgico local com injeção de ZD 7155 na área RVL não produziu modificações significantes da FC [F(2,11) = 1,377; p > 0,05]. Injeção de salina na área RVL não modificou a FC (Figura 14).

Para confirmar se os receptores angiotensinérgicos estavam eficientemente bloqueados, no final dos experimentos foram feitas as injeções de ANG II (200 ng/100 nl) na área RVL nos diferentes grupos estudados. Após a injeção de ZD

7155 (5 $\mu\text{g}/100 \text{ nl}$), a resposta pressora da ANG II foi abolida [$F(2,11) = 41,498$; $p < 0,001$] (Figura 15).

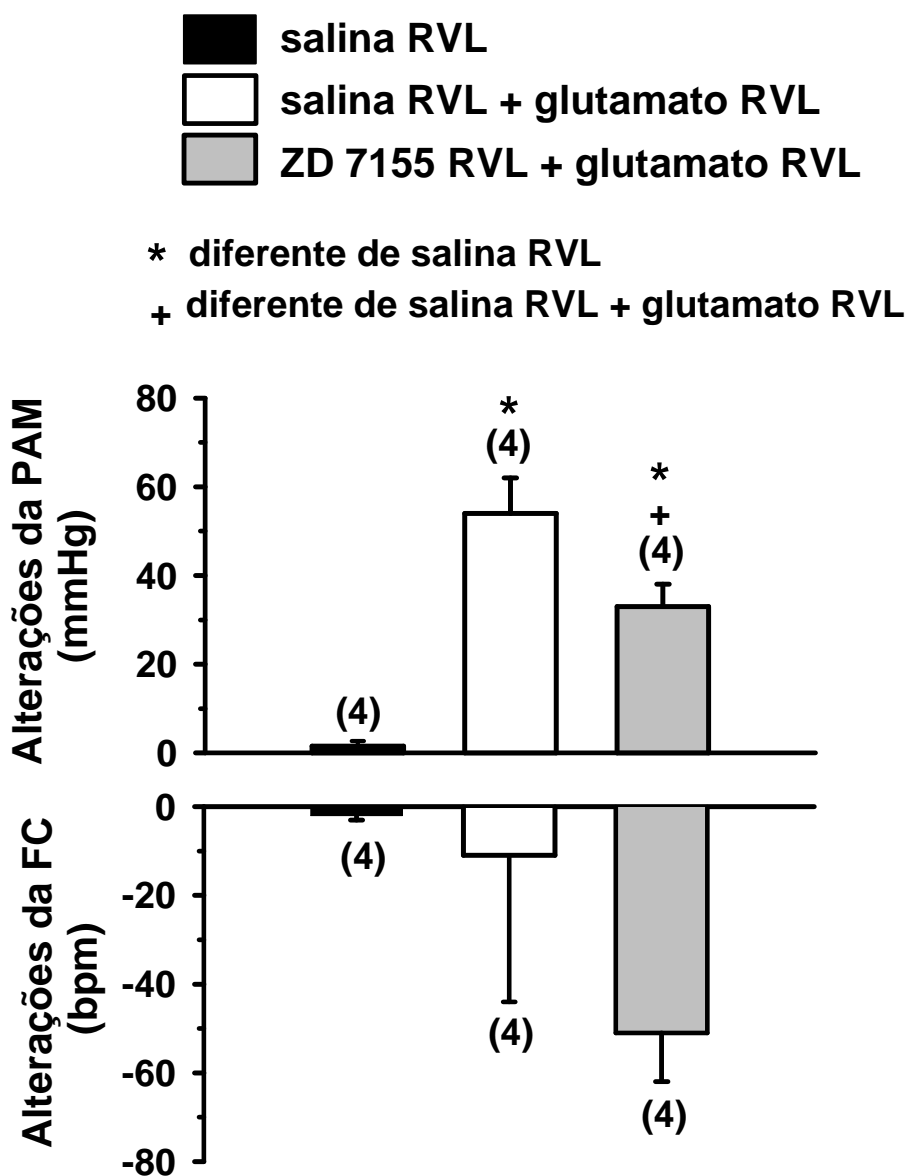


Figura 14: Alterações da pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) produzidas pela injeção de salina ou glutamato (5 nmol/100 nl) na área RVL após a injeção de salina ou ZD 7155 (5 µg/100 µl) no VL. Os resultados estão expressos como médias \pm EPM. Entre parênteses está indicado o número de animais.

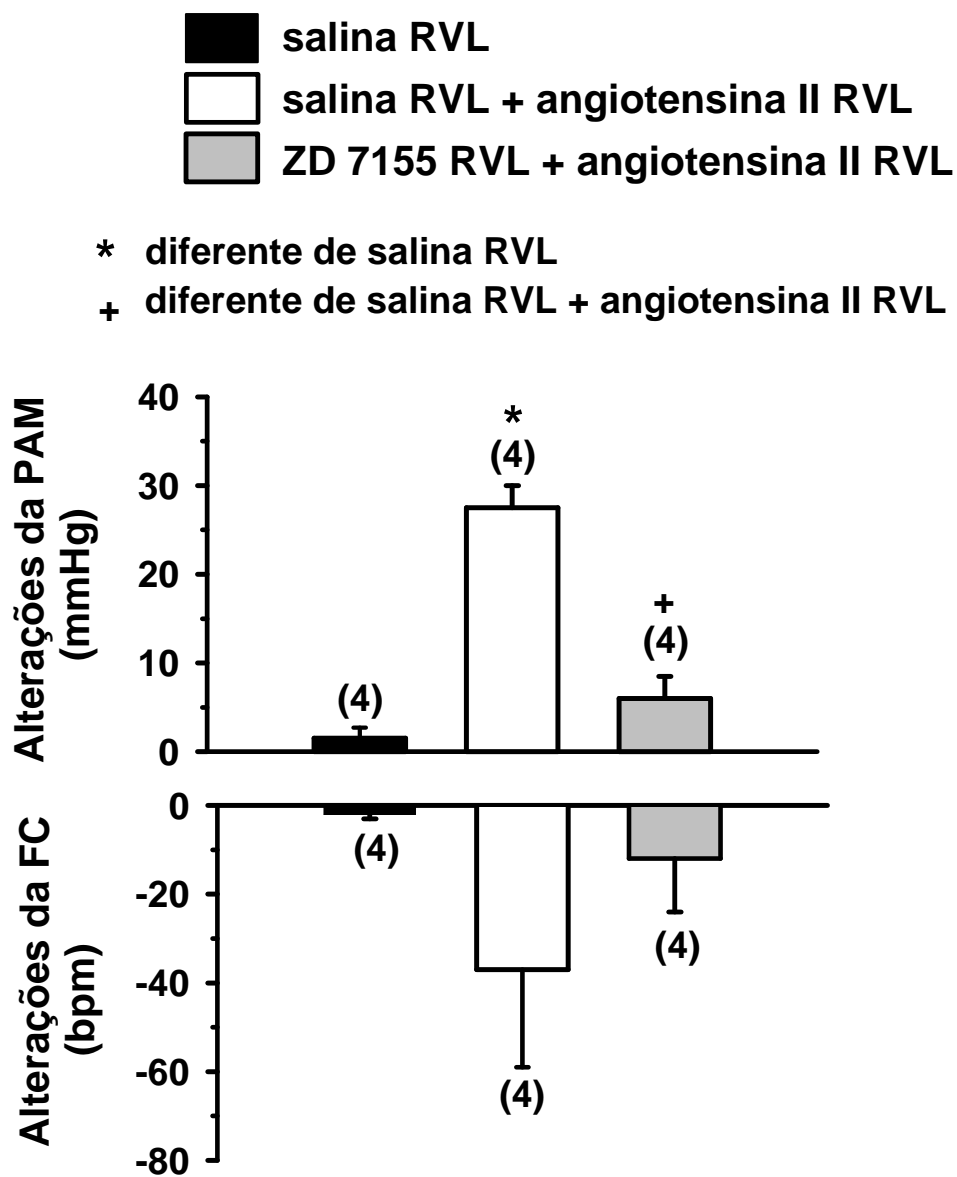
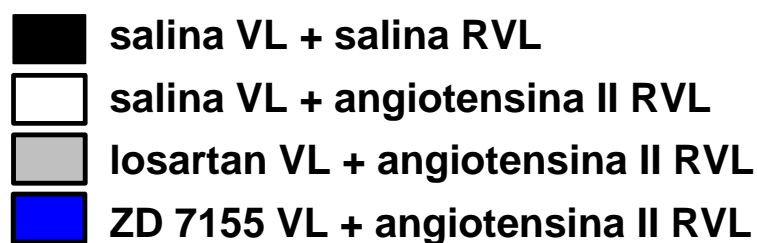


Figura 15: Alterações da pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) produzidas pela injeção de salina ou ANG II (200 ng/100 nl) na área RVL combinada com a injeção prévia de ZD 7155 (5 µg/100 nl) ou salina na área RVL. Os resultados estão expressos como médias \pm EPM. Entre parênteses está indicado o número de animais.

7- Efeitos dos bloqueios angiotensinérgicos centrais (VL) nas respostas cardiovasculares produzidas pela injeção de ANG II na área RVL.

Não houve diferença na resposta pressora produzida pela injeção de ANG II (200 ng/100 nl) na área RVL antes (26 ± 3 mmHg) e depois da injeção de losartan (100 μ g/1 μ l) ou ZD 7155 (50 μ g/ 1 μ l) no VL (20 ± 3 e 23 ± 1 mmHg, respectivamente) [$F(3, 25) = 26,759$; $p < 0,001$], (Figura 16).

Injeção de salina ou ANG II (200 ng/100 nl) na área RVL não produziu efeitos na frequência cardíaca [$F(3,25) = 0,290$; $p > 0,05$], (Figura 16).



* diferente de salina VL + salina RVL

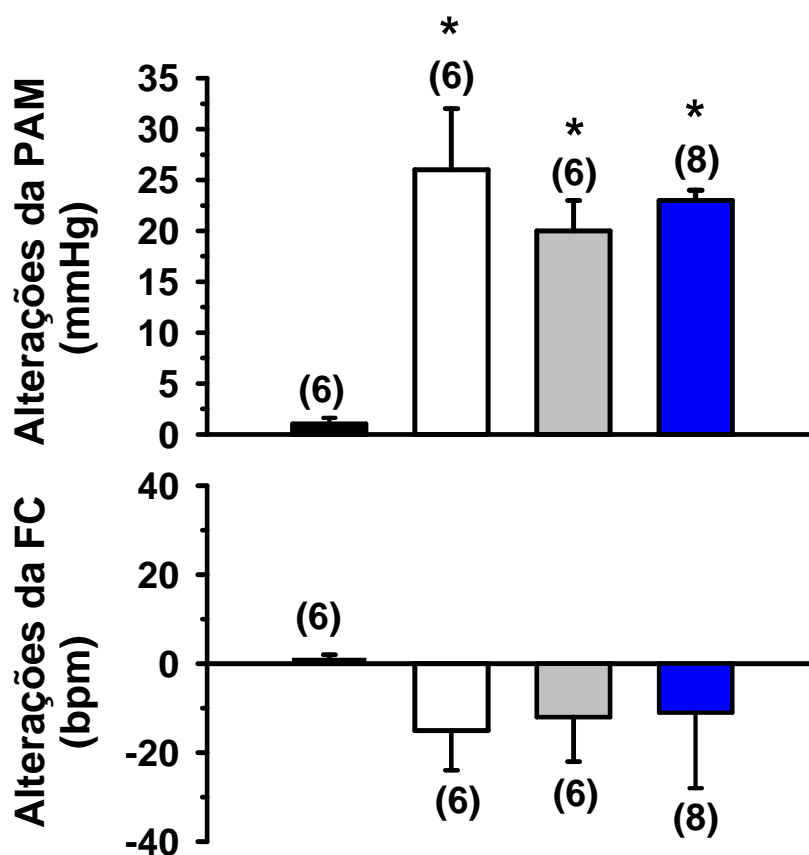


Figura 16: Alterações da pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) produzidas pela injeção de salina ou ANG II (200 ng/100 nl) na área RVL após a injeção de salina, losartan (100 µg/1 µl) ou ZD 7155 (50 µg/1 µl) no VL. Os resultados estão expressos como médias ± EPM. Entre parênteses está indicado o número de animais.

8 - Efeitos da prévia injeção de ANG II na área RVL nas respostas cardiovasculares produzidas pela injeção de glutamato na mesma área.

A resposta pressora produzida pela injeção de glutamato (5 nmol/100 nl) na área RVL após a injeção de ANG II (50 ng/100 nl) na mesma área (68 ± 7 mmHg) foi maior do que aquela produzida pela mesma dose de glutamato em condições controles (44 ± 6 mmHg) [$F(2,14) = 40,929$; $p < 0,001$] (Figura 17).

A bradicardia produzida pela injeção de glutamato (5 nmol/100 nl) na área RVL após a injeção de ANG II (50 ng/100 nl) na mesma área (-20 ± 15 bpm) foi diferente da resposta cronotrópica produzida pela mesma dose de glutamato em condições controles (23 ± 10 bpm) [$F(2,14) = 4,236$; $p < 0,05$] (Figura 17).

Na figura 18 está apresentado o registro da PAP, PAM e FC de um rato pertencente ao grupo estudado ilustrando as respostas típicas produzidas pelas injeções de glutamato na área RVL depois de salina na mesma área, ANG II na área RVL e glutamato na área RVL depois da ANG II na mesma área.

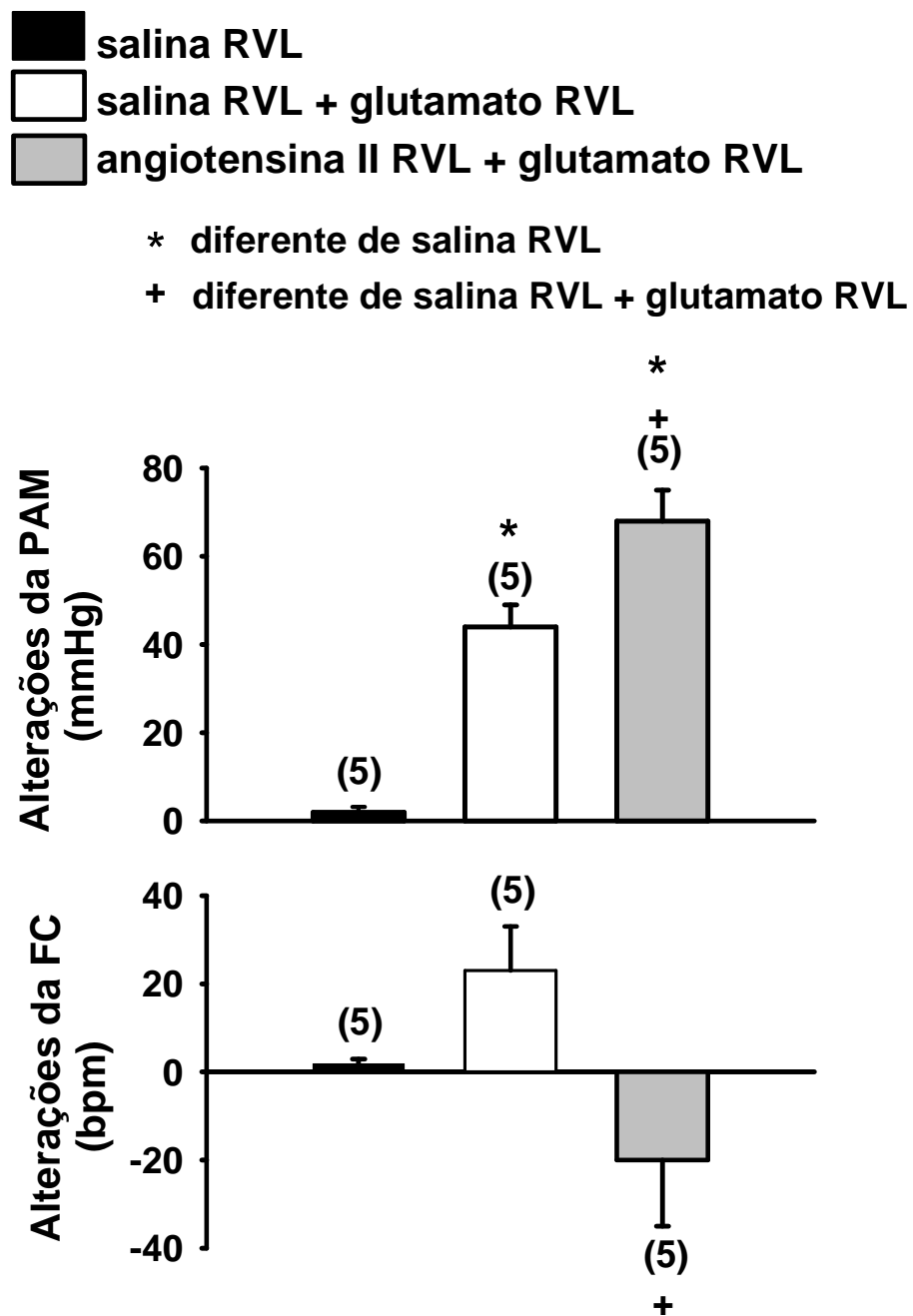


Figura 17: Alterações da pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) produzidas pela injeção de salina ou glutamato (5 nmol/100 nl) na área RVL após injeção de salina ou ANG II (50 ng/100 nl) na área RVL. Os resultados estão expressos como médias \pm EPM. Entre parênteses está indicado o número de animais.

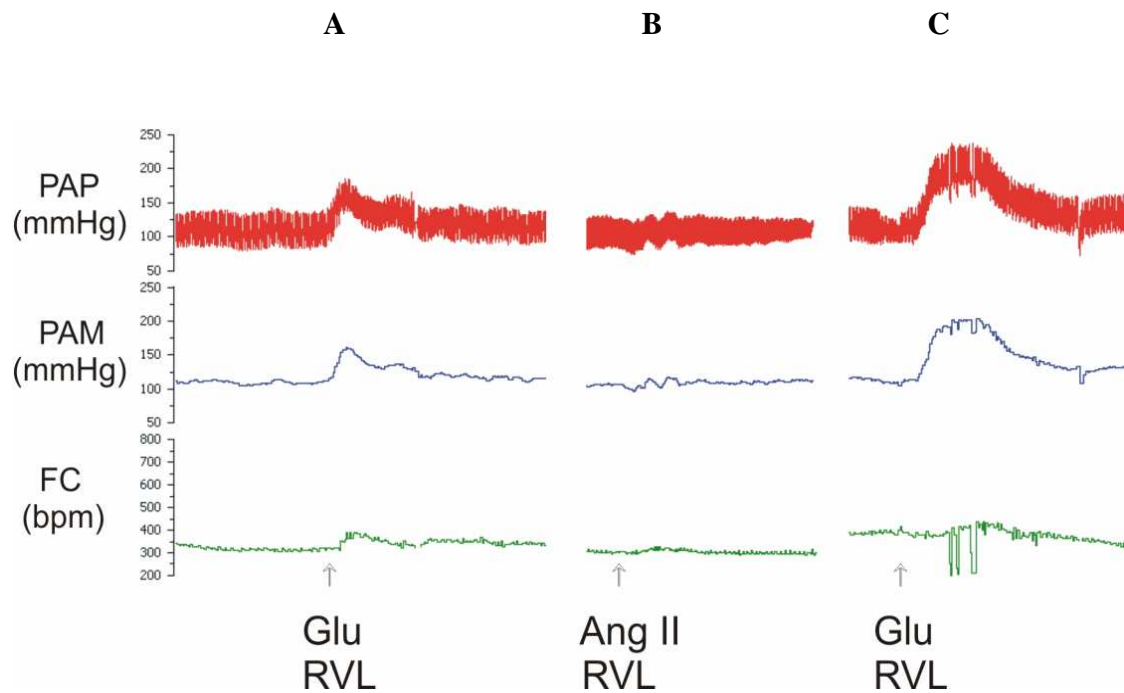


Figura 18: Registro representativo mostrando as alterações da pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) produzidas pela injeção de: (A) glutamato (5 nmol/100 nl) na área RVL depois de salina na área RVL; (B) ANG II (50 ng/100 nl) na área RVL e (C) glutamato (5 nmol/100 nl) depois da ANG II (50 ng/100 nl) na área RVL.

9– Efeitos de bloqueio glutamatérgico bilateralmente na área RVL nas respostas cardiovasculares produzidas pela injeção de carbacol ou ANG II no VL.

A injeção de ácido quinurênico bilateralmente na área RVL causou aumento na PAM basal nos primeiros 5 minutos em ambos os grupos estudados: grupo que foi posteriormente tratado com carbacol (137 ± 4 mmHg vs. controle: 113 ± 3 mmHg), [F(1,13) = 20,953; $p < 0,001$] (Tabela 2) e grupo que foi posteriormente tratado com ANG II (133 ± 3 mmHg, vs. controle: 117 ± 3 mmHg), [F(1,11) = 11,102; $p < 0,05$] (Tabela 2).

A FC basal dos animais com bloqueio glutamatérgico bilateralmente da área RVL não foi diferente da FC basal antes do bloqueio em ambos os grupos estudados: grupo que foi posteriormente tratado com carbacol (393 ± 22 vs. antes do bloqueio: 398 ± 9 bpm), [F(1,13) = 0,0384 $p > 0,05$] (Tabela 2) e grupo que foi posteriormente tratado com ANG II (353 ± 24 vs. antes do bloqueio: 395 ± 9 bpm), [F(1,11) = 1,961; $p > 0,05$] (tabela 2).

A injeção de ácido quinurênico (1 nmol/100 nl) bilateralmente na área RVL não modificou as alterações na PAM (36 ± 1 vs. controle: 39 ± 2 mmHg) [F(1,13) = 0,101; $p > 0,05$] e frequência cardíaca (22 ± 10 vs. controle: 23 ± 14 bpm) [F(1,13) = 0,009; $p > 0,05$] produzidas pela injeção de carbacol no VL (Figura 19).

A injeção de ácido quinurênico (1 nmol/100 nl) bilateralmente na área RVL não modificou as alterações na pressão arterial média (28 ± 3 vs. controle: 26 ± 2 mmHg) [F(1,11) = 0,167; $p > 0,05$] e frequência cardíaca (10 ± 13 vs. controle: -12 ± 5 bpm) [F(1,11) = 2,828; $p > 0,05$] produzidas pela injeção de ANG II no VL (Figura 20).

Em ambos os grupos, a injeção bilateral de ácido quinurênico na área RVL praticamente aboliu a resposta pressora do glutamato na mesma área [$F(2,19) = 46,90$; $p < 0,001$], (Figura 21).

Nas figuras 22 e 23 estão apresentados os registros da PAP, PAM e FC, ilustrando as respostas típicas produzidas pelas injeções de ANG II ou carbacol no VL depois do bloqueio glutamatérgico ou fictício bilateralmente na área RVL em cada um dos respectivos grupos.

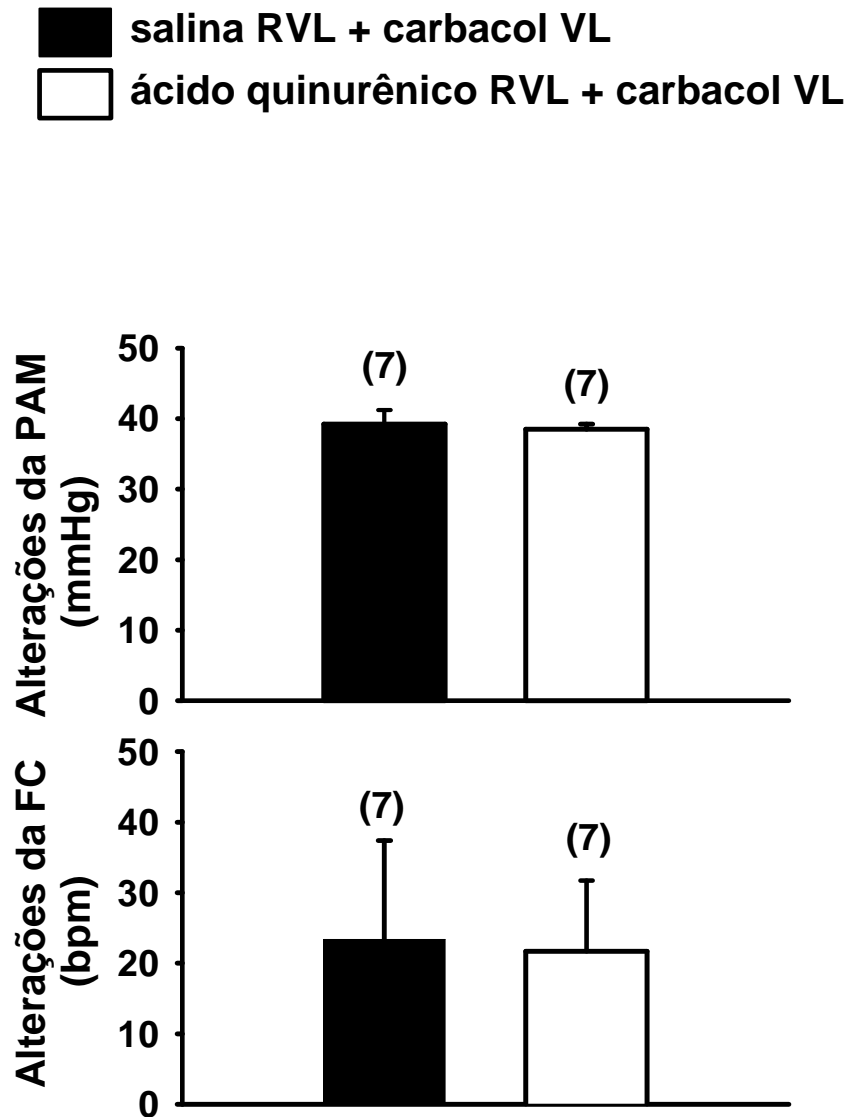


Figura 19: Alterações da pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) produzidas pela injeção de carbacol (4 nmol/1 μ l) no VL em ratos não anestesiados após injeções de salina ou ácido quinurênico (1 nmol/100 nl) bilateralmente na área RVL. Os resultados estão expressos como médias \pm EPM. Entre parênteses está indicado o número de animais.

■ salina RVL + angiotensina II VL
□ ácido quinurênico RVL + angiotensina II VL

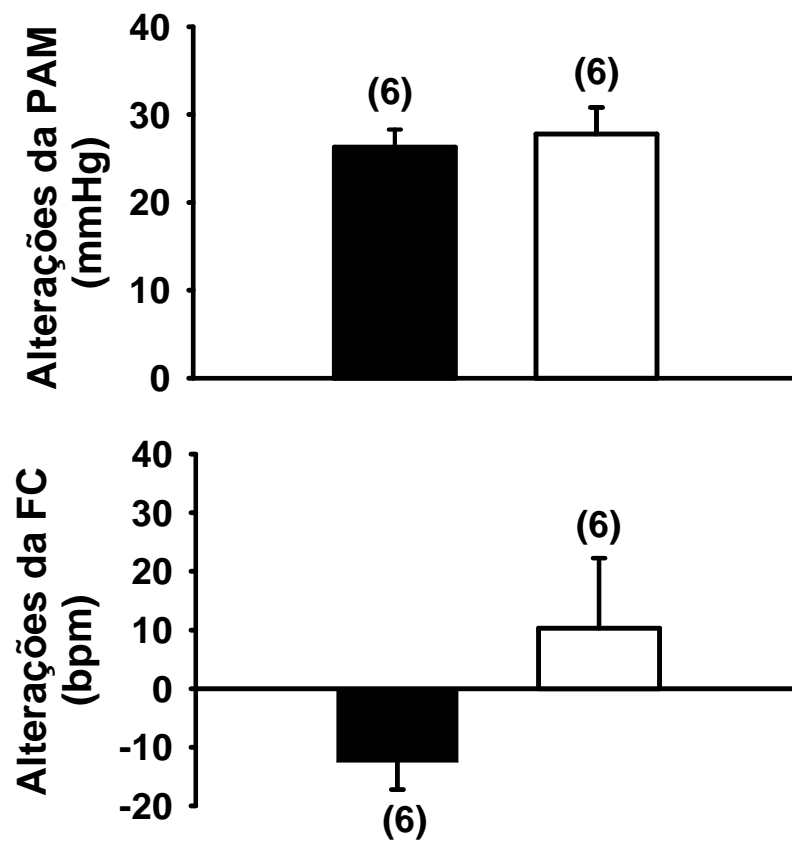


Figura 20: Alterações da pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) produzidas pela injeção de ANG II (50 ng/1 μ l) no VL em ratos não anestesiados após injeções de salina ou ácido quinurênico (1 nmol/100 nl) bilateralmente na área RVL. Os resultados estão expressos como médias \pm EPM. Entre parênteses está indicado o número de animais.

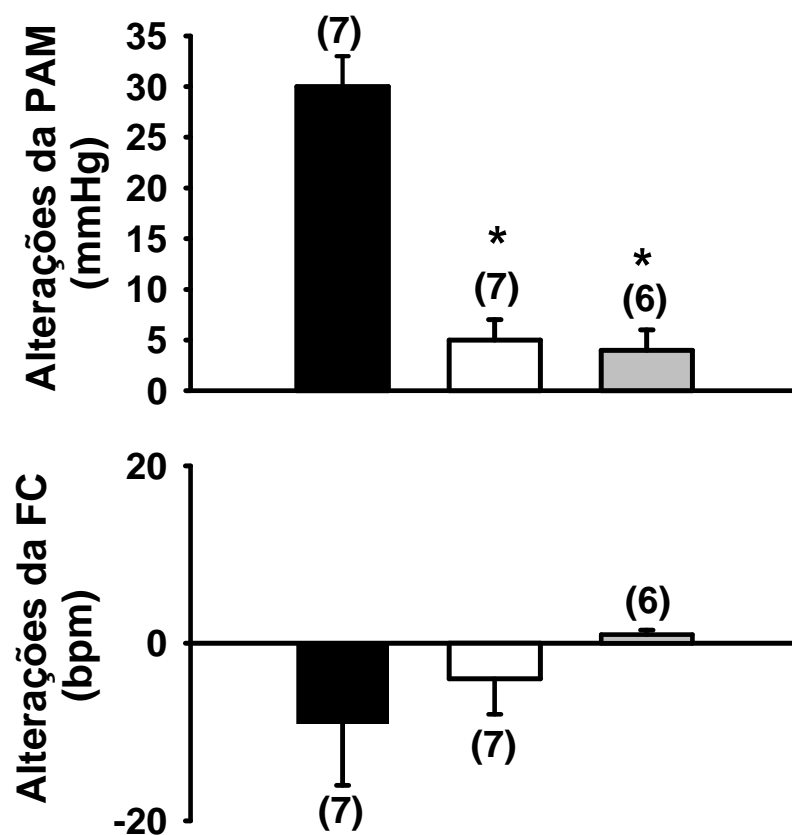
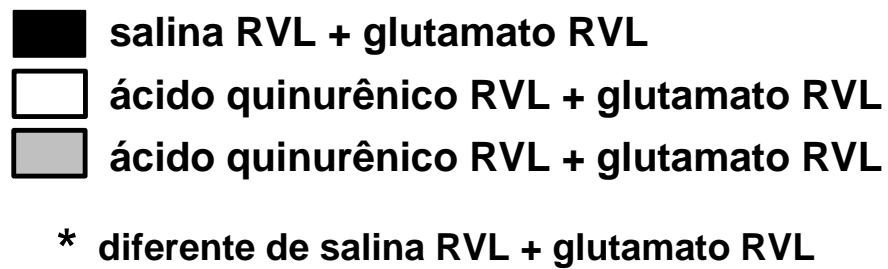


Figura 21: Alterações da pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) produzidas pela injeção de glutamato (5 nmol/100 nl) na área RVL nos diferentes grupos estudados após a injeção de salina ou ácido quinurênico (1 nmol/100 nl) na área RVL. Os resultados estão expressos como médias \pm EPM. Entre parênteses está indicado o número de animais.

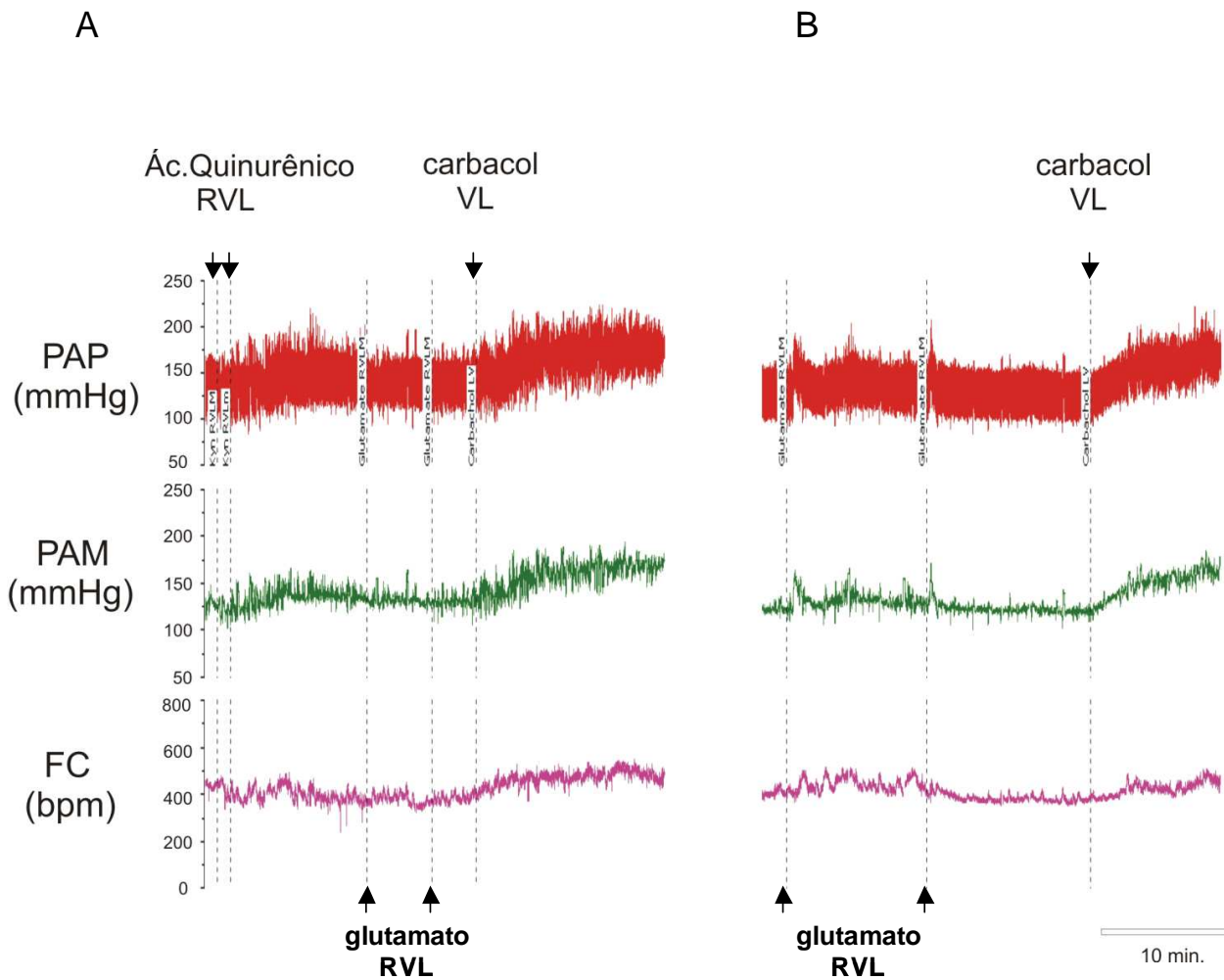


Figura 22: Registros representativos mostrando as alterações da pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) produzidas pela injeção de carbacol (4 nmol/1 μ l) no VL em (A) após injeções de ácido quinurênico (1 nmol/100 nl) ou (B) salina bilateralmente na área RVL.

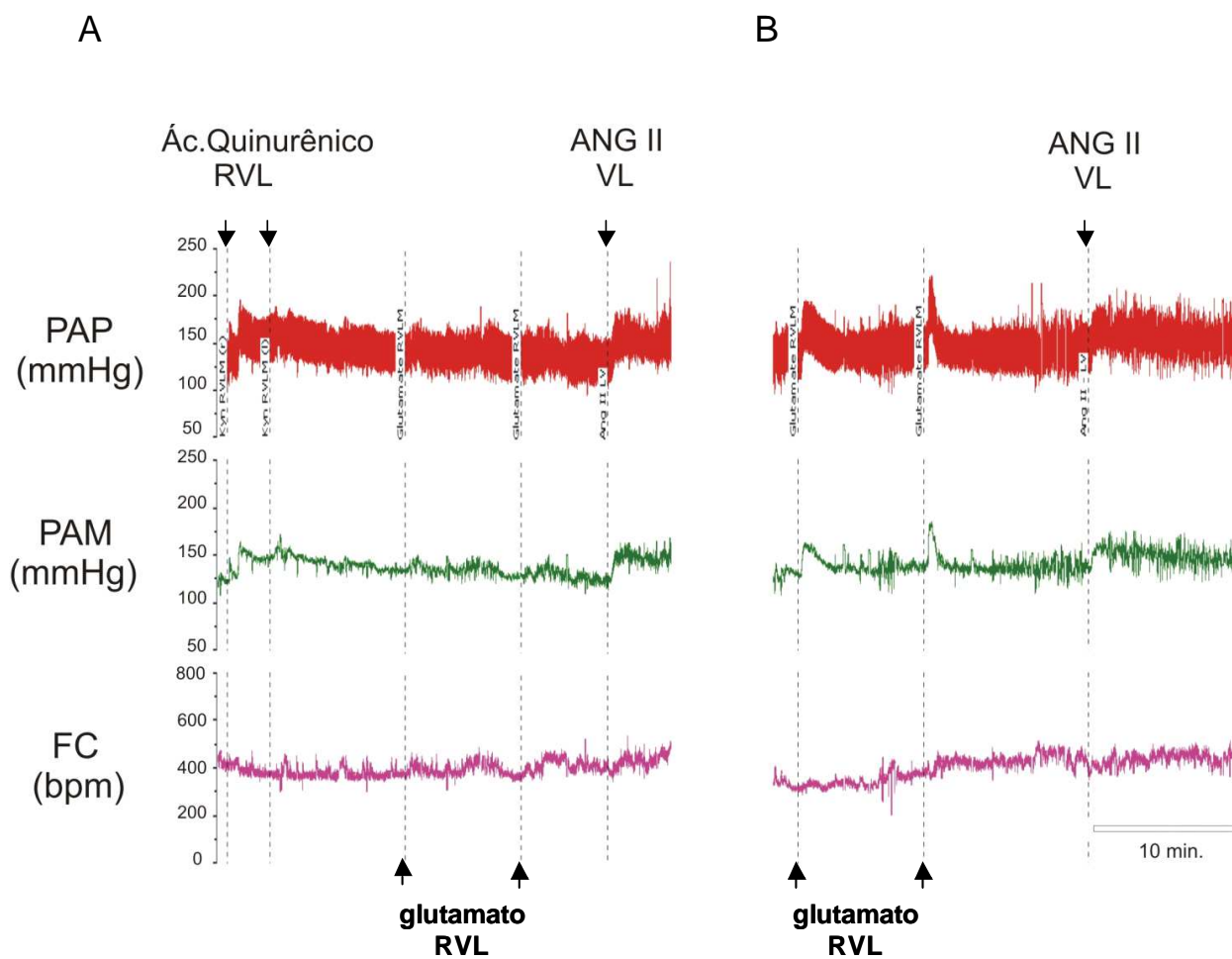


Figura 23: Registros representativos mostrando as alterações da pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) produzidas pela injeção de ANG II (50 ng/1 μ l) no VL em (A) após injeções de ácido quinurênico (1 nmol/100 nl) ou (B) salina bilateralmente na área RVL.

10- Efeitos de bloqueio glutamatérgico bilateralmente na área RVL nos parâmetros respiratórios (Volume corrente, frequência respiratória e ventilação pulmonar)

Injeções de ácido quinurênico (1 nmol/100 nl) bilateralmente na área RVL não modificou os parâmetros respiratórios como o volume corrente ($4,94 \pm 1$ vs salina: $5,4 \pm 1$ ml/kg), $[F(1,7) = 0,229; p > 0,05]$, frequência respiratória (112 ± 2 vs salina: 91 ± 4 cpm/min), $[F(1,7) = 0,897; p > 0,05]$ e ventilação pulmonar (577 ± 150 vs salina: 506 ± 82 ml/min) $[F(1,7) = 0,172; p > 0,05]$ (Figuras 24 e 25).

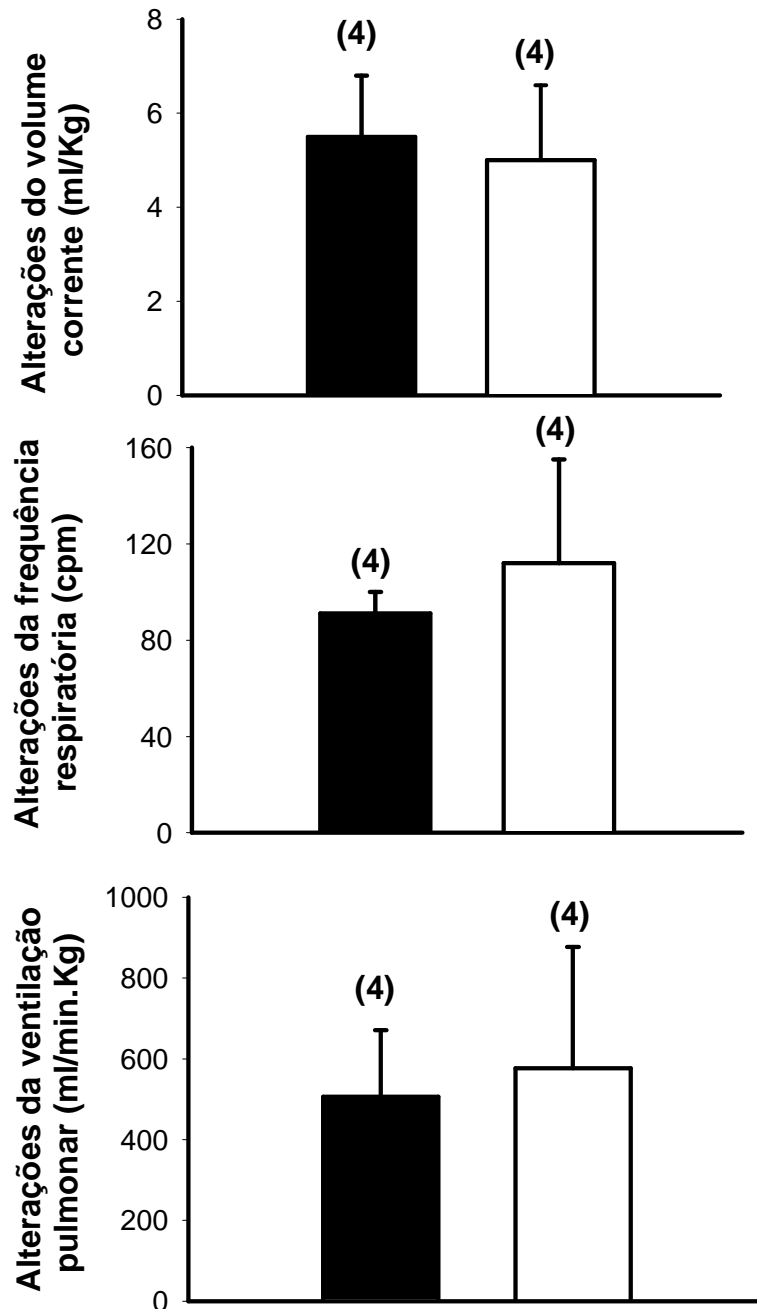


Figura 24: (A) Volume corrente, (B) frequência respiratória e (C) ventilação pulmonar após injeções de salina ou ácido quinurênico (1 nmol/100 nl) bilateralmente na área RVL. Os resultados estão expressos como médias \pm EPM. Entre parênteses está indicado o número de animais.

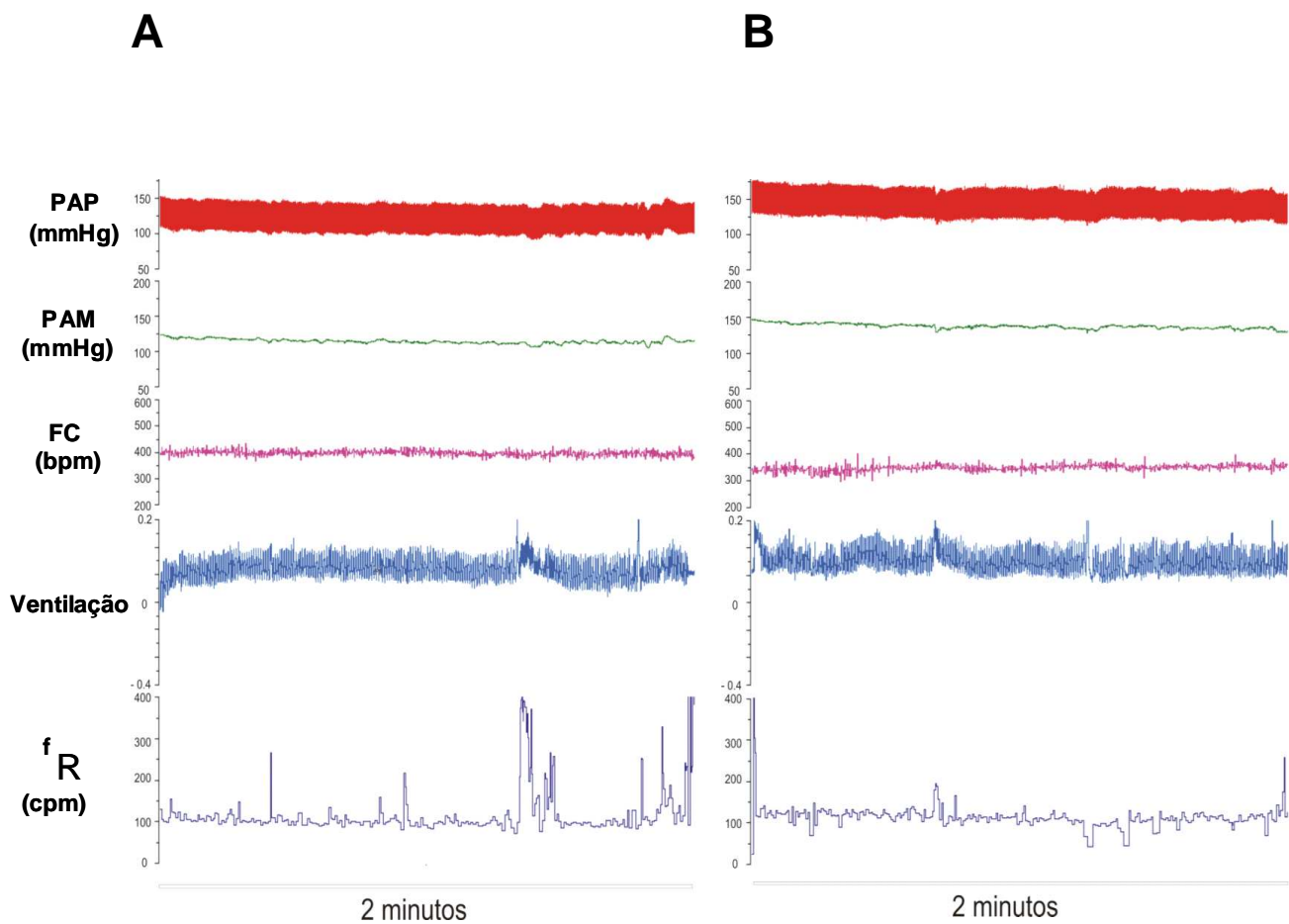


Figura 25: Registros representativos da pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC), ventilação e frequência respiratória (FR) após injeções de: (A) salina ou (B) ácido quinurênico (1 nmol/100 nl) bilateralmente na área RVL de ratos não anestesiados.

Tabela 2: Alterações da PAM e FC basais produzidas pela injeção de ácido quinurênico (1 nmol/100 nl) ou salina bilateralmente na área RVL nos ratos referentes aos grupos estudados.

Grupo do Carbacol

	<u>PAM (mmHg)</u>	<u>FC (bpm)</u>
BASAL	113 ± 3	398 ± 9
Após salina RVL	116 ± 4	402 ± 8
Após ác. Quinurênico RVL	137 ± 4 ^{*+}	393 ± 22

Grupo da angiotensina II

	<u>PAM (mmHg)</u>	<u>FC (bpm)</u>
BASAL	117 ± 3	395 ± 9
Após salina RVL	120 ± 4	402 ± 2
Após ác. Quinurênico RVL	133 ± 3 [*]	353 ± 24

Ácido quinurênico (1 nmol/100 nl) ou salina foram injetados bilateralmente na área RVL. PAM = Pressão arterial média basal (mmHg); FC = Frequência cardíaca basal (bpm). Os resultados estão expressos como média ± EPM.

* diferente quando comparado ao Basal;

+ diferente após salina RVL.

11- Teste do baro e quimiorreflexo nos diferentes grupos

Não houve diferença nas respostas cardiovasculares produzidas pelos testes de barorreflexo com injeções endovenosas de fenilefrina e nitroprussiato de sódio ou pelo teste de quimiorreflexo pela injeção endovenosa de cianeto de potássio (KCN).

As respostas cardiovasculares produzidas pelos testes reflexos nos diferentes grupos estudados estão expressas nas Tabelas 3, 4 e 5.

Tabela 3: Alterações da PAM e FC induzida pela injeção (iv) de fenilefrina, nitroprussiato de sódio KCN em ratos após a injeção de salina, atropina ou losartan no VL.

Grupo:	<u>Alterações da PAM (mmHg)</u>			<u>Alterações da FC (bpm)</u>		
	Fenil	NPS	KCN	Fenil	NPS	KCN
salina	49 ± 6	-29 ± 2	59 ± 10	-51 ± 3	84 ± 2	-133 ± 29
atropina	57 ± 3	-28 ± 1	68 ± 4	-39 ± 7	96 ± 14	-129 ± 21
losartan	43 ± 3	-29 ± 2	57 ± 5	-38 ± 9	79 ± 11	-109 ± 30

Os resultados estão presentes como média ± EPM. O número de ratos em cada grupo foi: bloqueio fictício – n = 4; bloqueio colinérgico - n = 8; bloqueio angiotensinérgico - n = 8; Fenil (fenilefrina, 5 µg/kg de peso corporal), NPS (nitroprussiato de sódio, 30 µg/kg de peso corporal), KCN (cianeto de potássio, 40 µg/0,1 ml/rato).

Tabela 4: Alterações da PAM e FC induzida pela injeção (iv) de fenilefrina, nitroprussiato de sódio ou KCN em ratos com lesão da região AV3V (Aguda e crônica) e cânula na área RVL. (grupo de ratos que receberam angiotensina e carbacol)

Grupo: Lesão	<u>Alterações da PAM (mmHg)</u>			<u>Alterações da FC (bpm)</u>		
	fenil	NPS	KCN	fenil	NPS	KCN
Fictícia (1 dia)	46 ± 3	-32 ± 3	50 ± 4	-61 ± 8	92 ± 11	-106 ± 20
Aguda (1 dia)	47 ± 3	-31 ± 3	55 ± 5	-69 ± 15	105 ± 12	-125 ± 20
Fictícia (15 dias)	48 ± 4	-26 ± 3	54 ± 6	-54 ± 8	88 ± 9	-128 ± 13
Crônica (15 dias)	46 ± 2	-30 ± 2	51 ± 2	-67 ± 23	90 ± 9	-132 ± 13

Os resultados estão presentes como média ± EPM. O número de ratos em cada grupo foi: Lesão fictícia (1 dia) – n = 7; Lesão aguda (1 dia) – n = 6; Lesão fictícia (15 dias) - n = 6; Lesão crônica (15 dias) - n = 8; fenil (fenilefrina, 5 µg/kg de peso corporal), NPS (nitroprussiato de sódio, 30 µg/kg de peso corporal), KCN (cianeto de potássio, 40 µg/0,1 ml/rato).

Tabela 5: Alterações da PAM e FC induzida pela injeção (iv) de fenilefrina, nitroprussiato de sódio ou KCN em ratos com bloqueio bilateral fictício ou glutamatérgico bilateral da área RVL. (grupo de ratos que receberam ANG II ou carbacol no VL).

Grupo: ANG II	<u>Alterações da PAM (mmHg)</u>			<u>Alterações da FC (bpm)</u>		
	fenil	NPS	KCN	fenil	NPS	KCN
salina (6)	47 ± 3	-30 ± 2	48 ± 3	-51 ± 8	100 ± 9	-100 ± 15
A. quinurênico (6)	45 ± 3	-29 ± 3	50 ± 5	-64 ± 14	95 ± 12	-105 ± 10
salina (7)	46 ± 3	-25 ± 2	45 ± 5	-50 ± 14	100 ± 8	-128 ± 12
A. quinurênico (7)	45 ± 2	-28 ± 3	47 ± 2	-55 ± 5	88 ± 9	-128 ± 10

Os resultados estão presentes como média ± EPM. Os números de ratos em cada grupo estão expressos entre parênteses. Fenil (fenilefrina, 5 µg/kg de peso corporal), NPS (nitroprussiato de sódio, 30 µg/kg de peso corporal), KCN (cianeto de potássio, 40 µg/0,1 ml/rato).

10 – Análise histológica

Nas figuras 26 e 27 estão ilustrados o locais típicos das injeções unilaterais e bilaterais, respectivamente, na área RVL. As injeções na área RVL localizaram-se ventralmente ao núcleo ambíguo e imediatamente caudal ao núcleo facial.

A figura 28 ilustra uma lesão típica da região AV3V em um rato representativo dos grupos lesados. A lesão da região AV3V localiza-se entre a comissura anterior e a base do terceiro ventrículo com destruição bilateral do tecido periventricular desde a lâmina terminal até o hipotálamo anterior. As estruturas que são completamente destruídas pela lesão da região AV3V são a parede anterior do terceiro ventrículo que inclui o órgão vasculoso da lâmina terminal (OVLT), núcleo preóptico periventricular, parte ventral do núcleo preóptico mediano. Destruição parcial do núcleo preóptico medial e do núcleo hipotalâmico anterior também foi observado em alguns animais.

Na Figura 29 está ilustrado o local das injeções no ventrículo lateral (VL)

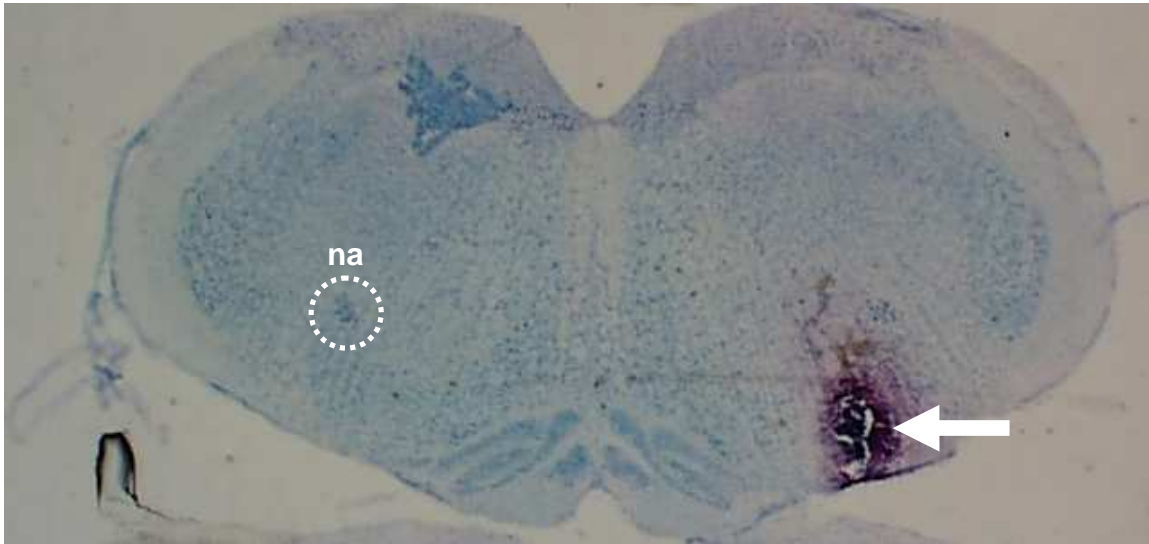


Figura 26: Fotomicrografia mostrando o sítio de injeção unilateral na área RVL (seta). na = núcleo ambíguo.

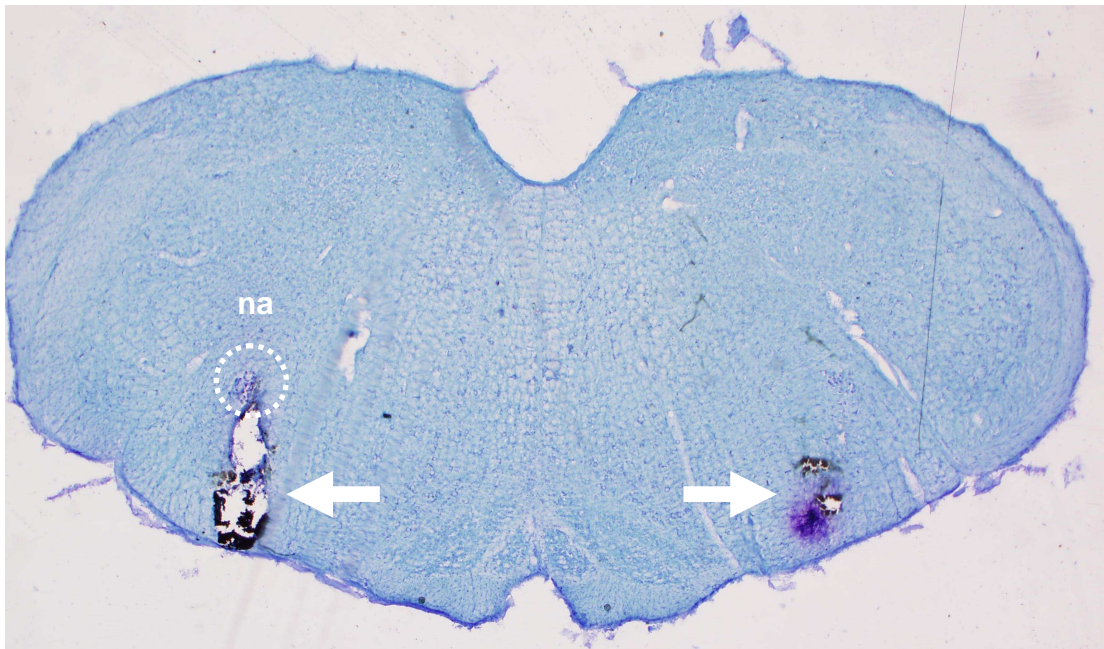


Figura 27: Fotomicrografia mostrando os sitios de injeções bilaterais na área RVL (setas). na = núcleo ambíguo.

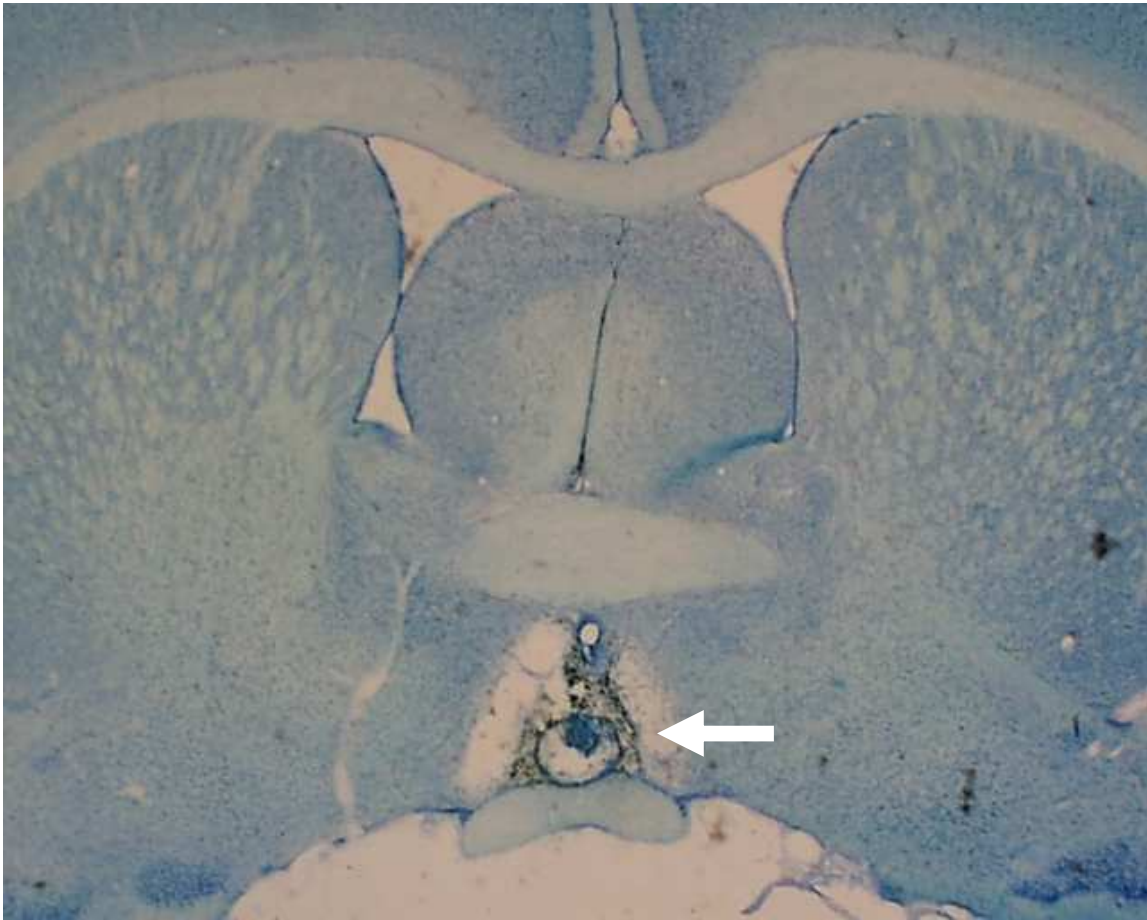


Figura 28: Fotomicrografia mostrando o sítio de lesão da região AV3V (seta)

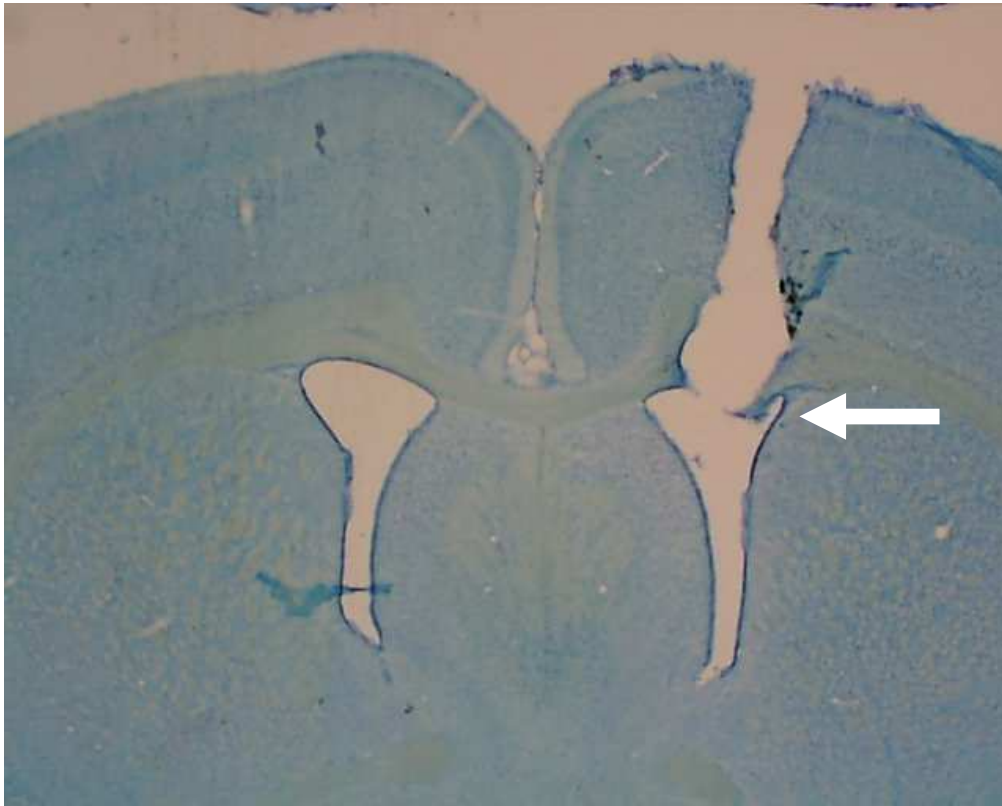


Figura 29: Fotomicrografia mostrando o sítio das injeções no VL (seta)

DISCUSSÃO

Importantes mecanismos responsáveis pela regulação cardiovascular estão presentes em áreas localizadas nas porções anteriores do encéfalo (áreas prosencefálicas), bem como em áreas localizadas no tronco encefálico, (Spyer, 1972; Brody e Johnson, 1980; Willete e cols., 1983; Brown e Guyenet, 1984; Guyenet, 1990; Agarwal e Calaresu, 1993; Pyner e Coote, 1997; Wyss e cols., 1999; Dampney e cols., 2003).

Entre as áreas prosencefálicas importantes para o controle cardiovascular, destaca-se a região anteroventral do terceiro ventrículo (AV3V). A região AV3V é constituída pelo órgão vasculoso da lâmina terminal (OVL), altamente vascularizado e livre de barreira hemato-encefálica (BHE) localizado na parede anterior do terceiro ventrículo, pelo tecido periventricular da região preóptica e da porção anterior da área hipotalâmica anterior e pela parte ventral do núcleo preóptico mediano (NPM) (Brody e cols., 1978; 1980).

Em se tratando das regiões bulbares, o circuito básico de controle cardiovascular é composto pela área rostro ventrolateral do bulbo (RVL), área caudo ventrolateral do bulbo (CVL), núcleo do trato solitário (NTS) e núcleo ambíguo (NA), (Finley e Katz, 1992; Ciriello e cols., 1994; Machado, 2001).

A área RVL que é localizada ventralmente ao núcleo ambíguo é conhecida por conter os elementos necessários para geração e manutenção do tônus vasomotor simpático para a coluna intermédia lateral (CIL), (Guertzenstein e Silver, 1974; Morrison e Reis, 1991; Araújo e cols., 1999). Um importante neurotransmissor excitatório presente na área RVL e que está envolvido nos mecanismos de regulação cardiovascular é o aminoácido glutamato (Sved e

Gordon, 1994). Injeção de glutamato na área RVL de ratos não anestesiados produz aumento na atividade simpática e da resistência vascular periférica (Sun, 1995; De Paula e Machado, 2001). Além desses efeitos, a injeção de glutamato na área RVL produz aumento dose dependente na pressão arterial média (PAM), com um tempo de duração de aproximadamente 45 segundos, sendo que esse aumento é reduzido em ratos com lesão eletrolítica aguda (1 dia) ou crônica (15 dias) da região AV3V (Vieira e cols., 2006).

Nos presentes resultados, mostramos que as lesões agudas e crônicas da região AV3V também atenuaram a resposta pressora da injeção da angiotensina II (Ang II), mas não a resposta pressora do agonista colinérgico muscarínico carbacol na área RVL. É bem conhecido que mecanismos angiotensinérgicos ou colinérgicos centrais são importantes na regulação cardiovascular (Brezenoff e Giuliano, 1982; Brezenoff, 1984; Lappe e Brody, 1984; Denton, 2006). A exemplo dos receptores glutamatérgicos, existem receptores angiotensinérgicos e colinérgicos na área RVL (Arneric e cols., 1990; Allen e cols., 1998; Hu e cols., 2002) e a ativação desses receptores causa aumento na pressão arterial e atividade simpática (Punnen e cols., 1986; Giuliano e cols., 1989; Sasaki e Dampney., 1990; Hirooka e cols., 1997; Kubo e cols., 2000; Becker e cols., 2005).

Resultados anteriores mostrando que a lesão da região AV3V atenuava a resposta pressora do glutamato injetado na área RVL (Vieira e cols., 2006) deixavam uma dúvida se a lesão da região AV3V poderia atenuar inespecificamente qualquer resposta pressora produzida pela ativação da área RVL ou apenas a resposta do glutamato. Os presentes resultados mostram que em ratos com lesão eletrolítica aguda ou crônica da região AV3V, a resposta

pressora da ANG II, mas não a do carbacol injetados na área RVL, está atenuada. Esses resultados mostram que a lesão da região AV3V não interfere de maneira inespecífica qualquer resposta pressora causada pela ativação da área RVL. Ou seja, existem mecanismos presentes na área RVL que não são afetados pela lesão da região AV3V, como é o caso de mecanismos colinérgicos. Esses resultados são parecidos com outros resultados de nosso laboratório que mostraram que a lesão da região AV3V aguda ou crônica bloqueia a resposta pressora do glutamato injetado no NTS de ratos não anestesiados (Vieira e cols., 2004) mas não a resposta pressora da taquicinina substância P (dados não publicados).

Nos ratos com lesão aguda (1 dia) da região AV3V, observa-se uma taquicardia que permanece nos primeiros dias após a lesão (Menani e cols, 1988b), sem alterações significantes na PAM basal. Porém, nos ratos com lesão crônica (15 dias), onde continua ocorrendo atenuação da resposta pressora da ANG II injetada na área RVL, não ocorre modificação da frequência cardíaca basal.

A lesão da região AV3V aguda e crônica não modificou as respostas cardiovasculares produzidas pelo teste de quimiorreflexo com injeção de cianeto de potássio (KCN) nem as respostas barorreflexas produzidas por doses pressoras de fenilefrina ou hipotensoras de nitroprussiato de sódio (Bealer, 1995), ou seja, a atenuação da resposta pressora da ANG II injetada na área RVL não foi devido a uma possível alteração dos reflexos cardiovasculares após a lesão da região AV3V. Esses resultados mostram a importância que as áreas prosencefálicas, em especial a região AV3V, possuem sobre o controle da

resposta pressora ativada pela ANG II injetada na área RVL. Diversos estudos mostram que a lesão da região AV3V prejudica o desenvolvimento das mais diversas formas de hipertensão experimental em ratos (Brody e cols., 1978; Brody e Johnson, 1980; Brody e cols., 1984; Menani e cols., 1988a), com exceção da hipertensão em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) nos quais sugere-se que há um aumento da atividade dos mecanismos colinérgicos na área RVL (Kubo e cols., 1995). Como os presentes resultados mostraram que a lesão da região AV3V também não modifica a resposta pressora produzida pela ativação colinérgica da área RVL, parece que há uma boa correlação quando se compara a ausência de efeitos da lesão da região AV3V na hipertensão em SHR e na resposta pressora produzida pela estimulação colinérgica da área RVL. Se o aumento de atividade de mecanismos colinérgicos da área RVL tem alguma importância para a hipertensão nos SHR (Kubo e cols., 1998), pode-se sugerir que a hipertensão em SHR provavelmente não é atenuada pela lesão da região AV3V porque a mesma não conseguiria reduzir o efeito pressor produzido pela hiperatividade do mecanismo colinérgico da área RVL nesses animais.

Pelos resultados obtidos no presente estudo ou em estudo anterior (Vieira e cols., 2006) ficou claro que a lesão da região AV3V prejudica os efeitos pressores produzidos pela estimulação glutamatérgica ou angiotensinérgica da área RVL o que sugere que a atividade dessa região facilita os efeitos pressores produzidos pela ação do glutamato e da ANG II na área RVL. A partir desses resultados, uma questão que surgiu foi quais mecanismos afetados pela lesão da região AV3V seriam importantes para o efeito pressor produzido pela estimulação glutamatérgica ou angiotensinérgica da área RVL.

Sabe-se que a região AV3V possui receptores colinérgicos e angiotensinérgicos (Israel e cols., 1984; Plunkett e cols., 1987; Fitts e Masson, 1990; Mahon e cols., 1995; McKinley e cols., 1996; Lenkei e cols., 1997; McKinley e cols., 2003) e as respostas pressoras produzidas pela injeção central de ANG II ou carbacol, que dependem da ativação simpática e secreção de vasopressina (ADH) (Hoffman e cols., 1977; Imai e cols., 1989), são bloqueadas pela lesão da região AV3V (Brody e cols., 1978; Brody e Johnson, 1980; Menani e cols., 1990). Assim, haveria a possibilidade de mecanismos colinérgicos e angiotensinérgicos prosencefálicos gerarem sinais facilitatórios que através da região AV3V alcançariam a área RVL facilitando respostas pressoras produzidas pela injeção de glutamato ou ANG II na área RVL. Dados da literatura mostram que tanto os mecanismos colinérgicos quanto os angiotensinérgicos podem estar envolvidos na regulação cardiovascular interagindo com o glutamato (Feldman e Buccafusco, 1997; Chen e Toney, 2003).

Nossos resultados mostram que a injeção de glutamato na área RVL causa resposta pressora sem alterações significantes na frequência cardíaca (Vieira e cols., 2006 e presentes resultados). Porém, 15 minutos após a injeção do antagonista colinérgico muscarínico atropina no ventrículo lateral (VL), a resposta pressora do glutamato injetado na área RVL foi reduzida mostrando que mecanismos colinérgicos, provavelmente prosencefálicos eram importantes para a resposta pressora causada pela ação do glutamato na área RVL. Porém, como a atropina foi injetada no VL, uma dúvida que surgiu foi a respeito do sítio de ação da mesma, visto a existência de receptores colinérgicos em várias áreas do sistema nervoso central (SNC) incluindo na própria área RVL (Martin e cols., 1992;

Levey e cols., 1995; Kubo e cols., 1998). Por essa razão, foi injetada atropina diretamente na área RVL para verificarmos se a atenuação da resposta pressora do glutamato era devido a alguma ação da atropina nessa área causada pelo seu espalhamento SNC. Como mostram nossos resultados, a resposta pressora do glutamato na área RVL não foi alterada pela prévia injeção da atropina na mesma área. Com isso descartamos a participação de receptores colinérgicos localizados na área RVL, ou seja, a resposta pressora do glutamato não depende da liberação de acetilcolina na área RVL, mas sim em alguma outra área central, provavelmente prosencefálica. É importante salientar que a exemplo de dados da literatura (Moore e Drexler, 1982; Nicoletta e cols., 1983), a injeção de atropina no VL não alterou a PAM ou a frequência cardíaca basal. Portanto na dose utilizada (4 nmol/1 µl) a atropina atuou apenas centralmente, diferentemente de doses a partir de 8 nmol que poderiam até causarem efeitos mais intensos na resposta do glutamato na área RVL, porém essas doses começariam a ter efeitos periféricos (Takakura e cols, 2003). Ademais, no fim dos experimentos, injetamos o agonista colinérgico muscarínico carbacol para testarmos a eficiência do bloqueio colinérgico. Verificamos no presente estudo que a resposta pressora característica do carbacol injetada no VL (Saad e cols., 1997) foi quase que abolida nos ratos onde se observou atenuação da resposta pressora do glutamato na área RVL.

Além da importância dos mecanismos colinérgicos centrais na resposta pressora do glutamato na área RVL, foi também estudada a participação dos mecanismos angiotensinérgicos centrais na mesma resposta, utilizando-se o bloqueio angiotensinérgico com os antagonistas específicos de receptores AT1, o

losartan potássico (Timmermans e cols., 1995; Watson e cols., 2005) e o ZD 7155 (Rey e cols., 2007) injetados no VL. Os resultados demonstram que as respostas pressoras do glutamato injetado na área RVL foram também atenuadas após ambos antagonistas angiotensinérgicos injetados no VL o que sugere que mecanismos angiotensinérgicos prosencefálicos também atuariam facilitando a resposta pressora do glutamato injetado na área RVL. A PAM basal não foi modificada pelos antagonistas losartan ou ZD 7155 no VL. A exemplo do protocolo seguido para a atropina, injetamos diretamente tanto o losartan quanto o ZD 7155 na área RVL para testarmos um possível espalhamento quando injetados no VL. As injeções dos antagonistas losartan (Fontes e cols., 1997) e ZD 7155 na área RVL causaram uma elevação inicial e rápida da PAM sendo que após 15 minutos, a PAM já estava em níveis basais (valores antes da injeção). A resposta pressora do glutamato injetado na área RVL foi bloqueada e atenuada pelos antagonistas angiotensinérgicos losartan e ZD 7155, respectivamente, na mesma área. Esses resultados não permitiram excluir uma possível ação dos antagonistas diretamente na área RVL quando injetados no VL, ou seja, a redução dos efeitos do glutamato pela injeção dos antagonistas angiotensinérgicos no VL poderia ser devido ao espalhamento deles alcançando a área RVL. Porém, um teste adicional mostrou que a resposta pressora da ANG II injetada na área RVL não foi bloqueada pela prévia injeção dos seus antagonistas losartan e ZD 7155 no VL excluindo, assim, uma ação dos antagonistas angiotensinérgicos na área RVL quando a injeção é feita no VL nas doses utilizadas.

Assim, pelos presentes resultados, tanto os mecanismos angiotensinérgicos localizados no prosencéfalo quanto os localizados na própria área RVL seriam

importantes para a resposta pressora do glutamato injetado na área RVL. Por isso, podemos sugerir que a ANG II pode ser um dos neurotransmissores que quando liberado na área RVL pode facilitar a ação do glutamato para produzir resposta pressora.

A figura 30 sugere possíveis locais onde os mecanismos angiotensinérgicos e colinérgicos centrais poderiam atuar para modular a resposta pressora do glutamato na área RVL. Os mecanismos angiotensinérgicos poderiam facilitar a resposta pressora do glutamato atuando tanto na área RVL como em outras áreas, enquanto os mecanismos colinérgicos dependeriam sempre de outras áreas que não a área RVL. Entre as outras áreas, as áreas prosencefálicas parecem ser as mais prováveis.

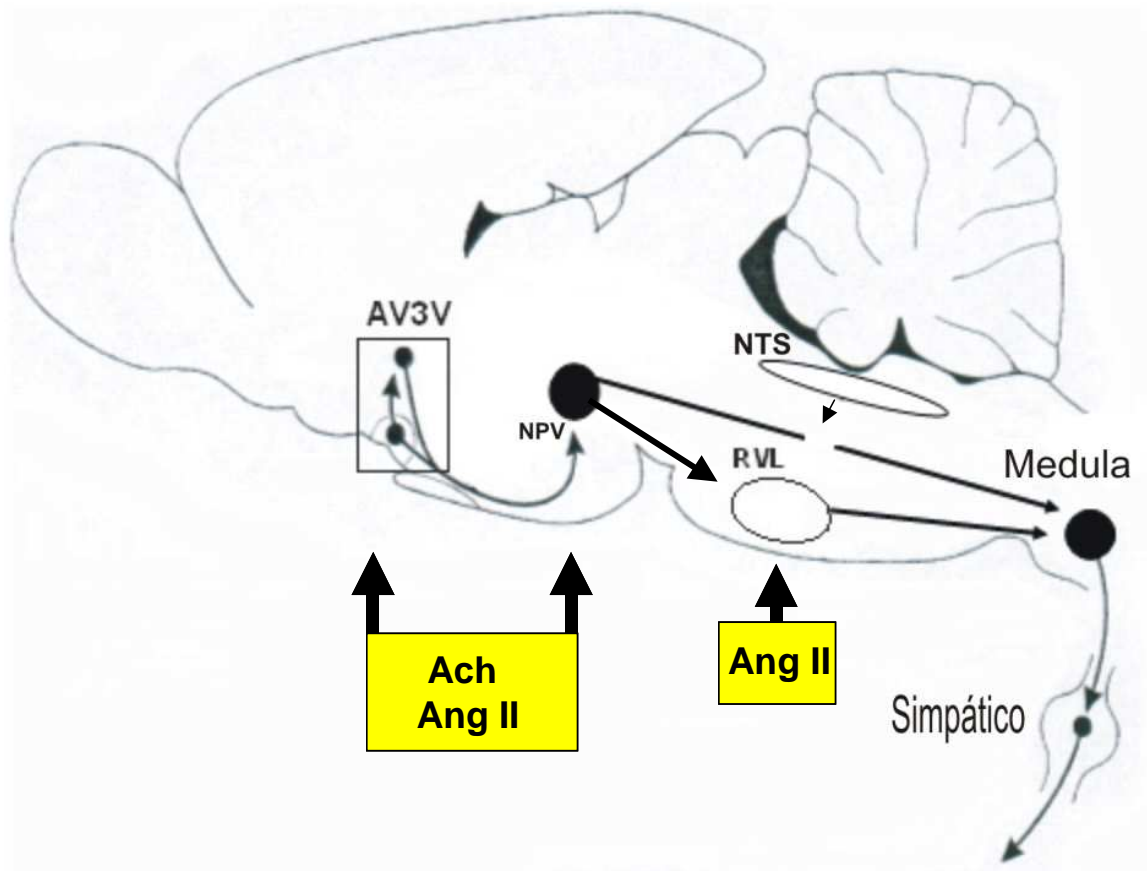


Figura 30: Esquema mostrando a possível localização das vias colinérgicas e angiotensinérgicas que modulariam a resposta pressora do glutamato na área RVL. AV3V – região anteroventral do terceiro ventrículo; NPV - núcleo paraventricular do hipotálamo; NTS - núcleo do trato solitário; ANG II - angiotensina II; Ach - acetilcolina.

A área RVL possui receptores angiotensinérgicos AT1 (Sheriff e cols.,2006). Bloqueando-se esses receptores com o losartan ou ZD 7155, a ANG II teria sua ação diminuída e conseqüentemente a resposta dos neurônios ao glutamato também estaria sendo diminuída. Alguns dados da literatura mostram que agindo centralmente, a ANG II tem a capacidade de facilitar a neurotransmissão glutamatérgica e dificultar a gabaérgica (Zhu e cols., 1998; Hu e cols., 2002; Chen e Toney, 2003; Li e Pan, 2005). No presente estudo, mostramos que a resposta pressora produzida pela injeção de glutamato (5 nmol/100 nl) na área RVL é potencializada pela prévia injeção de ANG II (50 ng/100 nl), que causa discreta elevação na PAM, no mesmo local. Ainda, não sabemos quais seriam os mecanismos responsáveis por essa potencialização. Uma possibilidade seria a hipopolarização de neurônios da área RVL na presença de ANG II o que poderia permitir que os mesmos respondessem melhor ao glutamato. Um exemplo de uma possível facilitação da neurotransmissão glutamatérgica pela ANG II já foi visto em ratos desidratados onde a privação hídrica causou aumento das respostas dos neurônios da área RVL ao glutamato (Brooks e cols., 2004).

Nesse caso, mecanismos colinérgicos (Vieira e cols., 2007) e angiotensinérgicos centrais facilitando as ações do glutamato na área RVL poderiam auxiliar na manutenção da atividade simpática e da pressão arterial em diversas situações como por exemplo, casos de hemorragia, desidratação extracelular e hipovolemia.

Embora uma redução da liberação de neurotransmissores excitatórios na área RVL como a própria ANG II pelo bloqueio de mecanismos colinérgicos e angiotensinérgicos prosencefálicos seja um mecanismo possível, não se pode

descartar uma possível facilitação de mecanismos inibitórios. O bloqueio angiotensinérgico e/ou colinérgico prosencefálico poderia facilitar a neurotransmissão gabaérgica em diferentes áreas do SNC, em áreas como o núcleo paraventricular do hipotálamo (NPV) e núcleo parabraquial lateral (NPBL), (Kubo e cols., 2000; Li e Pan, 2007) dificultando assim a atividade simpática.

Na Figura 31 está apresentada uma possível organização do circuito central relacionando mecanismos angiotensinérgicos e colinérgicos centrais com mecanismos glutamatérgicos da área RVL. De acordo com a figura 31, tanto o glutamato, quanto a acetilcolina e a ANG II agindo na área RVL ativam o simpático aumentando a PAM. A área RVL recebe influências tanto inibitórias quanto excitatórias vindas de diferentes áreas do encéfalo. Dentre as projeções inibitórias, destaca-se aquelas que liberam o aminoácido inibitório gaba, que dificultariam os efeitos do glutamato. Por outro lado, dentre as projeções excitatórias, destacam-se as colinérgicas e angiotensinérgicas, que liberariam ANG II na área RVL facilitando os efeitos do glutamato.

As áreas prosencefálicas, como o OSF e o OVLT são livres de BHE e por essa razão, poderiam detectar alterações químicas que ocorrem no plasma. Uma hipovolemia, por exemplo, poderia levar a uma queda de PAM. Porém, diferentes mecanismos são acionados para evitar a queda da PAM e dentre eles está o aumento nos níveis plasmáticos de ANG II. A ANGII agindo em receptores presentes no OSF ou OVLT poderia facilitar o aumento da atividade simpática seja por meio de conexões com a área RVL liberando a própria ANG II ou conexões com o NPV para a CIL.

Em uma outra situação como, por exemplo, na privação hídrica, além do aumento de ANG II, ocorre aumento na osmolaridade plasmática. Essas áreas livres de BHE possuem osmorreceptores (Shi e cols., 2007) que quando ativados acionam mecanismos colinérgicos prosencefálicos (Menani e cols., 2002). Esses mecanismos levam a um aumento na atividade simpática e concentrações plasmáticas de ADH resultando em elevação da PAM (Hoffman e cols., 1977; Imai e col., 1989; Richard e Bourque, 1992).

Um outro mecanismo interessante que pode colaborar para a resposta pressora do glutamato é a inibição de mecanismos gabaérgicos. Nas situações descritas acima, tanto a ANG II quanto a acetilcolina poderiam atenuar a neurotransmissão gabaérgica tônica.

Como no presente estudo, os animais utilizados para os bloqueios farmacológicos estavam normohidratados, ou seja, com níveis normais de ANG II e acetilcolina, sugere-se que possa existir um mecanismo tônico de facilitação da resposta pressora do glutamato. Isto porque, quando diminuimos a funcionalidade desses receptores através dos diferentes bloqueios (colinérgicos ou angiotensinérgicos) localizados no prosencéfalo, a capacidade do glutamato produzir resposta pressora na área RVL foi atenuada.

Por outro lado, não é descartada a hipótese de que a ativação da área RVL pelo glutamato recrute outras áreas prosencefálicas, como por exemplo a região AV3V, que em torno, facilitaria a atividade da área RVL através dos mecanismos colinérgicos e angiotensinérgicos.

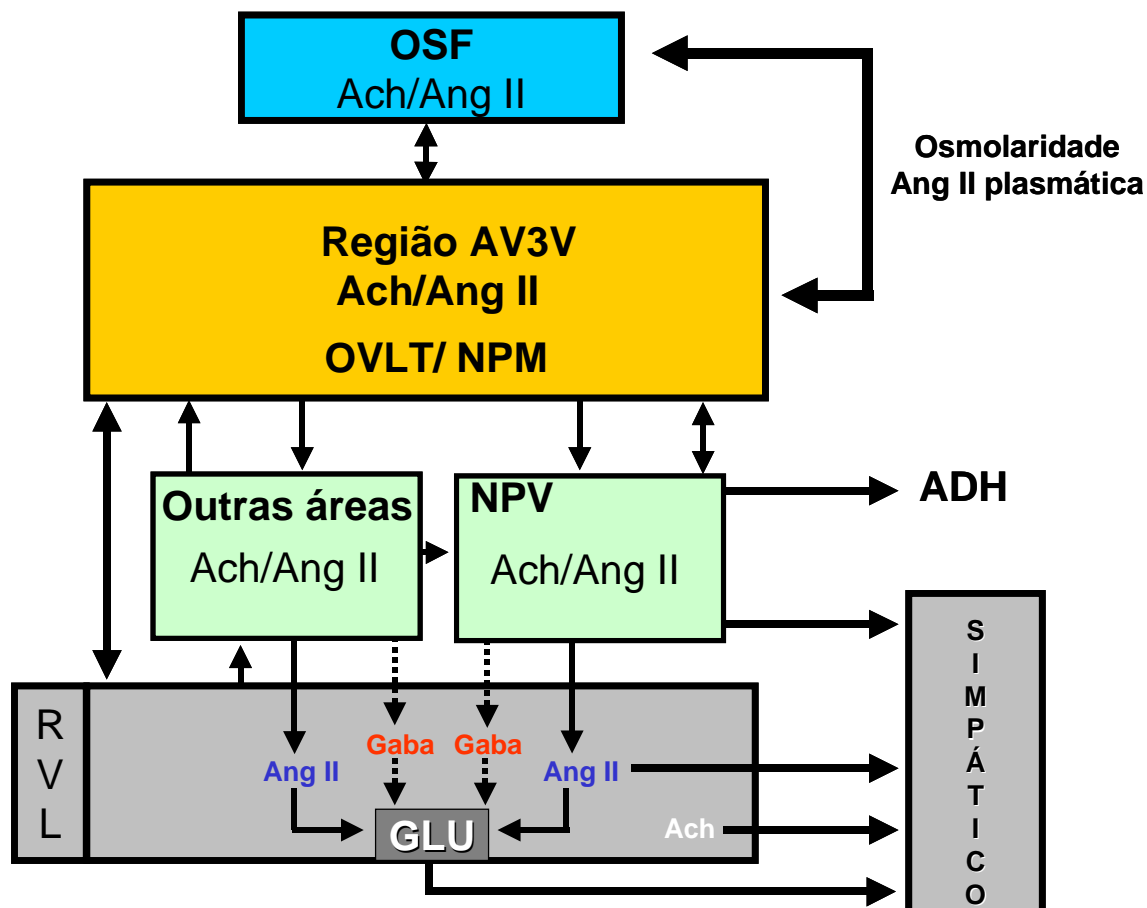


Figura 31: Esquema de possíveis mecanismos pelos quais vias angiotensinérgicas e colinérgicas localizadas no prosencéfalo poderiam influenciar a atividade glutamatérgica na área rostro ventrolateral (RVL). NPV - núcleo paraventricular do hipotálamo; OSF - órgão subfornical; AV3V – região antero ventral do terceiro ventrículo; NPM - núcleo preóptico mediano; OVLT - órgão vasculoso da lâmina terminal; Ach - acetilcolina; ANG II – angiotensina II; Glu – glutamato; ADH – vasopressina. Setas contínuas – projeções excitatórias; Setas tracejadas – projeções inibitórias.

É importante ressaltar que a exemplo de ratos com lesão da região AV3V, também os bloqueios colinérgico e angiotensinérgico não modificaram as respostas baro e quimiorreflexas o que demonstra que os efeitos observados não decorrem de alterações dos reflexos cardiovasculares. Porém, é preciso se observar que a resposta pressora do glutamato na área RVL é atenuada de maneira semelhante em ratos com lesão da região AV3V ou após os bloqueios proencefálicos colinérgico ou angiotensinérgico, mas a resposta pressora da ANG II na área RVL é atenuada pela lesão da região AV3V, mas não pelos antagonistas angiotensinérgicos losartan ou ZD 7155 injetados no VL. Parece não existir uma boa explicação para essa diferença. Uma hipótese para tentar explicar esses resultados é que mesmo que a liberação de ANG II na área RVL estivesse sendo prejudicada pelos antagonistas losartan ou ZD 7155 injetados no VL, a injeção exógena recolocaria a ANG II novamente atuando em seus receptores na área RVL causando a resposta pressora. No caso da lesão da região AV3V, por se tratar de um processo mais crônico, talvez mesmo a reposição de ANG II não seria eficiente para recuperar a resposta. Mas também é preciso se levar em conta que além da ANG II a lesão da região AV3V poderia modificar a liberação de outros neurotransmissores na área RVL, até mesmo neurotransmissores inibitórios como o GABA que tem grande influência na atividade de neurônios da área RVL (Schereihofer e cols., 2005; Menezes e Fontes, 2007). Assim, parece que diferentes mecanismos são afetados pela lesão da região AV3V e pelo tratamento com atropina, losartan ou ZD 7155 centralmente.

Dados recentes do nosso laboratório mostraram que a resposta pressora produzida pela injeção de ANG II na área RVL é atenuada pela prévia injeção de

prazosin e abolida pela combinação de prazosin e do antagonista vasopressinérgico V1. Por outro lado, somente a injeção de prazosin abole a resposta pressora do glutamato na área RVL. Isso sugere que a resposta pressora da ANG II é dependente do aumento de atividade simpática e secreção de ADH, já a resposta pressora do glutamato é unicamente pelo aumento de atividade simpática. Diante desses resultados, poderia se especular que a lesão da região AV3V afetaria ambos os componentes (neural e humoral) prejudicando dessa forma, tanto os efeitos do glutamato como da ANG II, enquanto o bloqueio dos receptores colinérgicos ou angiotensinérgicos centrais afetaria somente o componente neural simpático. Desta forma, uma possível explicação seria a de que o componente neural simpático, mas não o componente humoral, ativado pela ANG II na área RVL é influenciado pelos bloqueios prosencefálicos. Isso possibilita o aparecimento da resposta pressora da ANG II em ratos com bloqueio prosencefálico. Em outras palavras, a resposta pressora remanescente dependeria somente do componente humoral.

Diferente dos ratos com lesão da região AV3V onde ocorre um comprometimento menos seletivo de mecanismos neurais e humorais, e desta forma, prejudicando as respostas pressoras do glutamato (Vieira e col., 2006) e da ANG II (presentes resultados) injetados na área RVL. Mesmo repondo a ANG II na área RVL, o prejuízo do componente humoral é decisivo e dificulta o aparecimento da resposta pressora da ANG II.

Porém, a resposta pressora do carbacol injetado na área RVL não foi atenuada pela lesão da região AV3V o que sugere que alguns mecanismos pressores da área RVL não são alterados pela lesão da região AV3V.

Possivelmente, a neurotransmissão colinérgica poderia ser uma das candidatas a ter atividade aumentada na ausência de outros mecanismos excitatórios importantes (Belousov e cols., 2001). Isso poderia inclusive explicar a manutenção da atividade simpática e da pressão arterial nas situações em que outros mecanismos pressores da área RVL como os mecanismos glutamatérgicos estivessem comprometidos como é o caso da lesão da região AV3V ou os bloqueios centrais colinérgico ou angiotensinérgico.

As respostas pressoras produzidas pela injeção central tanto de ANG II quanto de carbacol são devidas à ativação simpática e liberação de ADH e são bloqueadas pela lesão da região AV3V (Hoffman e cols., 1977; Fink e cols., 1983; Lappe e Brody, 1984; Imai e cols., 1989; Menani e cols., 1990; Colombari e cols., 1992a; Colombari e cols., 1992b; Gonçalves e cols., 1992; Valladão e cols., 1992). Como o principal sítio de ativação dos neurônios pré-ganglionares simpáticos é a área RVL (Guertzenstein e Silver, 1974; Guyenet, 1990) onde o glutamato é um dos principais neurotransmissores (Sved e Gordon, 1994; Morrison, 2002), testou-se se a resposta pressora produzida pela injeção de ANG II ou carbacol dependeria da ativação dos receptores glutamatérgicos localizados na área RVL. Injeções bilaterais de ácido quinurênico na área RVL em dose que abole a resposta pressora do glutamato na mesma área não alteraram as respostas pressoras produzidas pelas injeções de ANG II ou carbacol no VL. Com isso, pode-se sugerir que o aumento na pressão arterial provocado pela ativação angiotensinérgica ou colinérgica de áreas prosencefálicas não depende de sinapses glutamatérgicas na área RVL. Como as respostas pressoras da ANG II ou do carbacol i.c.v. dependem de atividade simpática e secreção de ADH, outras

áreas encefálicas como o NPV e o núcleo supra óptico (NSO) poderiam estar envolvidas. O NPV é composto pelos neurônios magnocelulares, que estão envolvidos com a secreção de ocitocina e ADH, bem como de neurônios parvocelulares envolvidos com o controle da atividade simpática indiretamente pelas projeções neuronais direcionadas à área RVL, bem como diretamente projetando-se para a CIL (Badoer, 2001). Além disso, neurônios do NPV recebem projeções diretas de áreas pertencentes à região AV3V (Ota e cols., 1997; Stocker e Toney, 2005). Dessa forma, ao ativarmos os receptores angiotensinérgicos ou colinérgicos presentes na região AV3V (Mckinley e cols., 1995; Xu e cols., 2000) ou em outras áreas prosencefálicas com injeção de ANG II ou carbacol, haveria um aumento de atividade do NPV, que por sua vez poderia ativar diretamente o simpático, além de liberar ADH, independentemente de ativação da área RVL. Estudos anteriores já mostraram que a resposta pressora provocada pela ativação de neurônios do NPV não foi bloqueada pelo ácido quinurênico bilateralmente na área RVL (Kiely e Gordon, 1994). Esses mecanismos pressores poderiam assumir um importante papel na manutenção da pressão arterial quando mecanismos importantes para a regulação cardiovascular pertencentes a área RVL estão bloqueados (Cochrane e Nathan, 1989; 1994).

Diferente dos experimentos realizados em ratos anestesiados, onde não ocorre mudanças na PAM basal (Ito e Sved, 1997; Silva e cols., 2002), injeções bilaterais de ácido quinurênico na área RVL em ratos acordados causou uma elevação transitória na PAM basal que durou 5 minutos sem alterações significantes na frequência cardíaca. Inicialmente pensou-se que a causa do aumento da pressão arterial após as injeções bilaterais de ácido quinurênico na

área RVL fosse um possível comprometimento na respiração dos animais. Porém, as injeções de ácido quinurênico bilateralmente na área RVL na mesma dose que produz resposta pressora não alterou os parâmetros respiratórios como, volume corrente, frequência respiratória e ventilação pulmonar, como já havia sido anteriormente demonstrado por outro estudo (De Paula e Branco, 2005). Não há uma boa explicação porque o bloqueio glutamatérgico da área RVL em ratos acordados aumenta a pressão arterial. Talvez o aumento de PAM produzida pelo ácido quinurênico seja apenas decorrência de uma atividade agonista parcial daquela droga que permaneceria por algum tempo, mas logo desapareceria (Prescott e cols., 2006). Porém, baseado em um trabalho de Ito e Sved, (1997), uma das sugestões seria a existência de um circuito de auto inibição da área RVL dependente de glutamato. Esse mecanismo poderia ser importante para “frear” a área RVL momento a momento. Quando os mecanismos glutamatérgicos são bloqueados com ácido quinurênico, menos gaba seria liberado na área RVL e com isso aumentam as despolarizações dos neurônios. Porém, esse aumento não é duradouro porque o mecanismo de barorreflexo, que permaneceu inalterado pelo bloqueio bilateral com ácido quinurênico, conseguiria ajustar novamente a pressão arterial aos níveis basais.

O fato do mecanismo barorreflexo não ser alterado pelo bloqueio glutamatérgico na área RVL não foi surpresa, visto que as mudanças cronotrópicas em resposta a diferentes mudanças de pressão está relacionada principalmente ao funcionamento dos mecanismos vagais. Além disso, (Koshiya e cols., 1993) analisando os disparos dos neurônios barosensíveis da área RVL mostrou que o bloqueio glutamatérgico da área RVL não alterou as

despolarizações dos mesmos após injeções de fenilefrina e nitroprussiato de sódio endovenosamente. Dessa forma, podemos sugerir que a injeção de ácido quinurênico na área RVL não compromete o componente simpático do barorreflexo. Na verdade, nossos resultados sugerem que embora o glutamato injetado na área RVL tenha produzido resposta pressora (Vieira e cols., 2006; 2007), parece que se existir a liberação tônica de glutamato na área RVL, essa não é necessária para manter a ativação basal do simpático e a pressão arterial basal (Kiely e Gordon, 1994; Ito e Sved, 1997).

Outro resultado interessante foi a observação de que o bloqueio dos receptores glutamatérgicos bilateralmente na área RVL não alterou a resposta pressora produzida pela ativação do quimiorreflexo com injeção endovenosa de cianeto de potássio (KCN) que ativa os quimiorreceptores periféricos (Barros e cols., 2002). Esses resultados sugerem que o glutamato não seria o neurotransmissor liberado na área RVL pela ativação dos quimiorreceptores periféricos e estão de acordo com outros estudos anteriores que já colocavam em dúvida o papel do glutamato como neurotransmissor do quimiorreflexo na área RVL (Kubo e cols., 1997; Mauad e Machado, 2001). Mesmo que o glutamato não seja o neurotransmissor liberado na área RVL pela ativação dos quimiorreceptores, não é possível descartar a participação da área RVL nas respostas do quimiorreflexo, pois outros neurotransmissores podem estar envolvidos e, portanto, outros antagonistas precisam ser testados. Esses resultados são diferentes do estudo de (Sun e Reis, 1995) que mostrou que os receptores NMDA presentes na área RVL são importantes e participam da simpatoexcitação produzida pela ativação do quimiorreflexo. Porém esses

experimentos foram realizados em ratos anestesiados, fato esse que pode comprometer a atividade de outras áreas encefálicas, como por exemplo, áreas prosencefálicas que em ratos acordados possa ser fundamental para a integridade das respostas quimiorreflexas.

Existe um estudo sugerindo que o NPV pode estar envolvido nessa resposta, pois a lesão do NPV atenua a resposta pressora do quimiorreflexo em animais não anestesiados (Olivan e cols., 2001). Porém, se a conexão direta do NPV com a área RVL (Cham e Badoer, 2007) for importante para a resposta pressora do quimiorreflexo, os presentes resultados sugerem que essa projeção não é glutamatérgica. Também é preciso se levar em conta que a ativação dos quimiorreceptores periféricos em animais não anestesiados promove ajustes cardiovasculares e respiratórios, mas também comportamentais (Haibara e cols., 2002; Antunes e cols., 2005) e estes poderiam ter um papel fundamental no aumento da pressão arterial observada. É possível que o quimiorreflexo possa ativar projeções para áreas relacionadas a comportamentos defensivos (Rocha e cols., 2003; Berquin e cols., 2000) e mesmo que o bloqueio glutamatérgico na área RVL pudesse atenuar os sinais diretos dos quimiorreceptores para a área RVL, o sinais indiretos vindos das áreas de defesa que poderiam depender de outros neurotransmissores na área RVL predominariam elevando a pressão arterial.

A figura 32A mostra o esquema sugerido para o aparecimento das respostas cardiovasculares produzidas pela injeção de KCN (Barros e cols., 2002). Os quimiorreceptores periféricos são ativados pelo KCN. Projeções dos quimiorreceptores periféricos ascendem ao SNC onde fazem a primeira sinapse

na porção comissural do NTS (NTScom). A partir dessa primeira sinapse, duas vias são ativadas, uma via parassimpato-excitatória dependente do componente vagal no núcleo ambíguo (NA) que ocasionará bradicardia e uma via simpato-excitatória que ocasionará a resposta pressora (Figura 32B). No esquema apresentado na figura 32A sugerimos que a resposta pressora produzida pela ativação dos quimiorreceptores periféricos envolve um complexo circuito entre projeções do NTScom para áreas hipotalâmicas como por exemplo, o núcleo paraventricular do hipotálamo (NPV) e áreas relacionadas com o comportamento defensivo. Além disso, não se pode descartar o envolvimento da área RVL na resposta pressora do quimiorreflexo. Porém pelos presentes resultados, sugerimos que a projeção do NTScom para a área RVL, bem como a projeção NPV para a área RVL não envolve liberação de glutamato para o aparecimento da resposta pressora.

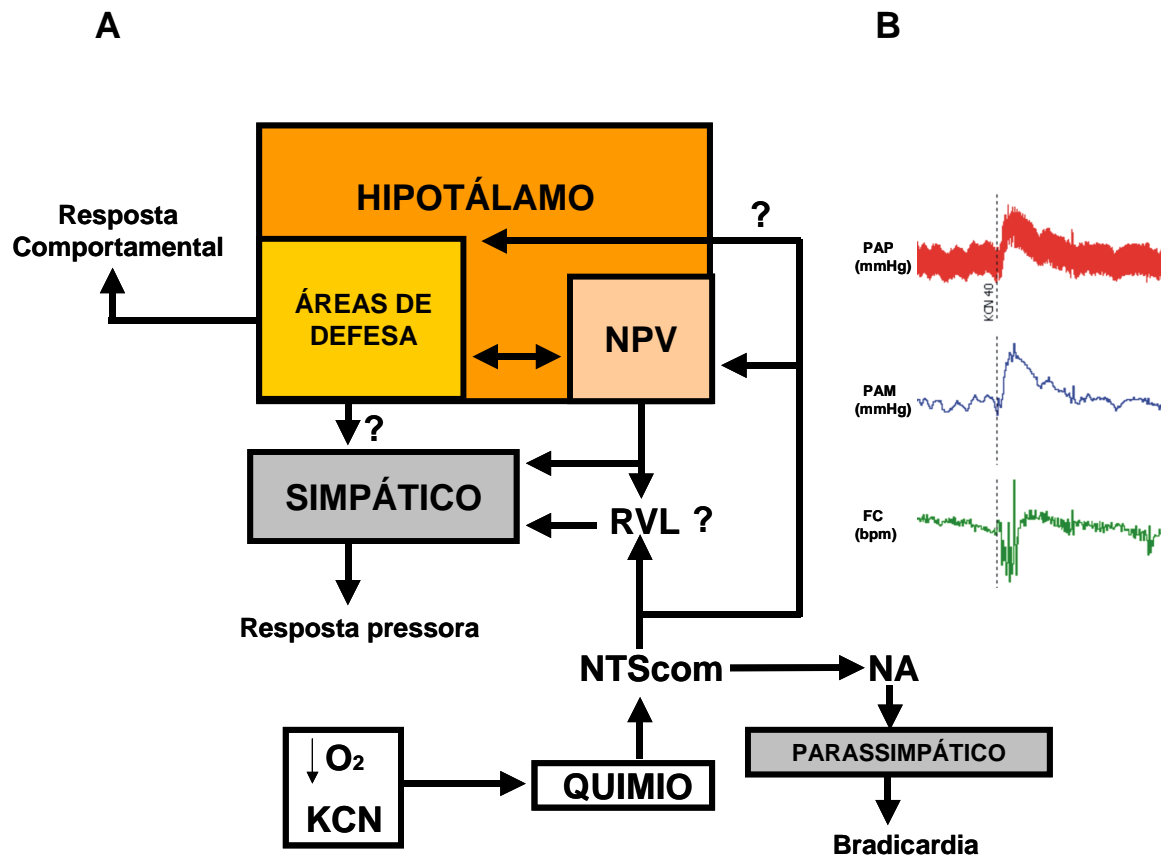


Figura 32: (A) esquema mostrando as possíveis vias envolvidas nas respostas cardiovasculares do quimiorreflexo periférico em ratos não anestesiados; (B) registro típico de um rato mostrando as respostas cardiovasculares produzidas pela injeção endovenosa de cianeto de potássio (KCN). NPV - núcleo paraventricular do hipotálamo; RVL - área rostro ventrolateral do bulbo; NTScom - núcleo do trato solitário comissural; NA - núcleo ambíguo; PAP - pressão arterial pulsátil; PAM - pressão arterial média; FC - frequência cardíaca.

Os resultados obtidos no presente estudo permitiram mostrar que áreas prosencefálicas, como por exemplo, a região AV3V tem papel facilitatório no aumento da pressão arterial quando a área RVL é ativada por alguns neurotransmissores excitatórios como o glutamato (Vieira e cols., 2006) e a ANG II (presentes resultados). Parte dessa facilitação é devida a mecanismos colinérgicos e angiotensinérgicos provavelmente presentes no prosencéfalo. Esses mecanismos quando ativados, podem influenciar diretamente as despolarizações de neurônios da área RVL pelo glutamato. Uma das sugestões é que esses mecanismos facilitatórios dependeriam da liberação de ANG II na área RVL, haja vista que o bloqueio desses receptores angiotensinérgicos presentes na área RVL atenuou a resposta pressora do glutamato.

Além disso, apesar da interação existente entre mecanismos colinérgicos, angiotensinérgicos e glutamatérgicos ser mostrada na literatura (Kubo e cols., 2000; Freeman e Brooks, 2007) a resposta pressora da injeção i.c.v. da ANG II e do carbacol não é dependente da atividade dos receptores glutamatérgicos presentes na área RVL, sugerindo que em ratos não anestesiados, outros mecanismos dependentes de outras áreas, como por exemplo as prosencefálicas, são fundamentais para a manutenção da pressão arterial.

CONCLUSÃO

Em ratos não anestesiados, a região anteroventral do terceiro ventrículo (AV3V) tem papel facilitatório no aumento da pressão arterial média quando a área rostroventrolateral do bulbo (RVL) é ativada por alguns neurotransmissores excitatórios, como por exemplo, glutamato e angiotensina II (ANG II).

A facilitação exercida pela região AV3V envolve mecanismos colinérgicos e angiotensinérgicos localizados no prosencéfalo e eventualmente também da ANG II diretamente na área RVL.

As respostas pressoras da ativação colinérgica ou angiotensinérgica central ou do quimiorreflexo não dependem de sinapses glutamatérgicas na área RVL.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **ALLEN, A.M. MOELLER, I., JENKINS, T.A., ZHUO, J., ALDRED, J.P., CHAY, S.Y. e MENDELSON, F.A.** Angiotensin receptors in the nervous system. *Brain Res.*, 47(1):17-28, 1998.
2. **ANTUNES, V.R., BONAGAMBA, L.G. e MACHADO, B.H.** Hemodynamic and respiratory responses to microinjection of ATP into the intermediate and caudal NTS of awake rats. *Brain Res.*, 1032(1-2):85-93, 2005.
3. **AGARWAL, S.K. e CALARESU, F.R.** Monosynaptic connection from caudal to rostral ventrolateral medulla in the baroreceptor reflex pathway. *Brain Res.*, 555:70-74, 1991.
4. **AGARWAL, S.K. e CALARESU, F.R.** Supramedullary inputs to cardiovascular neurons of rostral ventro-lateral in rats. *Am. J. Physiol.* 265 (Regulatory Integrative Comp. Physiol., 34):R111-R116, 1993.
5. **ARAÚJO, G.C., LOPES, O.U. e CAMPOS, R.R.** Importance of glycinergic and glutamatergic synapses within the rostral ventrolateral medulla for blood pressure regulation in conscious rats. *Hypertension*, 34:752-755, 1999.
6. **ARNERIC, S.P., GIULIANO, R., ERNSBERGER, P., UNDERWOOD, M.D. and REIS, D.J.** Synthesis, release and receptor binding of acetylcholine in the C1 area of the rostral ventrolateral medulla: Contributions in regulating arterial pressure. *Brain Res.*, 511:98-112, 1990.
7. **BABIC, T., RODER, S. e CIRIELLO, J.** Direct projections from caudal ventrolateral medullary depressor sites to the subfornical organ. *Brain Res.*, 1003:113-121, 2004.
8. **BADOER, E.** Hypothalamic paraventricular nucleus and cardiovascular regulation. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 28:95-99, 2001.
9. **BARROS, R.C.H., BONAGAMBA, L.G.H., OKAMOTO-CANESIN, R., DE OLIVEIRA, M., BRANCO, L.G.S e MACHADO, B.H.** Cardiovascular responses to chemoreflex activation with potassium cyanide or hypoxic hypoxia in awake rats. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical*, 97(2):110-115, 2002.
10. **BARTLETT, D. JR. e TENNEY, S.M.** Control of breathing in experimental anemia. *Respir.Physiol.*, 10(3):384-395, 1970.
11. **BAZIL, M.K. e GORDON, F.J.** Spinal NMDA receptors mediate pressor response evoked from the rostral ventrolateral medulla. *Am. J. Physiol.*, 260:H267-H275, 1991.

12. **BEALER, S.L.** Preoptic recess ablation selectively increases baroreflex sensitivity to angiotensin II in conscious rats. *Peptides*, 16: 1197-1201, 1995.
13. **BECKER, L.K., SANTOS, L.A. e CAMPAGNOLE-SANTOS, M.J.** Cardiovascular effects of angiotensin II and angiotensin (1-7) at the RVLM of trained normotensive rats. *Brain Res.*, 1040(1-2):121-128, 2005.
14. **BELOUSOV, A.B., O'HARA, B.F. e DENISOVA, J.** Acetylcholine becomes the major excitatory neurotransmitter in the hypothalamus in Vitro in the absence of glutamate excitation. *The Journal of Neuroscience*, 21(15):2015-2027, 2001.
15. **BLESSING, W.W., GOODCHILD, A.K., DAMPNEY, R.A. e CHALMERS, J.P.** Cell groups in the lower brain stem of the rabbit projecting to the spinal cord, with special reference to catecholamine-containing neurons. *Brain Res.*, 221(1):35-55, 1981.
16. **BERQUIN, P., BODINEAU, L., GROS, F. e LARNICOL, N.** Brainstem and hypothalamic areas involved in respiratory chemoreflexes: a Fos study in adult rats. *Brain Res.*, 857:30-40, 2000.
17. **BREZENOFF, H.A. e GIULIANO, R.** Cardiovascular control by cholinergic mechanisms in the central nervous system. *Annu Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 22:341-381, 1982.
18. **BREZENOFF, H.A.** Cardiovascular regulation by brain acetylcholine. *Fed. Proc.*, 43(1):14-20, 1984.
19. **BRODY, M.J., FINK, G.D., BUGGY, J., HAYWOOD, J.R., GORDON, F.J. e JOHNSON, A.J.** The role of the anteroventral third ventricle (AV3V) region in experimental hypertension, *Circ. Res.*, 43:1-13, 1978.
20. **BRODY, M.J. e JOHNSON, A.K.** Role of the anteroventral third ventricle region in fluid and electrolyte balance, arterial pressure regulation and hypertension, In: L. Martini, W.F. Ganong (Eds.), *Frontiers in Neuroendocrinology*, Vol. 6, Raven Press, New York, pp. 249-292, 1980.
21. **BRODY, M.J., FABER, J.E., MANGIAPANE, M.L. e PORTER, J.P.** The central nervous system and prevention of hypertension. In: *Handbook of Hypertension: Experimental and Genetic models of hypertension*, edited by de Jong, W. Elsevier, pp. 474-494, 1984.
22. **BROOKS, V.L., FREEMAN, K.L. e CLOW, K.A.** Excitatory amino acids in rostral ventrolateral medulla support blood pressure during water deprivation in rats. *Am. J. Physiol. – Heart*, 286:1642-1648, 2004.

23. **BROWN, D.L. e GUYENET, P.G.** Cardiovascular neurons of brainstem with projections to spinal cord. *Am. J. Physiol.*, 247:R1009-R1016, 1984.
24. **BUGGY, J. e JOHNSON, A.K.** Angiotensin induced thirst: Effect of third ventricle obstruction and periventricular ablation. *Brain Res.*, 149:117-128, 1978.
25. **CARVALHO, T.H.F., BERGAMASHI, C.T., LOPES, O.U. e CAMPOS, R.R.** Role of endogenous Angiotensin II on glutamatergic actions in the rostral ventrolateral medulla in Goldblatt hypertensive rats. *Hypertension*, 42:707-712, 2003.
26. **CHAM, J.L. e BADOER, E.** Exposure to a hot environment can activate rostral ventrolateral medulla-projecting neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus in conscious rats. *Exp. Physiol.*, 93(1):64-74, 2007.
27. **CHEN, Q.H. e TONEY, G.M.** Responses to GABA-A receptor blockade in the hypothalamic PVN are attenuated by local AT1 receptor antagonism. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 285(5):R1231-9, 2003.
28. **CIRIELLO, J., HOCHSTENBAH, S.L., e RODER, S.** Central projections of baroreceptor and chemoreceptor afferent fibers in the rat. In: I.R.A. Barraco (Ed.), *Nucleus of the solitary tract*. Boca Raton, FL, CRC Press, pp. 35-50, 1994.
29. **CIRIELLO, J., CAVERSON, M.M. e POLOSA, C.** Function of the ventrolateral medulla in the control of the circulation. *Brain Res. Rev.*, 11:359-391, 1996.
30. **COCHRANE, K.L. e NATAHAN, M.A.** Normotension in conscious rats after placement of bilateral electrolytic lesions in the rostral ventrolateral medulla. *J. Auton. Nerv. Syst.*, 26(3):199-211, 1989.
31. **COCHRANE, K.L. e NATAHAN, M.A.** Pressor systems involved in the maintenance of arterial pressure after lesions of the rostral ventrolateral medulla. *J. Auton. Nerv. Syst.*, 46(1-2):9-18, 1994.
32. **COLOMBARI, D.S.A., SAAD, W.A., CAMARGO, L.A.A., RENZI, A., De LUCA JR, L.A., COLOMBARI, E. e MENANI, J.V.** AV3V lesion impairs responses induced by cholinergic activation of SFO in rats. *Am. J. Physiol.*, 263:R1277-R1283, 1992a.
33. **COLOMBARI, D.S.A., SAAD, W.A., CAMARGO, L.A.A., RENZI, A., DE LUCA JR, L.A. e MENANI, J.V.** AV3V lesion suppresses the pressor, dipsogenic and natriuretic responses to cholinergic activation of the septal area in rats. *Brain Res.*, 572:172-175, 1992b.

34. **COLOMBARI, E., BONAGAMBA, L.G.H. e MACHADO, B.H.** Mechanisms of pressor and bradycardic responses to L-glutamate microinjected into the NTS of conscious rats. *Am. J. Physiol.* 266 (Regul. Int. Comp. Physiol., 35):R730-738, 1994.
35. **CRAVO, S.L., MORRISON, S.F. e REIS, D.J.** Differentiation of two cardiovascular regions within caudal ventrolateral medulla. *Am. J. Physiol.* 261 (Regul. Int. Comp. Physiol., 30):R985-R994, 1991.
36. **DAMPNEY, R.A.L., TAGAWA, T., HORIUCHI, J., POTTS, P.D., FONTES, M.A.P. e POISON, J.W.** What drives the tonic activity of presympathetic neurons in the rostral ventrolateral medulla? *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 27:1049-1053, 2000.
37. **DAMPNEY, R.A., FONTES, M.A.P., HIROOKA, Y., HORIUSHI, J., POTTS, P.D. e TAGAWA, T.** Role of angiotensin II receptors in the regulation of vasomotor neurons in the ventrolateral medulla. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, (5-6):467-472, 2002.
38. **DAMPNEY, R.A.L., HORIUCHI, J., TAGAWA, T., FONTES, M.A.P., POTTS, D. e POISON, J.W.** Medullary and supramedullary mechanisms regulating sympathetic vasomotor tone. *Acta Physiol. Scand.*, 177:209-218, 2003.
39. **DE PAULA, P.M. e MACHADO, B.H.** Changes in regional vascular resistance in response to microinjection of L-glutamate into different antero-posterior coordinates of the RVLM in awake rats. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical* 87:301-309, 2001.
40. **DE PAULA, P.M. e BRANCO, L.G.** Glutamatergic receptors of the rostral ventrolateral medulla are involved in the ventilatory response to hypoxia. *Respir. Physiol. Neurobiol.*, 146(2-3):125-134, 2005.
41. **DE LUCA JR, L.A., FRANCI, C.R., SAAD, W.A., CAMARGO, L.A.A. e ANTUNES-RODRIGUES, J.** Natriuresis, not seizures, induced by cholinergic stimulation of the locus coeruleus is affected by forebrain lesions and water deprivation. *Brain Res. Bull.*, 26:203-210, 1991.
42. **DE LUCA JR, L.A., SUGAWARA, A.M. e MENANI, J.V.** Brain versus peripheral angiotensin II receptors in hypovolaemia: behavioural and cardiovascular implications. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 27(5-6):437-442, 2000.
43. **DENTON, K.M.** Intricacies of brain angiotensin II signalling pathway. *Journal of Hypertension*, 24:39-41, 2006.
44. **FELDMAN, D.S. e BUCCAFUSCO, J.J.** Spinal muscarinic, glutamatergic and gabaergic receptor system in cardiovascular regulation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 281:274-283, 1997.

- 45. FINLEY, J.C.W. e KATZ, D.M.** The central organization of carotid body afferent projections to the brainstem of the rat. *Brain Res.*, 572:108-116, 1992.
- 46. FINK, G.D., BUGGY, J., HAYWOOD, J.R., JOHNSON, A.K. e BRODY, M.J.** Hemodynamic responses to electrical stimulation of areas of rat forebrain containing angiotensin on osmosensitive sites. *Am.J.Physiol.*, 235:H445-H451, 1978.
- 47. FITTS, D.A. e MASSON, D.B.** Preoptic angiotensin and salt appetite. *Behav.Neurosci.*, 104:643-650, 1990;
- 48. FONTES, M.A.P., PINGE, M.C., NAVES, V., CAMPAGNOLE-SANTOS, M.J., LOPES, O.U., KHOSLA, M.C. e SANTOS, R.A.** Cardiovascular effects produced by microinjections of angiotensins and angiotensin antagonists into the ventrolateral medulla of freely moving rats. *Brain Res.*, 750(1-2):305-310, 1997;
- 49. FREEMAN, K.L. e BROOKS, V.L.** AT(1) and glutamatergic in paraventricular nucleus support blood pressure during water deprivation. *Am. J. Physiol. Regul. Int. Comp. Physiol.*, 292(4):R1675-R1682, 2007;
- 50. GIULIANO, R., RUGGIERO, D.A., MORRISON, S., ERNSBERGER, P. e REIS, D.J.** Cholinergic regulation of arterial pressure by the C1 area of the rostral ventrolateral medulla. *J.Neurosc.*, 9:923-942, 1989.
- 51. GONÇALVES, P.C., ALVES, M.B., SILVEIRA, J.E., SAAD, W.A., CAMARGO, L.A., RENZI, A., DE LUCA JR, L.A. e MENANI, J.V.** Effects of AV3V lesion on the cardiovascular, fluid and electrolytic changes induced by activation of the lateral preoptic area. *Physiol. Behav.*, 52(1):173-177, 1992.
- 52. GORDON, F.J. e TALMAN, W.T.** Role of excitatory amino acids and their receptors in bulbospinal control of cardiovascular function. In: Kunos, G., Ciriello, J. (Eds.), *Central Neural Mechanisms in Cardiovascular Regulation*. Birkhauser, Boston, pp. 209-225, 1992.
- 53. GRANATA, A.R., NUMAO, Y., KUMADA, M. e REIS, D.J.** A1 noradrenergic neurons tonically inhibit sympatoexcitatory neurons of C1 area in rat brainstem. *Brain Res.*, 377:127-146, 1986.
- 54. GUERTZEINSTEIN, P.G. e SILVER, A.** Fall in blood pressure produced from discrete regions of the ventral surface of the medulla by glycine and lesions. *J. Physiol.*, 242:489-503, 1974.
- 55. GUYENET, P.G.** Role of the ventral medulla oblongata in blood pressure regulation. In *Central Regulation of Autonomic Functions*. A.D. Loewy & K.M. Spyer, Eds.:145-167. Oxford University Press. New York, 1990;

- 56. GUYENET, P.G.** The sympathetic control of blood pressure. *Nat. Rev. Neurosc.*, 7(5):335-346, 2006.
- 57. HAIBARA, A.S., COLOMBARI, E., CHIANCA, D.A.JR., BONAGAMBA, L.G.H. e MACHADO, B.H.** NMDA receptors in NTS are involved in bradycardic but not in pressor responses of chemoreflex. *Am. J. Physiol.* 269 (Heart Circ. Physiol., 38):H1421-H1427, 1995.
- 58. HAIBARA, A.S., TAMASHIRO, E., OLIVAN, M.V., BONAGAMBA, L.G e MACHADO, B.H.** Involvement of parabrachial nucleus in the pressor response to chemoreflex activation in awake rats. *Autonon. Neurosci.*, 101(1-2):60-67, 2002.
- 59. HIROOKA, Y., POTTS, P.D. e DAMPNEY, R.A.** Role of angiotensin II receptor subtypes in mediating the sympathoexcitatory effects of exogenous and endogenous angiotensin peptides in the rostral ventrolateral medulla of the rabbit. *Brain Res.*, 772(1-2):107-114, 1997.
- 60. HOFFMAN, W.E., PHILIPS, M.I., SCHIMID, P.G., FALCON, J. e WEET, J.F.** Antidiuretic hormone release and the pressor response to central angiotensin II and cholinergic stimulation. *Neuropharmacology*, (7-8):463-472, 1977.
- 61. HU, L., ZHU, D.N., YU, Z., WANG, J.Q., SUN, Z.J. e YAO, T.** Expression of angiotensin II type I [AT(1)] receptor in the rostral ventrolateral medulla in rats. *J. Appl. Physiol.*, 92:2153-2161, 2002.
- 62. IMAI, Y., ABE, K., SASAKI, S., MINAMI, N., MUNAKATA, M., YUMITA, S., NOBUNAGA, T., SEKINO, H. e YOSHINAGA, K.** Role of vasopressin in cardiovascular response to central cholinergic stimulation in rats. *Hypertension*, 13(6 Pt 1):549-557, 1989.
- 63. ISRAEL, A., CORREA, F.M., NIWA, M. e SAAVEDRA, J.M.** Quantitative determination of angiotensin II binding sites in rat brain and pituitary gland by autoradiography. *Brain Res.*, 322:341-345, 1984.
- 64. ITO, S. e SVED, A.F.** Blockade of angiotensin receptors in rat ventrolateral medulla removes excitatory vasomotor tone. *Am. J. Physiol.*, 270(6 Pt 2):R1317-R1323, 1996.
- 65. ITO, S. e SVED, A.F.** Tonic glutamate-mediated control of rostral ventrolateral medulla and sympathetic vasomotor tone. *Am. J. Physiol.*, 273(2 Pt 2):R487-R494, 1997.
- 66. JANSEN, A.S.P., WESSENDORF, M.W. e LOEWY, A.D.** Transneuronal labeling of CNS neuropeptide and monoamine neurons after pseudorabies virus injections into the stellate ganglion. *Brain Res.*, 683:1-24, 1995.

- 67. KIELY, J.M. e GORDON, F.J.** Role of rostral ventrolateral medulla in centrally mediated pressor response. *Am. J. Physiol.* 267 (Heart Circ. Physiol., 36):H1549-H1556, 1994.
- 68. KOSHIYA, N., HUANGFU, D. e GUYENET, P.G.** Ventrolateral medulla and sympathetic chemoreflex in the rat. *Brain Res.*, 609:174-184, 1993.
- 69. KUBO, T., ISHIZUKA, T. FUKUMORI, R., ASARI, T. e HAGIWARA, Y.** Enhanced release of acetylcholine in the rostral ventrolateral medulla of spontaneously hypertensive rats. *Brain Res.*, 686(1):1-9, 1995.
- 70. KUBO, T., TAGUCHI, K., SAWAI, N., OZAKI, S. e HAGIWARA, Y.** Cholinergic mechanisms responsible for blood pressure regulation on sympathoexcitatory neurons in the rostral ventrolateral medulla of the rat. *Brain Res. Bull.*, 42(3):199-204, 1997.
- 71. KUBO, T.** Cholinergic mechanism and blood pressure regulation in the central nervous system. *Brain Res. Bull.*, 46:475-481, 1998.
- 72. KUBO, T., HAGIWARA, Y., KEKIYA, D., CHIBA, S. e FUKUMORI, R.** Cholinergic inputs to rostral ventrolateral medulla pressor neurons from hypothalamus. *Brain Res. Bull.*, 53(3):275-282, 2000.
- 73. KUBO, T. e HAGIWARA, Y.** Enhanced activity of angiotensin II-sensitive neurons in the anterior hypothalamic area of spontaneously hypertensive rats. *Brain Res.*, 1020(1-2):140-146, 2004.
- 74. LACERDA, J.E.C., CAMPOS, R.R., ARAÚJO, G.C., ANDREATA-VAN LEYEN, S., LOPES, O.U. e GUERTZEINSTEIN, P.G.** Cardiovascular responses to microinjections of GABA or anesthetics into the rostral ventrolateral medulla of conscious and anesthetized rats. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 36:1269-1277, 2003.
- 75. LAPPE, R.W. e BRODY M.J.** Mechanisms of central pressor action of angiotensin II in conscious rats. *Am. J. Physiol. Regul. Int. Comp. Physiol.*, 246:56-62, 1984.
- 76. LENKEI, Z., PALKOVITS, M., CORVOL, P. e LLORENS-CORTES, C.** Expression of angiotensin type-1 (AT1) and type-2 (AT2) receptor mRNAs in the adult rat brain: A functional neuroanatomical review. *Frontiers in neuroendocrinology*, 18:383-439, 1997.
- 77. LEVEY, A.I., EDMUNDS, S.M., KOLIATSOS, V., WILEY, R.G. e HEILMAN, C.J.** Expression of M1-M4 muscarinic acetylcholine receptor proteins in rat hippocampus and regulation by cholinergic innervation. *J. Neurosci.*, 15:4077-4092, 1995.

- 78. LI, Y.W., ZHU, D.N., KAO, K.M., LIN, Q. e SUN, S.Y.** Role of acetylcholine, corticoids and opioids in the rostral ventrolateral medulla in stress-induced hypertensive rats. *Biol. Signals*, 4:124-132, 1995.
- 79. LI, J., BREZENOFF, H.E. e TKACS, N.V.** Identification of pressor regions activated by central cholinergic stimulation in rat brain. *Eur. J. Pharmacol.*, 337(2-3):227-233, 1997.
- 80. LI, D.P. e PAN, H.L.** Angiotensin II attenuates synaptic GABA release and excites paraventricular-rostral ventrolateral medulla output neurons. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 313(3):1035-1045, 2005.
- 81. LI, D.P. e PAN, H.L.** Role of GABAA and GABAB receptors in Paraventricular nucleus in control of sympathetic vasomotor tone in hypertension. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 320(2):615-626, 2007.
- 82. LIND, R.W., VAN HOESEN, G.W. e JOHNSON, A.K.** An HRP study of the connections of the subfornical organ of the rat. *J. Comp. Neurol.*, 210:265-277, 1982.
- 83. LOVICK, T.A. e LI, P.** Integrated function of neurons in the rostral ventrolateral medulla. *Prog. Brain Res.*, 81:223-232, 1989.
- 84. MACHADO, B.H. e BONAGAMBA, L.G.H.** Microinjection of L-glutamate into the nucleus tractus solitarii increases arterial pressure in conscious rats. *Brain Res.*, 576:131-138, 1992.
- 85. MACHADO, B. H.** Neurotransmission of the cardiovascular reflexes in the nucleus tractus solitarii of awake rats. *Ann. New York Acad. Sci.*, 940:179-196, 2001.
- 86. McKINLEY, M.J., BADOER, E., VIVAS, L. e OLDFIELD, B.J.** Comparison of c-fos expression in the lamina terminalis of conscious rats after intravenous or intracerebroventricular angiotensin. *Brain Res. Bull.*, 37:131-137, 1995.
- 87. McKINLEY, M.J., McALLEN, R.M., PENNINGTON, G.L., SMARDENCAS, A., WEISINGER, R.S. e OLDFIELD, B.J.** Physiological actions of angiotensin II mediated by AT1 and AT2 receptors in the brain. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. Suppl.*, 3:S99-104, 1996.
- 88. McKINLEY, M.J., ALLEN, A.M., MAY, C.N., McALLEN, R.M., OLDFIELD, B.J., SLY, D. e MENDELSON, F.A.O.** Neural pathways from the lamina terminalis influencing cardiovascular and body fluid homeostasis. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 28:990-992, 2001.

- 89. McKINLEY, M.J., ALBISTON, A.L., ALLEN, A.M., MATHAI, M.L., MAY, C.N., McALLEN, R.M., OLDFIELD, B.J., MENDELSON, F.A.O. e CHAI, S.Y.** The brain renin-angiotensin system: location and physiological roles. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 35:901-918, 2003.
- 90. MAEDA, M., KRIEGER, A.J. e SAPRU, H.N.** Chemical stimulation of the ventrolateral medullary depressor area decrease ipsilateral cerebral blood flow in anesthetized rats. *Brain Res.*, 543:61-68, 1991.
- 91. MAHON, J.M., ALLEN, M., HERBERT, J. e FITZSIMONS, J.T.** The association of thirst, sodium appetite and vasopressin release with c-fos expression in the forebrain of the rat after intracerebroventricular injection of angiotensin II, angiotensin (1-7) or carbachol. *Neurosci.*, 69:199-208, 1995.
- 92. MARTIN, J.R.** Pressor response to posterior hypothalamic administration of carbachol is mediated by muscarinic M3 receptor. *Eur. J. Pharmacol.*, 215:83-91, 1992.
- 93. MAUAD, H. e MACHADO, B.H.** Pressor response to unilateral carotid chemoreceptor activation is not affected by ipsilateral antagonism of excitatory amino acid receptors in the rostral ventrolateral medulla of awake rats. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical*, 91:26-31, 2001.
- 94. MENANI, J.V., BEDRAN DE CASTRO, M.T. e KRIEGER, E.M.** Influence of the anteroventral third ventricle region and sinoaortic denervation on the pressor response to carotid occlusion. *Hypertension*, 11:1-178-1-181, 1988a.
- 95. MENANI, J.V., MACHADO, B.H., KRIEGER, E.M. e SALGADO, H.C.** Tachycardia during the onset of one kidney one-clip renal hypertension: role of renin-angiotensin system and AV3V tissue. *Brain Res.*, 446:295-302, 1988b.
- 96. MENANI, J.V., SAAD, W.A., CAMARGO, L.A.A., RENZI, A., De LUCA JR, L.A. e COLOMBARI, E.** The anteroventral third ventricle (AV3V) region is essential for pressor, dipsogenic and natriuretic responses to central carbachol. *Neurosc.Lett.*, 113:339-344, 1990.
- 97. MENANI, J.V., BARBOSA, S.P., DE LUCA JR, L.A., DE GOBBI, J.I. e JOHNSON, A.K.** Serotonergic mechanisms of the lateral parabrachial nucleus and cholinergic-induced sodium appetite. *Am. J. Physiol. Regul. Int. Comp. Physiol.*, 282(3):R837-841, 2002.
- 98. MENEZES, R.C.A. e FONTES, M.A.P.** Cardiovascular effects produced by activation of GABA receptors in the rostral ventrolateral medulla of conscious rats. *Neuroscience*, 144:336-343, 2007.
- 99. MOORE, A.F. e DREXLER, A.P.** A cholinergic link in the centrally mediated actions of angiotensin II. *Drug Dev. Res.*, 2:241-250, 1982.

- 100. MORRISON, S.F., CALLAWAY, J., MILNER, T. e REIS, D.J.** Glutamate in the spinal sympathetic intermediolateral nucleus: Localization by light and electron microscopy. *Brain Res.*, 503:5-15, 1989.
- 101. MORRISON, S.F. e REIS, D.J.** Responses of sympathetic preganglionic neurons to rostral ventrolateral medullary stimulation. *Am. J. Physiol.*, 261:R1247-R1256, 1991.
- 102. MORRISON, S.F.** Glutamate transmission in the rostral ventrolateral medullary sympathetic premotor pathway. *Cellular and molecular neurobiology*, 23(4-5):761-772; 2002.
- 103. NICOLETTA, P., CHIERO, M., LOSI, E. e CAPUTI, A.P.** Interaction between renin angiotensin system and cholinergic system in brain. *Neuropharmacology*, 22(11):1269-1275, 1983.
- 104. OLIVAN, M.V., BONAGAMBA, L.G. e MACHADO, B.H.** Involvement of the paraventricular nucleus of the hypothalamus in the pressor response to chemoreflex activation in awake rats. *Brain Res.*, 895:167-172, 2001.
- 105. OTA, K., KATAFUCHI, T., TAKAKI, A. e HORI, T.** AV3V neurons that send axons to hypothalamic nuclei respond to the systemic injection of IL-1 β . *Am. J. Physiol.*, 272 (Regulatory Integrative Comp. Physiol., 41):R532-R540, 1997.
- 106. PALKOVITS, M. e ZABORSKY, L.** Neuroanatomy of central cardiovascular control. Nucleus tractus solitarii: Afferent and efferent neuronal connections in relation to the baroreceptor reflex arch. *Prog. Brain Res.*, 47:9-34, 1974.
- 107. PATRICK HARDY, S.G.** Hypothalamic projections to cardiovascular centers of the medulla. *Brain Res.*, 894:233-240, 2001.
- 108. PATRICK CARD, J., SVED, J.C., CRAIG, B., RAIZADA, M., VASQUEZ, J. e SVED, A.F.** Efferent projections of rat rostroventrolateral medulla C1 catecholamine neurons: Implications for the central control of cardiovascular regulation. *The Journal of Comparative Neurology*, 499:840-859, 2006.
- 109. PHILLIPS, M.I., HEININGER, F. e TOFFOLO, S.** The role of brain angiotensin in thirst and AVP release induced by hemorrhage. *Regul. Pept.*, 66(1-2):3-11, 1996.
- 110. PYNER, S. e COOTE, J.H.** The organization of the PVN projection to the RVLM and sympathetic preganglionic neurons in the spinal cord of the rats. *J. Physiol.*, 501:82-83, 1997.

- 111. PLUNKETT, L.M., SHIGEMATSU, K., KURIHARA, M. e SAAVEDRA, J.M.** Localization of angiotensin II receptors along with anteroventral third ventricle area of the rat brain. *Brain Res.*, 405:205-212, 1987.
- 112. PRESCOTT, C., WEEKS, A.M., STALEY, K.J. e PARTIN, K.M.** Kynurenic acid has a dual action on AMPA receptor responses. *Neuroscience letters* 402:108-112, 2006.
- 113. PUNNEN, S., WILLETTE, R.N., KRIEGER, A.J. e SAPRU, H.N.** Medullary pressor area: Site of action of intravenous physostigmine. *Brain Res.*, 383:178-184, 1986.
- 114. RATTAN, A.K. e TEJWANI, G.A.** Effect of chronic treatment with morphine, midazolam, and both together on beta-endorphin levels in the rat. *Brain Res. Bull.*, 41:335-341, 1996.
- 115. REY, P., LOPEZ-REAL, A., SANCHEZ-IGLESIAS, S., MUNÓZ, A., SOTO-OTERO, R. e LABANDEIRA-GARCIA, J.L.** Angiotensin type-1 receptor antagonists reduce 6-hydroxydopamine toxicity for dopaminergic neurons, *neurobiology of aging*, 28:555-567, 2007.
- 116. RICARDO, J.A. e KOH, E.T.** Anatomical evidence of direct projections from the nucleus of the solitary tract to the hypothalamus, amygdala, and other forebrain structures in the rat. *Brain Res.*, 153:1-26, 1978.
- 117. RICHARD, D. e BOURQUE, C.W.** Synaptic activation of the rat supraoptic neurons by osmotic stimulation of the organum vasculosum lamina terminalis. *Neuroendocrinology*, 55(5):609-611, 1992.
- 118. ROCHA, I., BRÁS-ROSÁRIO, L., AMPARO-BARROS, M. e SILVA-CARVALHO, L.** Angiotensin AT1 receptor antagonist losartan and the defence reaction in the anaesthetised rat. Effect on the carotid chemoreflex. *Exp. Physiol.*, 88(3):309-14, 2003.
- 119. ROSS, C.A., RUGGIERO, D.A. e REIS, D.J.** Projections to the spinal cord from neurons close to the ventral surface of the hindbrain in the rat. *Neurosci. Lett.*, 21(2):143-148, 1981.
- 120. ROSS, C.A., RUGGIERO, D.A., PARK, D.H., JOH, T.H., SVED, A.F., FERNANDEZ-PARDAL, J., SAAVEDRA, J.M. e REIS, D.J.** Tonic vasomotor control by the rostral ventrolateral medulla: Effect of electrical or chemical stimulation of the area containing C1 adrenaline neurons on arterial pressure, heart rate and plasma catecholamines and vasopressin. *J. Neurosci.*, 4:474-494, 1984.
- 121. ROSS, C.A., RUGGIERO, D.A. e REIS, D.J.** Projections from the nucleus tractus solitarius to the rostral ventrolateral medulla. *J. Comp. Neurol.*, 242:511-534, 1985.

- 122. SAAD, W.A., LUIZ, A.C., CAMARGO, L.A., SILVEIRA, J.E., FOGLIA, S., MENANI, J.V. e SAAD, W.A.** Functional evidence that the central renin-angiotensin system plays a role in the pressor response induced by central injection of carbachol. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 30(4):493-496, 1997.
- 123. SAPER, C.B. e LEVISOHN, D.** Afferent connections of the median preoptic nucleus in the rat: Anatomic evidence for a cardiovascular integrative mechanism in the anteroventral third ventricular (AV3V) region. *Brain Res.*, 288:21-31, 1983.
- 124. SAPER, C.B., REIS, D.J., e JOH, T.** Medullary catecholamine inputs to the anteroventral third ventricular cardiovascular regulatory region in the rat. *Neurosc. Lett.*, 42:285- 291, 1983.
- 125. SASAKI, S. e DAMPNEY, R.A.** Tonic cardiovascular effects of angiotensin II in the ventrolateral medulla. *Hypertension*, 15(3):274-283, 1990.
- 126. SCHEREIHOFFER, A.M., ITO, S. e SVED, A.F.** Brain stem control of arterial pressure in chronic arterial baroreceptor-denervated rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 289(6):R1746-R1755, 2005.
- 127. SHERIFF, M.J., FONTES, M.A.P., KILLINGER, S., HORIUCHI, J. e DAMPNEY, R.A.** Blockade of AT1 receptors in the rostral ventrolateral medulla increases sympathetic activity under hypoxic conditions. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 290(3):733-740, 2006.
- 128. SHI, P., STOCKER, S.D. e TONEY, G.M.** Organum Vasculosum laminae terminalis contributes to increased sympathetic nerve activity induced by central hyperosmolality. *Am. J. Physiol. Reg. Int. Comp. Physiol.*, 293(6):R2279-2289, 2007.
- 129. SHIBATA, O., TANAKA, J. e NOMURA, M.** Non N-NMDA glutamatergic receptors modulate acetylcholine release in the rat subfornical organ area. *Autonomic Neuroscience: Basic & Clinical*, 2006.
- 130. SILVA, N.F., PIRES, J.G., DANTAS, M.A. e FUTURO NETO, H. A.** Excitatory amino acid receptor blockade within the caudal pressor area and rostral ventrolateral medulla alters cardiovascular responses to nucleus raphe obscurus stimulation in rats. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 35(10):1237-1245, 2002.
- 131. SPYER, K.M.** Baroreceptor sensitive neurones in the anterior hypothalamus of the cat. *J. Physiol.*, 224:45-257, 1972.
- 132. STOCKER, S.D. e TONEY, G.M.** Median preoptic neurones projecting to the hypothalamic paraventricular nucleus respond to osmotic, circulating Ang II and baroreceptor input in the rat. *Journal of Physiology*, 568:599-615, 2005.

- 133. SUN, M.K.** Central neural organization and control of sympathetic nervous system in mammals. *Prog. Neurob.*, 47:157-233, 1995.
- 134. SUN, M.K. e REIS, D.J.** NMDA receptor-mediated sympathetic chemoreflex excitation of RVL-spinal vasomotor neurones in rats. *Journal of Physiology*, 482:53-68, 1995.
- 135. SVED, A.F. e GORDON, F.J.** Amino acids as central neurotransmitters in the baroreceptors reflex pathway. *Articles and Reviews - News in physiological sciences*, vol 9: pp.243-246, 1994.
- 136. TAKAKURA, A.C., MOREIRA, T.S., LAITANO, S.C., DE LUCA JR, L.A., RENZI, A. e MENANI, J.V.** Central moxonidine on salivary gland blood flow and cardiovascular responses to pilocarpine. *Brain Res.*, 987(2):155-163, 2003.
- 137. TALMAN, W.T., PERRONE, M.H. e REIS, D.J.** Evidence for L-glutamate as the neurotransmitter of baroreceptor afferent nerve fibers. *Science*, 209(4458):813-815, 1980.
- 138. TANAKA, J.** Activation of cholinergic pathways from the septum to the subfornical organ area under hypovolemic condition in rats. *Brain Res. Bull.*, 61:497-504, 2003.
- 139. TIMMERMANS, P.B., DUNCIA, J.V., CARINI, D.J., CHIU, A.T., WONG, P.C., WEXLER, R.R. e SMITH, R.D.** Discovery of losartan, the first angiotensin II receptor antagonist. *J. Hum. Hypertens.*, 5:S3-S18, 1995.
- 140. URBANSKI, R. e SAPRU, H.N.** Putative neurotransmitter involved in medullary cardiovascular regulation. *J. Auton. Nerv. Syst.*, 25:181-193, 1988.
- 141. VALLADÃO, A.S., SAAD, W.A., CAMARGO, L.A., DE LUCA JR, L.A. e MENANI, J.V.** AV3V lesion reduced the pressor, dipsogenic and natriuretic responses to ventromedial hypothalamus activation. *Brain Res. Bull.*, 28:909-914, 1992.
- 142. VARDHAN, A., KACHROO, A. e SAPRU, H.N.** Excitatory amino acid receptors in commissural nucleus of the NTS mediate carotid chemoreceptors responses. *Am. J. Physiol.* 264 (Regul. Int. Comp. Physiol., 33):R41-R50, 1993.
- 143. WATSON, A.M., MOGULKOC, R., McALLEN, RM. E MAY, C.N.** Stimulation of cardiac sympathetic nerve activity by central angiotensinergic mechanisms in conscious sheep. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 286(6):R1051-R1056, 2005.
- 144. WILLETTE, R.N., BARCAS, P.P., KRIEGER, A.J. e SAPRU, H.N.** Vasopressor and depressor areas in the rat medulla. *Neuropharmacology*, 22(9):1071-1079, 1983.

- 145. WILLETTE, R.N., PUNNEN, S., KRIEGER, A.J. e SAPRU, H.N.** Cardiovascular control by cholinergic mechanisms in the rostral ventrolateral medulla. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 231(2):457-463, 1984.
- 146. VIEIRA, A.A., DE LUCA JR, L.A., COLOMBARI, D.S.A., COLOMBARI, E. e MENANI, J.V.** Cardiovascular responses to microinjections of L-glutamate into the NTS in AV3V-lesioned rats. *Brain Res.*, 1025:106-112, 2004.
- 147. VIEIRA, A.A., DE LUCA JR, L.A., COLOMBARI, D.S.A., COLOMBARI, E. e MENANI, J.V.** AV3V lesions impair the pressor response to glutamate into the rostral ventrolateral medulla. *Brain Res.*, 1086:160-167, 2006.
- 148. VIEIRA, A.A., COLOMBARI, E., DE LUCA JR, L.A., COLOMBARI, D.S.A. e MENANI, J.V.** Central cholinergic blockade reduces the pressor response to L-glutamate into the rostral ventrolateral medullary pressor area. *Brain Res.*, 1155:100-107, 2007.
- 149. WYSS, J.M., TILOKSKULCHAI, K., KING, K., KADISH, I. e VAN GROEN, T.** Distribution of neurons in the anterior hypothalamic nucleus activated by blood pressure changes in the rat. *Brain Res. Bull.*, 49:163-172, 1999.
- 150. XU, Z., ROSS, M.G. e JOHNSON, A.K.** Intracerebroventricular carbachol induced FOS immunoreactivity in lamina terminalis neurons projecting to the supraoptic nucleus. *Brain Res.*, 895:104-110, 2000.
- 151. ZHANG, W. e MIFFLIN, S.** Excitatory amino acid receptors within NTS mediate arterial chemoreceptors reflexes in rats. *Am. J. Physiol.* 265 (Heart Circ. Physiol., 34):H770-H773, 1993.
- 152. ZHU, D.N., MORIGUCHI, A., MIKAMI, H., HIGAKI, J. e OGIHARA, T.** Central amino acids mediate cardiovascular response to angiotensin II in the rat. *Brain Res Bull.*, 45:189-197, 1998.