

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS – UFSCar  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

“Importância da região AV3V para as respostas pressoras produzidas  
pela ativação de áreas bulbares”

**Alexandre Antonio Vieira**

Dissertação 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 Mestre em Ciências Fisiológicas,  
área de concentração Fisiologia.

São Carlos

2005

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS – UFSCar  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

“Importância da região AV3V para as respostas pressoras produzidas  
pela ativação de áreas bulbares”

Alexandre Antonio Vieira

Orientador: Prof. Dr. José Vanderlei Menani

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

V658ir

Vieira, Alexandre Antonio.

Importância da região AV3V para as respostas pressoras produzidas pela ativação de áreas bulbares / Alexandre Antonio Vieira. -- São Carlos : UFSCar, 2005.

92 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2005.

1. Sistema cardiovascular. 2. Região anteroventral do terceiro ventrículo. 3. Glutamato monossódico. 4. RVL. 5. NTS. I. Título.

CDD: 612.1 (20<sup>a</sup>)

### Agradecimentos:

Ao meu orientador, Prof. Dr. José Vanderlei Menani, pela confiança em minha pessoa.

Ao Prof. Dr. Eduardo Colombari que de forma muito prestativa me auxiliou em vários momentos no laboratório.

À todos os estagiários do laboratório de Fisiologia, pela amizade e convivência sempre alegre. Em especial agradeço à Juliana F. De Gobbi pela grande ajuda recebida para a realização dessa dissertação.

À todos os professores do programa de Pós Graduação em Ciências Fisiológicas pela dedicação às disciplinas ministradas, em especial aos professores do departamento, Laurival, Débora, Renzi, Luiz, Saad e José Eduardo.

À todos os funcionários do laboratório de Fisiologia, Silas, Reginaldo, Sílvia, Silvana e Ana, pois cada um deles sempre me auxiliaram de sua maneira, e assim contribuíram para a realização dessa dissertação.

Aos órgãos de fomento FAPESP, PRONEX e CNPq, especialmente à FAPESP pela concessão da bolsa.

Agradeço a Deus pela linda família que possuo, que na figura de minha mãe Luzia Bernardo, me ensinou todos os passos para ser uma pessoa de bem. Agradeço pelo meu pai Pedro Antonio Vieira que me incentivou a seguir essa carreira maravilhosa. Gostaria também de agradecer e oferecer essa dissertação à minha querida irmã Nerita e ao Valdecir, que me presentearam com as jóias mais lindas do mundo, meus sobrinhos Lineker e Samira.

Através dessas linhas expresso toda a minha gratidão por ter ao meu lado, a minha linda e amada esposa Elaine, que em todos os momentos da vida, me inunda a alma de felicidade e AMOR.

“Elaborando o Futuro com positividade,  
tendo pensamentos prósperos e  
trabalhando, com certeza todos os  
benesses da vida estarão sempre ao  
nosso lado.”

**ÍNDICE**

RESUMO.....	8
ABSTRACT .....	12
INTRODUÇÃO .....	16
OBJETIVOS .....	24
MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
1- Animais.....	25
2- Cirurgia cerebral .....	25
Lesão eletrolítica da região AV3V .....	25
Implante de cânulas cerebrais .....	26
3- Injeção das drogas no cérebro .....	26
4- Drogas utilizadas .....	26
5- Medida da pressão arterial e frequência cardíaca.....	27
6- Histologia cerebral.....	27
7-Análise dos resultados.....	28
PROTOSCOLOS EXPERIMENTAIS EXECUTADOS .....	29
RESULTADOS .....	31
1 - Análise histológica.....	31
2- Efeitos da lesão da região AV3V nas respostas cardiovasculares produzidas pela injeção de glutamato no NTS.....	35
3- Efeitos da lesão da região AV3V nas respostas pressoras e taquicárdicas produzidas pela injeção de substância P no NTS.....	39
4- Efeitos da lesão da região AV3V nas respostas cardiovasculares produzidas pela injeção de glutamato na área RVL.....	46

5- Respostas pressoras e bradicárdicas induzidas pela ativação do quimiorreflexo com injeção i.v. de KCN nos ratos com lesão da região AV3V pertencentes aos diferentes grupos estudados. ....	57
6- Respostas pressoras e bradicárdicas induzidas pela injeção i.v. de fenilefrina nos ratos com lesão da região AV3V pertencentes aos diferentes grupos estudados. ....	60
7- Respostas hipotensoras e taquicárdicas induzidas pela injeção i.v. de nitroprussiato de sódio nos ratos com lesão da região AV3V pertencentes aos diferentes grupos estudados.....	62
DISCUSSÃO .....	64
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	79

## ÍNDICE DE ABREVIATURA E SÍMBOLOS

<b>ANG II</b> -	angiotensina II
<b>ADH</b> -	vasopressina
<b>AP</b> -	área postrema
<b>AV3V</b> -	anteroventral do terceiro ventrículo
<b>bpm</b> -	batimentos por minuto
<b>CA</b> -	comissura anterior
<b>CVL</b> -	caudo ventrolateral do bulbo
<b>EPM</b> -	erro padrão da média
<b>FPM</b> -	fascículo prosencefálico medial
<b>FC</b> -	freqüência cardíaca
<b>Glu</b> -	glutamato
<b>ICV</b> -	intracerebroventricular
<b>IML</b> -	coluna intermédio lateral
<b>i.v.</b> -	intravenosa
<b>KCN-</b>	cianeto de potássio
<b>mmHg-</b>	milímetros de mercúrio
<b>NA</b> -	núcleo ambiguo
<b>NPBL</b> -	núcleo parabraquial lateral
<b>NPV</b> -	núcleo paraventricular
<b>NSO</b> -	núcleo supraóptico
<b>NTS</b> -	núcleo do trato solitário
<b>NTSi</b> -	núcleo do trato solitário intermediário
<b>PAM</b> -	pressão arterial média
<b>PAP</b> -	pressão arterial pulsátil
<b>RVL-</b>	rostro ventrolateral do bulbo
<b>SP</b> -	substância P
<b>SNC</b> -	sistema nervoso central
<b>OVLT</b> -	órgão vasculoso da lâmina terminal
<b>nl</b> -	nanolitro(s)
<b>nmol</b> -	nanomolar

## RESUMO

Respostas cardiovasculares podem ser integradas em diferentes níveis do sistema nervoso central (SNC). Em particular, o hipotálamo e o bulbo estão muito envolvidos com o controle de respostas autonômicas, entre as quais estão as repostas cardiovasculares. No bulbo estão vários núcleos importantes para o controle cardiovascular como o núcleo do trato solitário (NTS), as áreas rostroventrolateral (RVL) e caudoventrolateral (CVL) e o núcleo ambíguo. Um circuito envolvendo essas áreas bulbares é responsável pelo controle básico do sistema cardiovascular, podendo receber informações dos receptores localizados em diferentes partes do organismo, em especial dos pressorreceptores e quimiorreceptores e, integrando essas informações de diversas origens, comandar as eferências autonômicas. Injeção do aminoácido excitatório glutamato no NTS de ratos anestesiados produz resposta hipotensora e bradicárdica semelhante à ativação do barorreflexo. Diferentemente, em animais não anestesiados, a injeção de glutamato no NTS provoca resposta pressora e bradicárdica, semelhante á ativação do quimiorreflexo. A substância P é um neuropeptídeo que também quando injetada no NTS produz efeito pressor, podendo atuar como neurotransmissor ou neuromodulador dos diferentes reflexos cardiovasculares. A área RVL é o principal sítio de saída simpática para a coluna intermédio lateral (IML). Injeção de glutamato na área RVL produz disparos dos neurônios simpáticos para a IML produzindo resposta pressora. É bem relatado, que áreas hipotalâmicas exercem forte modulação sobre respostas cardiovasculares. Uma dessas áreas é o núcleo paraventricular do hipotálamo (NPV), cuja lesão

eletrolítica reduz a resposta pressora à ativação do quimiorreflexo com cianeto de potássio i.v. Uma outra área hipotalâmica muito importante para o controle cardiovascular é a região anteroventral do terceiro ventrículo (AV3V), cuja lesão reduz as respostas cardiovasculares produzidas pela ativação colinérgica e angiotensinérgica central e impede o desenvolvimento de diversas formas de hipertensão em animais. No presente estudo o objetivo foi estudar em ratos não anestesiados, os efeitos da lesão aguda (1 dia) e crônica (15 dias) da região AV3V sobre as respostas pressoras produzidas pela ativação do NTS com injeção do aminoácido excitatório glutamato e da taquicinina substância P ou pela injeção de glutamato na área RVL, além de se testar as respostas à ativação tanto do barorreflexo quanto do quimiorreflexo. Para isso foram utilizados ratos com lesão eletrolítica ou lesão fictícia da região AV3V aguda ou crônica e com cânulas de aço inoxidável implantadas no NTS ou 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 periféricas para os teste de baro e quimiorreflexo. As injeções centrais no volume de 100 nl foram feitas com auxílio de uma seringa Hamilton de 5  $\mu$ l. Enquanto que nos ratos com lesão fictícia (1 e 15 dias), a injeção de glutamato (5 nmol) no NTS produziu respostas pressoras ( $28 \pm 3$  mmHg), a mesma injeção nos ratos com lesão da região AV3V produziu hipotensão ( $-26 \pm 8$  mmHg) no 1º dia após a lesão ou não modificou a PAM ( $2 \pm 8$  mmHg) 15 dias após a lesão da região AV3V. A resposta bradicárdica produzida pela injeção de glutamato no NTS

de ratos com lesão eletrolítica aguda ( $-65 \pm 23$  bpm) e crônica ( $-90 \pm 29$  bpm) não foram diferentes das respostas bradicárdicas produzidas pela injeção de glutamato no NTS nos respectivos controles com lesão fictícia ( $-76 \pm 13$  e  $-90 \pm 15$  bpm). Diferentemente do ocorrido com injeções de glutamato, as respostas pressoras produzidas pelas injeções de substância P (0,5 e 1 nmol) no NTS de ratos com lesão da região AV3V aguda ( $16 \pm 2$  e  $20 \pm 2$  mmHg, respectivamente) ou crônica ( $18 \pm 1$  e  $20 \pm 1$  mmHg) não foram diferentes das respostas pressoras produzidas pela injeção das mesmas doses de substância P no NTS de ratos com lesão fictícia aguda ( $20 \pm 5$  e  $22 \pm 3$  mmHg) ou crônica ( $19 \pm 3$  e  $25 \pm 3$  mmHg). As respostas taquicárdicas produzidas pela injeção de substância P no NTS de ratos com lesão da região AV3V aguda ( $54 \pm 15$  e  $71 \pm 15$  bpm) e crônica ( $70 \pm 11$  e  $66 \pm 11$  bpm) não foram diferentes das respostas taquicárdicas produzidas pela injeção de substância P no NTS de ratos com lesão fictícia aguda ( $75 \pm 14$  e  $72 \pm 12$  bpm) ou crônica ( $53 \pm 16$  e  $84 \pm 7$  bpm). Por outro lado, as respostas pressoras produzidas pelas injeções de glutamato (1, 5 e 10 nmol) na área RVL de ratos com lesão da região AV3V aguda ( $9 \pm 4$ ,  $39 \pm 6$  e  $37 \pm 4$  mmHg, respectivamente) ou crônica ( $13 \pm 6$ ,  $39 \pm 4$  e  $43 \pm 4$  mmHg, respectivamente) foram significativamente reduzidas em relação às respostas pressoras produzidas pelas injeções das mesmas doses de glutamato na área RVL de ratos com lesão fictícia aguda ( $33 \pm 5$ ,  $54 \pm 3$  e  $56 \pm 8$  mmHg, respectivamente) ou crônica ( $29 \pm 3$ ,  $50 \pm 2$  e  $58 \pm 3$  mmHg, respectivamente). Não se observaram diferenças nas respostas bradicárdicas produzidas pelas injeções de glutamato nos ratos com lesão da região AV3V (aguda ou crônica) em relação aos ratos com lesão fictícia. As

respostas barorreflexas produzidas pelas injeções i.v. de fenilefrina (5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de peso corporal) ou nitroprussiato de sódio (30  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), assim como nas respostas produzidas pela ativação do quimiorreflexo com injeções i.v. de cianeto de potássio (20 e 40  $\mu\text{g}/\text{rato}$ ) também não foram modificadas pela lesão da região AV3V tanto aguda como crônica. Esses resultados mostram a grande importância que a região AV3V têm para as respostas cardiovasculares dependentes da ativação do sistema nervoso simpático e, nesse caso em especial, respostas pressoras à ativação glutamatérgica de áreas bulbares. Pelos resultados obtidos, pode-se sugerir, que a região AV3V participa de uma forma decisiva nas respostas pressoras resultantes da injeção de glutamato no NTS e na área RVL, mas não na resposta pressora à injeção de substância P no NTS. Isso demonstra que o efeito da lesão da região AV3V não depende de um comprometimento inespecífico de mecanismos pressores. Um outro resultado importante desse estudo, é que a lesão da região AV3V não modifica as respostas baro e quimiorreflexa, podendo sugerir, que a resposta simpato-excitatória do quimiorreflexo não depende única e exclusivamente da neurotransmissão glutamatérgica em área bulbares.

## ABSTRACT

Cardiovascular responses are integrated at different levels of the central nervous system (CNS). Particularly the hypothalamus and brainstem areas are involved in the control of autonomic responses and among them the cardiovascular responses. Different areas in the brainstem, like the nucleus tract solitarii (NTS), the rostroventrolateral medulla (RVLM), caudoventrolateral medulla (CVLM) and the nucleus ambiguus are important to cardiovascular control. These areas of the brainstem that control the cardiovascular system receive information from receptors present in different parts of the body, specially the pressoreceptors and chemoreceptors and control the activity of the autonomic efferents. Injection of the excitatory amino acid glutamate into the NTS in anesthetized rats produces depressor response and bradycardia like baroreflex activation. Differently, in unanesthetized rats, injection of the glutamate into the NTS produces pressor response and bradycardia, similar to chemoreflex activation. The neuropeptide substance P may act as neurotransmitter or neuromodulator of different cardiovascular reflexes and when injected into the NTS produces pressor response. The RVLM is the main site of sympathetic output to the intermediolateral cell column of the spinal cord. Injection of glutamate into the RVLM increases sympathetic activity and induces pressor response. Hypothalamic areas are also involved in the control of cardiovascular responses. For example, electrolytic lesions in the paraventricular nucleus of the hypothalamus (PVN), reduce the pressor response to chemoreflex activation with potassium cyanide (KCN) iv. Another hypothalamic area important for cardiovascular control is the anteroventral third ventricle (AV3V) region. Electrolytic lesion of the AV3V region reduces the

cardiovascular responses produced by central colinergic and angiotensinergic activation and abolish many forms of the experimental hypertension in animals. In the present study, in unanesthetized rats, we investigated the effects of acute (1 day) and chronic (15 days) AV3V lesions in the pressor responses produced by NTS activation with injection of the excitatory amino acid glutamate and substance P or injection of glutamate into the RVLM. The responses to activation of the baroreflex and chemoreflex were also tested. Rats with sham or electrolytic lesions of the AV3V region and stainless steel cannulas implanted into the NTS or RVLM were used. Mean arterial pressure (MAP) and heart rate (HR) were recorded in unanesthetized rats. A polyethylene tubing was inserted into the abdominal aorta through the femoral artery on day before the experiments. A second polyethylene tubing was inserted in the femoral vein for the baroreflex and chemoreflex tests. The central injections were made using 5  $\mu$ l Hamilton syringes. The volume of the central injections into the NTS and RVLM was 100 nl. In sham rats, the injection of glutamate (5 nmol) into the NTS produce pressor response ( $28 \pm 3$  mmHg). The same dose of glutamate in acute AV3V-lesioned rats produce hypotension ( $-26 \pm 8$  mmHg) in the first day after lesion or did not modify the MAP ( $2 \pm 8$  mmHg) fifteen days after AV3V lesion. The bradycardic responses produced by injection of the glutamate into the NTS in acute ( $-65 \pm 23$  bpm) or chronic ( $-90 \pm 29$  bpm) AV3V-lesioned rats were not different from the bradycardic responses produced by glutamate into the NTS in sham-lesioned rats ( $-76 \pm 13$  e  $-90 \pm 15$  bpm). Differently, the pressor response produced by injection of substance P (0,5 e 1 nmol) into the NTS in acute ( $16 \pm 2$  and  $20 \pm 2$  mmHg, respectively) or chronic

AV3V-lesioned rats ( $18 \pm 1$  and  $20 \pm 1$  mmHg) were not different from the pressor responses produced by the same doses of substance P into the NTS in acute ( $20 \pm 5$  and  $22 \pm 3$  mmHg) or chronic sham rats ( $19 \pm 3$  and  $25 \pm 3$  mmHg). The tachycardic responses produced by injection of substance P into the NTS in acute ( $54 \pm 15$  and  $71 \pm 15$  bpm) and chronic AV3V-lesioned rats ( $70 \pm 11$  and  $66 \pm 11$  bpm) were also not different from the tachycardic responses produced by substance P into the NTS in acute ( $75 \pm 14$  and  $72 \pm 12$  bpm) or chronic sham rats ( $53 \pm 16$  e  $84 \pm 7$  bpm). The pressor responses produced by injections of glutamate (1, 5 and 10 nmol) into the RVLM in acute ( $9 \pm 4$ ,  $39 \pm 6$  e  $37 \pm 4$  mmHg, respectively) or chronic AV3V-lesioned rats ( $13 \pm 6$ ,  $39 \pm 4$  and  $43 \pm 4$  mmHg, respectively) were significantly reduced compared to the pressor responses of the same doses of glutamate into the RVLM in acute ( $33 \pm 5$ ,  $54 \pm 3$  and  $56 \pm 8$  mmHg, respectively) or chronic sham rats ( $29 \pm 3$ ,  $50 \pm 2$  and  $58 \pm 3$  mmHg, respectively). Glutamate into the RVLM in acute or chronic sham or AV3V lesioned rats produced no significant change in the heart rate. The baroreflex responses produced by iv phenylephrine (5  $\mu$ g/kg of body weight), sodium nitroprussiate (30  $\mu$ g/kg of body weight), or the responses produced by chemoreflex activation with iv injection of potassium cyanide (20 and 40  $\mu$ g/rato) were not modified by acute or chronic AV3V lesion. The results show the importance of the AV3V region for the cardiovascular responses dependent on the activation of the sympathetic nervous system and specially the pressor responses to glutamatergic activation in the NTS and RVLM. The integrity of the AV3V region is important for the pressor responses to injection of glutamate into the NTS and into the RVLM, but not for the pressor response to

injection of substance P into the NTS, which suggests that the AV3V lesion does not non specifically affect any pressor mechanism. The AV3V lesions do not modify the baro and chemoreflex responses, suggesting that the sympato-excitatory responses to chemoreflex activation do not depend unique and exclusively on glutamatergic neurotransmission in the NTS and RVLM.

## INTRODUÇÃO

O bom funcionamento do sistema cardiovascular e, em particular, a manutenção de uma pressão arterial em níveis normais é importante para a homeostasia garantindo a nutrição e os suprimentos necessários à sobrevivência das células de um organismo. Embora o sistema cardiovascular possa desenvolver seu papel, mesmo na ausência do sistema nervoso central (SNC), é este que detém os mecanismos refinados de ajustes capazes de regular e manter em níveis adequados a pressão arterial, a frequência cardíaca e o débito cardíaco. Esses mecanismos finos de ajustes podem ser a curto prazo (mecanismo reflexo), bem como a longo prazo (mecanismo humoral). Esses dois mecanismos, apesar de distintos, trabalham em conjunto e são importantes para a regulação cardiovascular. O controle a curto prazo que atua momento a momento sobre a pressão arterial é realizado pelo sistema nervoso autônomo sobre comando do SNC e envolve a ativação de diferentes grupos de sensores periféricos. Aferências periféricas que partem dos pressorreceptores, quimiorreceptores arteriais ou dos receptores cardiopulmonares, enviam continuamente informações para o SNC através de aferências vagais e glossofaríngeas sobre como se encontra a pressão, a concentração de gases e o pH do sangue. O SNC ajusta a atividade dos eferentes autonômicos simpático e parassimpático às necessidades do organismo em cada situação.

Os pressorreceptores estão localizados na parede do arco aórtico e do seio carotídeo. Esses receptores são sensíveis á distensão dessas paredes (aórtica e carotídea) e são importantes para a regulação reflexa da frequência cardíaca, débito cardíaco, contratilidade miocárdica, vasomotricidade e distribuição do fluxo

sanguíneo, evitando grande variação da pressão arterial e ajustando-a em diferentes situações comportamentais e emocionais do cotidiano. Além dos barorreceptores, existem também células quimiossensíveis, localizadas no arco aórtico, corpúsculos carotídeos na bifurcação das carótidas e no SNC. Esses quimiorreceptores são responsáveis pela detecção da pressão parcial dos gases circulantes ( $O_2$ ,  $CO_2$ ) e do pH do sangue. A ativação dos quimiorreceptores periféricos com injeção intravenosa (i.v) de cianeto de potássio (KCN) em ratos não anestesiados produz ajustes cardiovasculares e ventilatórios resultando em resposta vasoconstritora (simpato-excitação) e bradicárdica (parassimpato-excitação), juntamente com compensações respiratórias (Franchini e Krieger, 1992; Haibara e cols, 1995).

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). O NTS é formado por um conjunto de neurônios heterogêneos, localizados na porção dorso-medial do bulbo, estendendo-se de forma rostrocaudal desde a extremidade caudal do núcleo motor do nervo facial até a parte caudal da decussação das pirâmides (Ciriello e cols, 1994). A parte rostral é formada por colunas bilaterais que se unem na altura do óbex para formar uma única estrutura na linha média (Cottle, 1964). O aminoácido excitatório glutamato é considerado o principal neurotransmissor liberado pelas aferências dos pressos (Talman e cols, 1980; Talman, 1989; Gordon e Talman, 1992; Colombari e cols, 1994; Machado e Bonagamba, 1992) e

quimiorreceptores (Haibara e cols, 1995; Vardhan e cols, 1993; Zhang e Mifflin, 1993) periféricos no NTS, bem como nas áreas bulbares ventrais envolvidas na regulação cardiovascular (Sved e Gordon, 1994). Apesar disso, os mecanismos envolvidos nas respostas do glutamato injetado no NTS ainda não são bem entendidos. Injeção de glutamato no NTS de ratos anestesiados produz hipotensão e bradicardia, ou seja, uma resposta parecida com a ativação barorreflexa (Talman, 1989; Talman e cols, 1980). Por outro lado, em ratos não anestesiados, a injeção de glutamato no NTS produz resposta pressora e bradicárdica, semelhante à ativação do quimiorreflexo (Colombari e cols, 1994; Colombari e cols, 1996; Haibara e cols, 1995; Machado, 2001; Machado e Bonagamba, 1992; Oliven e cols, 2001). A partir do NTS, as informações provenientes dos receptores periféricos podem ser distribuídas para diversas áreas do cérebro, dentre as quais destacam-se as áreas localizadas na região ventral do bulbo que controlam as despolarizações do simpático e parassimpático sobre o sistema cardiovascular.

Uma dessas regiões é denominada de área rostroventrolateral (RVL) do bulbo. A área RVL, que está localizada ventralmente ao núcleo ambiguo (NA), tem grande importância na regulação da pressão arterial (Ross e cols, 1984) e é conhecida por conter os elementos para a geração e manutenção do tônus vasomotor simpático (Guertzenstein e Silver, 1974; Guyenet e cols, 1990; Morrison e Reis, 1991; Chalmers e Pilowsky, 1991). Estudo eletrofisiológico (Morrison e cols, 1988), bem como estudos anatômicos (Blessing e cols, 1981; Ross e cols, 1981) demonstraram que os axônios eferentes da área RVL projetam-se monossinápticamente para a coluna intermédia lateral (IML) ativando

os neurônios pré-ganglionares simpáticos (Brown e Guyenet, 1984). Estímulos elétricos da área RVL produz aumento na pressão arterial e nas concentrações plasmáticas de vasopressina (ADH) e catecolaminas, (Ross e cols, 1984) enquanto inibições bilaterais dos neurônios da área RVL através de administração tópica de tetrodoxina (bloqueador de canais de sódio) causam queda da pressão arterial, confirmando o papel importante que a área RVL exerce sobre a pressão arterial.

A outra área conhecida como área caudoventrolateral (CVL) do bulbo tem ação inibitória sobre a área RVL e, portanto, sua atividade reduz o tônus simpático e pressão arterial (Guyenet, 1990). Entre as áreas bulbares envolvidas no controle cardiovascular destaca-se ainda o NA, que controla as atividades parassimpáticas no coração. Dependendo do tipo de receptor envolvido, as informações que chegam ao NTS podem influenciar a atividade da área CVL e do NA (como no caso da ativação dos pressorreceptores) ou influenciar a atividade da área RVL e do NA (quando os quimiorreceptores são ativados).

Além das conexões com áreas bulbares, já foi demonstrado anatomicamente conexões do NTS com áreas prosencefálicas, como núcleos hipotalâmicos (Ricardo e Koh, 1978). Assim, informações do NTS podem se projetar para áreas anteriores do cérebro como o núcleo paraventricular do hipotálamo (NPV) e supraóptico (NSO) e também área septal e banda diagonal (Jhamandas e Renaud, 1986). As despolarizações dos pressorreceptores também podem influenciar diretamente a atividade de neurônios localizados na região anteroventral do terceiro ventrículo (AV3V), (Knuepfer e cols, 1985) ou outras áreas hipotalâmicas (Spyer, 1972; Calaresu e Ciriello, 1980). Aferências

catecolaminérgicas do NTS e da área RVL para a região AV3V também já foram identificadas (Saper e cols, 1983). Alterações na atividade de áreas prosencefálicas podem resultar na alteração da secreção de hormônios, como o ADH que apresenta importante efeito vasoconstritor. Por outro lado, as áreas prosencefálicas estão muito envolvidas com o controle de respostas comportamentais podendo, portanto, modular a atividade de áreas do tronco cerebral, muitas vezes ajustando o funcionamento do sistema cardiovascular às necessidades de determinadas respostas comportamentais, podendo ser muito importante para a sobrevivência, por exemplo em situações de luta ou fuga.

A região AV3V, constituída pelo tecido periventricular da porção anterior do terceiro ventrículo ventral, é uma região muito rica em receptores de angiotensina II (ANG II) e que tem destacada importância no controle cardiovascular e do equilíbrio hidroeletrolítico. A lesão eletrolítica da região AV3V, que se estende desde a parede anterior do terceiro ventrículo onde está localizado o órgão vasculoso da lâmina terminal incluindo ainda o tecido periventricular e as porções periventriculares da área preóptica e da porção anterior da área hipotalâmica anterior, 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 e 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 e 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).

A resposta pressora produzida durante a oclusão bilateral das carótidas comuns é devida à ativação de componentes dos pressorreceptores e dos quimiorreceptores. A lesão da região AV3V prejudica tanto o aumento rápido inicial da pressão arterial, que depende principalmente da atividade dos pressorreceptores, como também a resposta mantida de aumento da pressão arterial que é devido principalmente à isquemia cerebral (Menani e cols, 1988a; Bedran de Castro e cols, 1993). Além da região AV3V, já foi demonstrado também que a lesão eletrolítica do fascículo prosencefálico medial (FPM) ou a desconexão entre o hipotálamo anterior e o hipotálamo médio com uma pequena faca produz uma redução do segundo componente da resposta pressora à oclusão da carótida (Lopes e cols, 1977; Lopes e cols, 1981; Bedran de Castro e cols, 1986; Bedran de Castro e cols, 1993). Um importante estudo recentemente também demonstrou que a resposta pressora produzida pela ativação do quimiorreflexo com KCN i.v. foi abolida pela lesão do NPV (Olivan e cols, 2001). Certamente, esses estudos sugerem que regiões prosencefálicas podem ser importantes para o aparecimento de respostas dependentes da ativação dos pressorreceptores arteriais e/ou dos quimiorreceptores.

Nos últimos anos muitos estudos foram feitos com objetivo de se identificar possíveis neurotransmissores do NTS que estariam envolvidos com o controle de respostas cardiovasculares e diferentes neurotransmissores e/ou neuromoduladores já foram identificados (Nijkamp e De Jong, 1975; Perrone, 1981; Talman e cols, 1980). Dentre eles estão as monoaminas (dopamina,

noradrenalina, adrenalina e serotonina), a acetilcolina, aminoácidos como glutamato, GABA, aspartato e ácido L-homocisteico, também neuropeptídeos como a substância P e a vasopressina (Palkovits e Jacobowitz, 1974; Swanson e Hartman, 1975; Gillis e cols, 1980; Perrone, 1981; Armstrong e cols, 1981). Estudos neuroquímicos, fisiológicos, farmacológicos e observações neuroanatômicas evidenciaram que o aminoácido glutamato poderia ser o neurotransmissor envolvido na neurotransmissão do barorreflexo no NTS. A injeção de glutamato no NTS particularmente na porção intermediária (NTSi) de ratos anestesiados sempre produz hipotensão e bradicardia que são as respostas observadas quando os pressorreceptores são estimulados (Talman e cols, 1980; Machado e Bonagamba, 1992; Ohta e Talman, 1994). Porém, em animais não anestesiados, a injeção de glutamato no NTSi, geralmente produz resposta pressora acompanhada de bradicardia (Machado e Bonagamba, 1992; Colombari e cols, 1994).

Estudo de (Granata e Woodruff, 1980), mostrou que um outro neurotransmissor que age no NTSi causando resposta pressora é a substância P (SP). A SP é um undecapeptídeo pertencente à classe das taquicinas e estudos radiográficos já mostraram a presença de receptores para a SP no NTSi de ratos (Helke e cols, 1984). Evidências indicam que a SP pode atuar como neurotransmissor e/ou neuromodulador das aferências de presso e quimiorreceptores no NTS (Miura e cols, 1987; Lindefors e cols, 1986; Srinivasan e cols, 1991; Morilak e cols, 1988; Chan e cols, 1995; Seagard e cols, 2000) além da co-participação de ambos, SP e glutamato, no controle cardiovascular (Rusin e cols, 1993; Long e cols, 1996; Heppenstall e Fleetmood-Walker, 1997; Liu e cols,

1998). Resultados recentes demonstraram que injeção de substância P uni ou bilateralmente no NTSi de ratos não anestesiados produz significativas respostas pressoras e taquicárdicas possivelmente devidas à potencialização que esse peptídeo poderia ter em vias relacionadas com o quimiorreflexo (Abdala e cols, 1999). Além disso, estudos sugerem a participação da substância P como neuromodulador dos reflexos cardiovasculares e respiratórios no NTS (Gatti e cols, 1995; Lawrence e Jarrot, 1996).

Sabe-se também que a resposta pressora produzida pela injeção de glutamato no NTS depende da ativação simpática (Machado e Bonagamba, 1992) e assim envolve a ativação de outras áreas bulbares para ser desencadeada. Uma das principais áreas ativadas pelo NTS e que é responsável pela atividade de neurônios simpáticos é a área RVL. A ativação de quimiorreceptores periféricos provoca 2 respostas distintas, uma simpato-excitatória e outra parassimpato-excitatória. A resposta simpato-excitatória do quimiorreflexo envolve projeções do NTS para a área RVL (Guyenet e Koshiya, 1992; Ross e cols, 1985; Urbanski e Sapru, 1988). Nesse caso uma outra área importante para respostas dependentes do sistema nervoso simpático e que poderia ter o funcionamento afetado pela lesão da região AV3V seria a área RVL. Injeções em doses adequadas de glutamato na área RVL produz significativas respostas pressoras (Martins-Pinge e cols, 1999; Sun, 1995; Willette e cols, 1983; De Paula e Machado, 2001).

## **OBJETIVOS**

Investigar por meio de lesão eletrolítica e em ratos não-anestesiados o possível envolvimento da região AV3V nas alterações da pressão arterial e frequência cardíaca produzidas pelas injeções de glutamato e SP no NTS e de glutamato na área RVL. Em adição, os efeitos da lesão da região AV3V sobre as respostas cardiovasculares produzidas pela ativação do barorreflexo com injeções i.v. de fenilefrina e nitroprussiato de sódio e do quimiorreflexo com KCN i.v. também foram estudadas em ratos não anestesiados.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### 1- Animais

Foram utilizados ratos Holtzman com pesos em torno de 280-300 g, mantidos em gaiolas individuais com ração Guabi e água. Os ratos, fornecidos pelo Biotério do Campus de Araraquara da UNESP, foram mantidos em ambiente com temperatura controlada ( $23 \pm 2$  °C) e com iluminação das 7:30 às 20:00 h.

### 2- Cirurgia cerebral

#### Lesão eletrolítica da região AV3V

Os ratos foram anestesiados com ketamina (80 mg/kg de peso corporal) associada a 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. Após a localização do bregma, foi determinado o ponto de introdução do eletrodo na cabeça dos ratos. Nesse ponto foi feita uma 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 aço inoxidável (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 realizada 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.

### Implante de cânulas cerebrais

Imediatamente após a lesão da região AV3V ou lesão fictícia, utilizando-se o segundo braço do estereotáxico foi feito os implantes das cânulas unilateralmente no NTS ou na área RVL, conforme o protocolo a ser estudado. Utilizando-se o bregma foi determinado o ponto de introdução da cânula de aço inoxidável nas cabeças dos ratos. Nesse ponto, houve uma trepanação do osso do crânio com uma broca esférica. Para o NTS, as cânulas foram posicionadas 14,3 mm caudal ao bregma, 0,5 mm lateral e 7,8 mm abaixo do osso. 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.

### **3- Injeção das drogas no cérebro**

As drogas dissolvidas em solução salina fisiológica foram injetadas no cérebro dos ratos utilizando-se uma seringa Hamilton (5  $\mu$ l), conectada por um tubo de polietileno PE-10 a uma agulha injetora que foi introduzida no cérebro pela cânula guia previamente fixada no crânio. Para o NTS e para a área RVL, as cânulas injetoras foram 2,0 e 1,5 mm respectivamente, mais longas do que as cânulas guias.

### **4- Drogas utilizadas**

Glutamato sódico (1, 5 e 10 nmol/100 nl) ou salina foram injetados na área RVL. Substância P (0,5 e 1 nmol/100 nl), glutamato sódico (5 nmol/100 nl) ou

salina foram injetados no NTS. Cloridrato de fenilefrina (5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de peso corporal), nitroprussiato de sódio (30  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de peso corporal) e cianeto de potássio (KCN, 20 e 40  $\mu\text{g}/0,1$  ml/rato) foram injetados i.v. para se testar os reflexos cardiovasculares.

As drogas foram adquiridas da Sigma Chemical Co, USA.

### **5- Medida da pressão arterial e frequência cardíaca**

A pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) foram registradas em ratos não anestesiados submetidos à canulação prévia (um dia antes do registro) da artéria femoral com um tubo de polietileno PE 10, o qual foi conectado com um tubo de polietileno PE 50 que, conduzido subcutaneamente, foi exteriorizada pelo dorso do animal. O tubo PE 50 foi conectado com 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 exteriorizada pelo dorso do animal para injeção das drogas periféricas para os testes reflexos.

### **6- Histologia cerebral**

Terminados os experimentos, os ratos foram profundamente anestesiados. A seguir, os mesmos 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  $\mu\text{m}$  de

espessura) foram feitos nos pontos de injeção ou lesão com auxílio de um micrótomo de congelamento (Leica). Os cortes histológicos foram montados em lâmina, corados pelo método de Giemsa e analisados para se localizar os pontos das injeções na área RVL ou no NTS e a lesão na região AV3V.

### **7-Análise dos resultados**

Os resultados foram tabelados utilizando-se o programa de computador Excel. A média e o erro padrão da média foram representados em gráficos. Foi utilizado análise de variância e o teste de Newman Keuls para as comparações entre diferentes tratamentos. Diferenças foram consideradas significantes para  $p < 0,05$ .

## **PROCOLOS EXPERIMENTAIS EXECUTADOS**

### **1 - Efeitos da lesão da região AV3V nas respostas cardiovasculares produzidas pela injeção de glutamato no NTS.**

Os registros de PAM e da FC foram realizados 1 dia (grupo agudo) e 15 dias (grupo crônico) após a lesão da região AV3V ou fictícia e 1 dia após a canulação da artéria e veia femoral.

Após um período controle de registro da PAM e FC de 15 a 20 minutos foram iniciadas as injeções no NTS. A primeira injeção foi de salina (controle). Em seguida foi injetado glutamato (5 nmol/100 nl). Foi aguardado sempre um período de no mínimo 15 minutos entre duas injeções no NTS.

### **2- Efeitos da lesão da região AV3V nas respostas cardiovasculares produzidas pela injeção de substância P no NTS.**

Os registros de PAM e da FC foram realizados 1 dia (grupo agudo) e 15 dias (grupo crônico) da lesão da região AV3V ou fictícia e 1 dia após a canulação da artéria e veia femoral.

Inicialmente, foram feitas as injeções periféricas, para os testes de baro e quimiorreflexo. Após 15 minutos foi feita a primeira injeção central (salina). Após 5 minutos, foi injetado a substância P na dose de (0,5 nmol/100 nl). Esperou-se 1 hora e nova injeção de substância P foi administrada, agora da dose de (1 nmol/100 nl).

### **3- Efeitos da lesão da região AV3V nas respostas cardiovasculares produzidas pela injeção de glutamato na área RVL.**

Os registros de PAM e da FC foram realizados 1 dia (grupo agudo) e 15 dias (grupo crônico) após a lesão da região AV3V ou fictícia e 1 dia após a canulação da artéria e veia femoral.

Após um período controle de registro da PAM e FC de 15 a 20 minutos foram iniciadas as injeções na área RVL. A primeira injeção foi de salina (controle). Em seguida foi injetado o glutamato em doses crescentes (1, 5 e 10 nmol/100 nl) no mesmo animal. Foi aguardado sempre um período de no mínimo 15 minutos entre duas injeções na área RVL.

### **4- Teste do baro e quimiorreflexo em ratos com lesão eletrolítica ou fictícia da região AV3V.**

Em todos os ratos que foram registrados a pressão arterial e a frequência cardíaca, além dos efeitos do glutamato e da substância P no NTS e glutamato na área RVL foram estudados o baro e quimiorreflexo.

No mínimo 20 minutos após as injeções centrais de glutamato ou antes das injeções de substância P, os ratos receberam injeções i.v. de KCN (20 e 40  $\mu$ g/0,1 ml/rato), fenilefrina (5  $\mu$ g/kg de peso corporal) e nitroprussiato de sódio (30  $\mu$ g/kg de peso corporal). Foi aguardado sempre um período de no mínimo 5 minutos entre as injeções i.v.

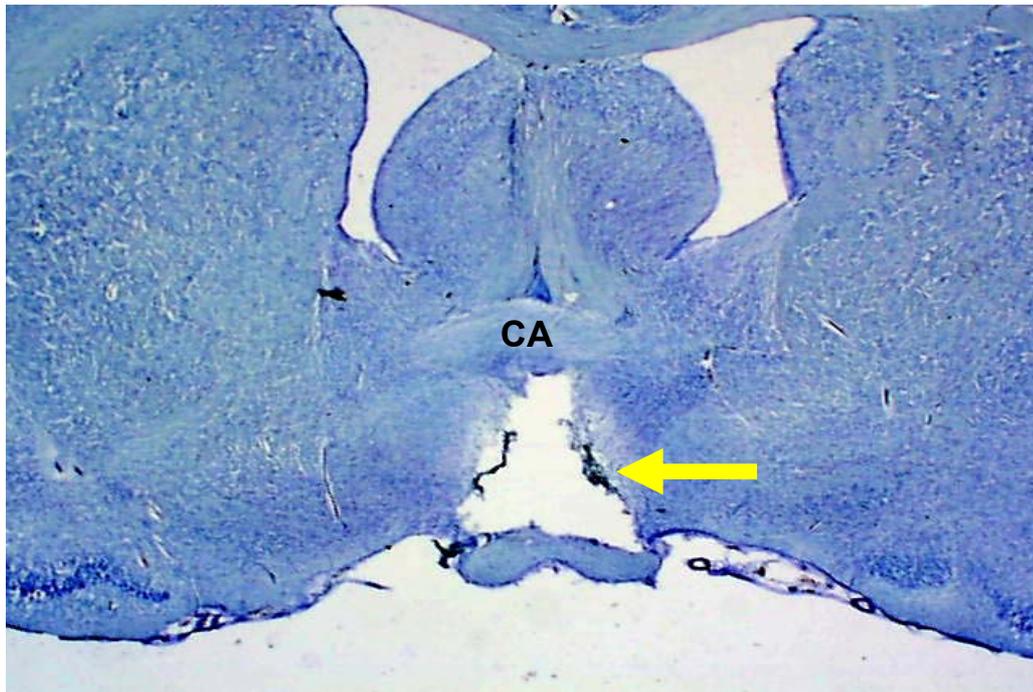
## RESULTADOS

### 1 - Análise histológica

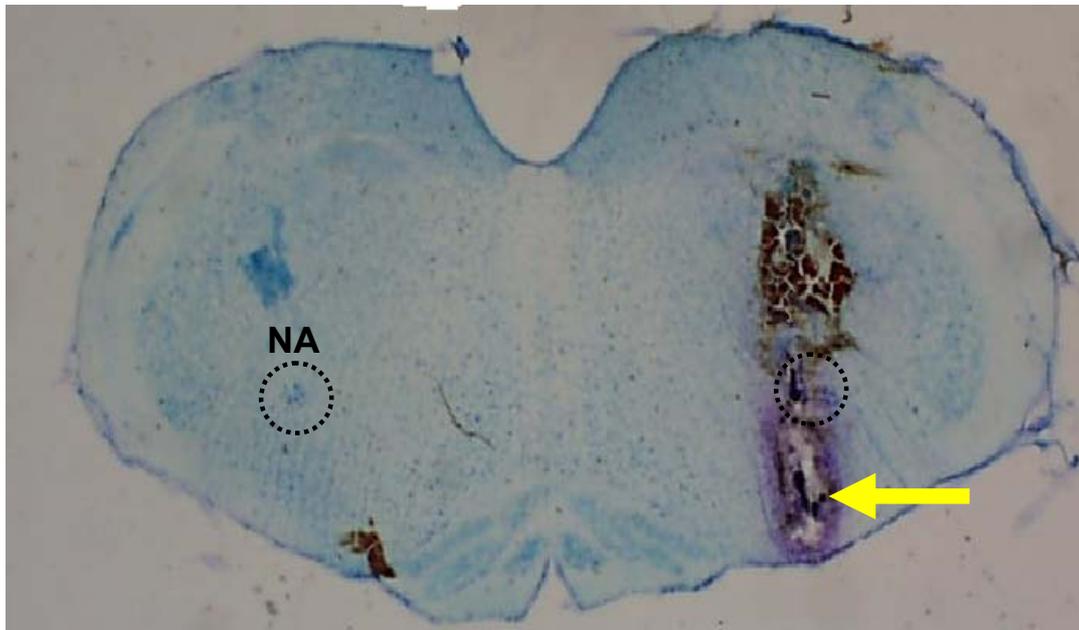
A figura 1 mostra uma lesão típica da região AV3V em um rato representativo dos grupos lesados. A lesão da região AV3V localiza-se entre a comissura anterior e a base do terceiro ventrículo com destruição bilateral do tecido periventricular desde a lâmina terminal até o hipotálamo anterior. As estruturas 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 pré-óptico periventricular, parte ventral do núcleo pré-óptico mediano. Destruição parcial do núcleo pré-óptico medial e do núcleo hipotalâmico anterior também foi observado em alguns animais.

Na figura 2 está ilustrado o local típico das injeções na área RVL. As injeções na área RVL localizaram-se ventralmente ao núcleo ambíguo e imediatamente caudal ao núcleo facial.

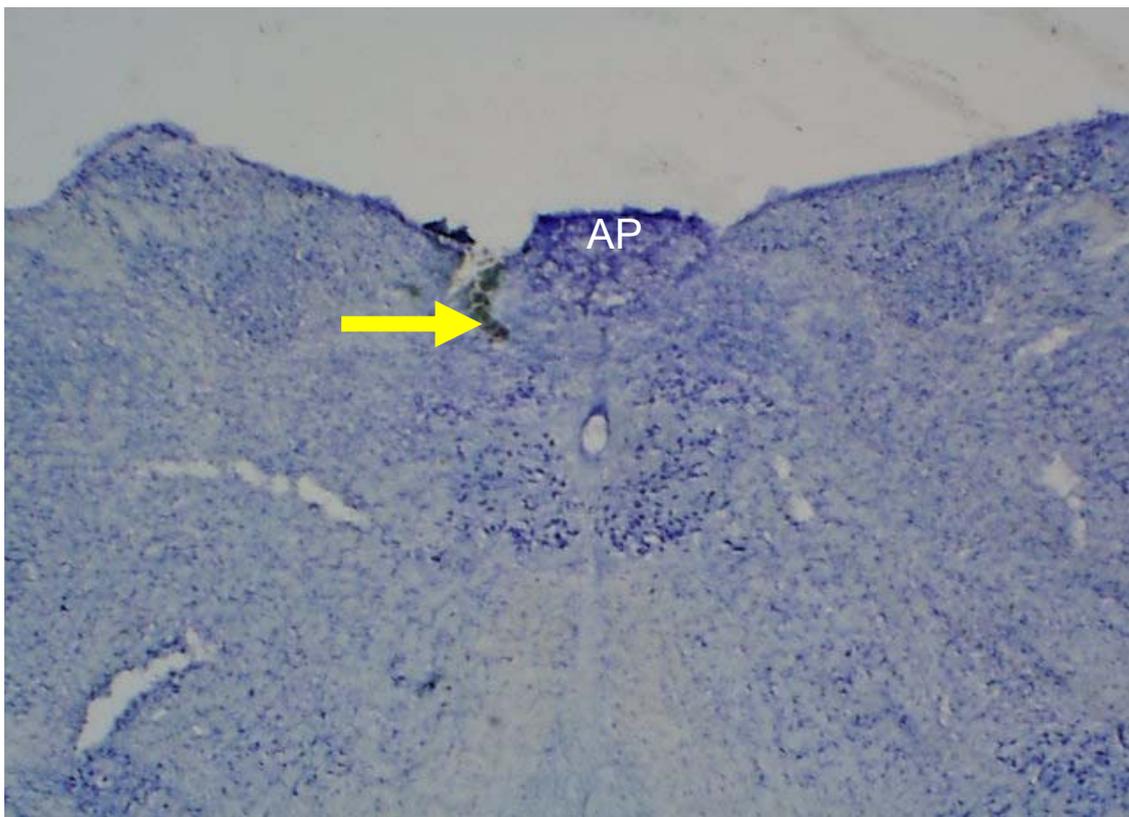
Como mostrado na figura 3, as injeções no NTS foram feitas no NTS medial, lateralmente à área postrema.



**Figura 1:** Fotomicrografia de um corte histológico do cérebro de um animal, indicando (seta) a área da lesão da região anteroventral do terceiro ventrículo (AV3V). Como referência anatômica temos a comissura anterior (CA).



**Figura 2:** Fotomicrografia de um corte histológico do cérebro de um animal, indicando (seta) o sítio de injeção na área rostroventrolateral do bulbo (RVL). Como referência anatômica temos o núcleo ambiguo (contornado pelo círculo - NA).



**Figura 3:** Fotomicrografia de um corte histológico do cérebro de um animal, indicando (seta) o sítio de injeção no núcleo do trato solitário (NTS). Como referência anatômica temos a área postrema (AP).

## **2- Efeitos da lesão da região AV3V nas respostas cardiovasculares produzidas pela injeção de glutamato no NTS.**

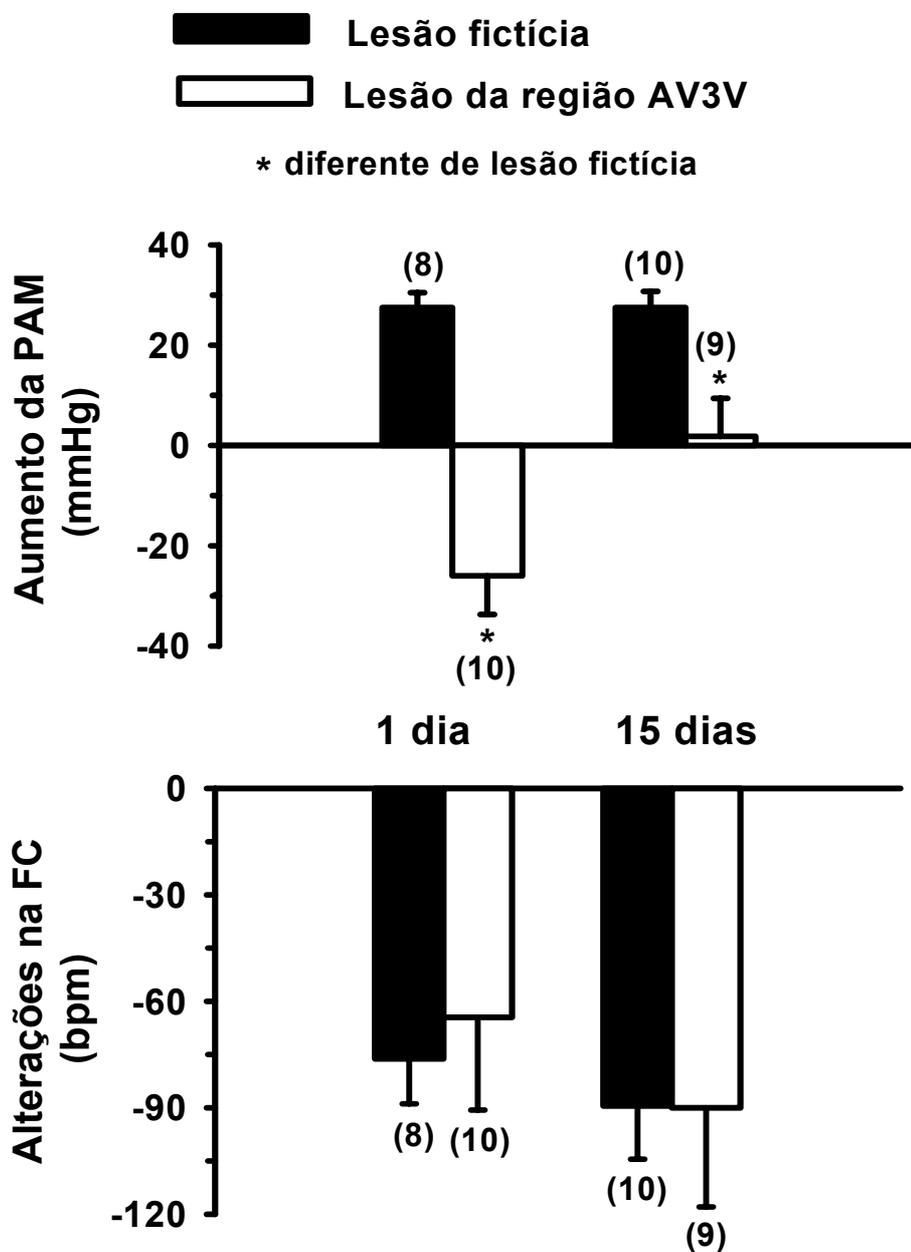
A PAM basal dos animais com lesão aguda (1 dia) e crônica (15 dias) da região AV3V ( $115 \pm 4$  e  $118 \pm 6$  mmHg, respectivamente), não foi diferente da PAM basal dos ratos com lesão fictícia nos mesmos períodos ( $116 \pm 3$  e  $114 \pm 4$  mmHg, respectivamente), [ $F(3, 33) = 0,181$ ;  $p > 0,05$ ]. A FC basal dos animais com lesão aguda e crônica da região AV3V ( $366 \pm 8$  e  $352 \pm 10$  bpm, respectivamente), também não foi diferente da FC basal dos animais com lesão fictícia nos mesmos períodos ( $364 \pm 14$  e  $360 \pm 14$  bpm, respectivamente), [ $F(3,33) = 0,248$ ;  $p > 0,05$ ].

As respostas cardiovasculares produzidas pela injeção de glutamato (5 nmol/100 nl) no NTS de ratos com lesão aguda e crônica da região AV3V ( $-26 \pm 8$  e  $2 \pm 8$  mmHg, respectivamente), foram diferentes das respostas cardiovasculares produzidas pela injeção da mesma dose de glutamato em ratos com lesão fictícia nos mesmos períodos ( $28 \pm 3$  e  $27,5 \pm 3$  mmHg, respectivamente), [ $F(3, 33) = 18,588$ ;  $p < 0,001$ ], (Figura 4).

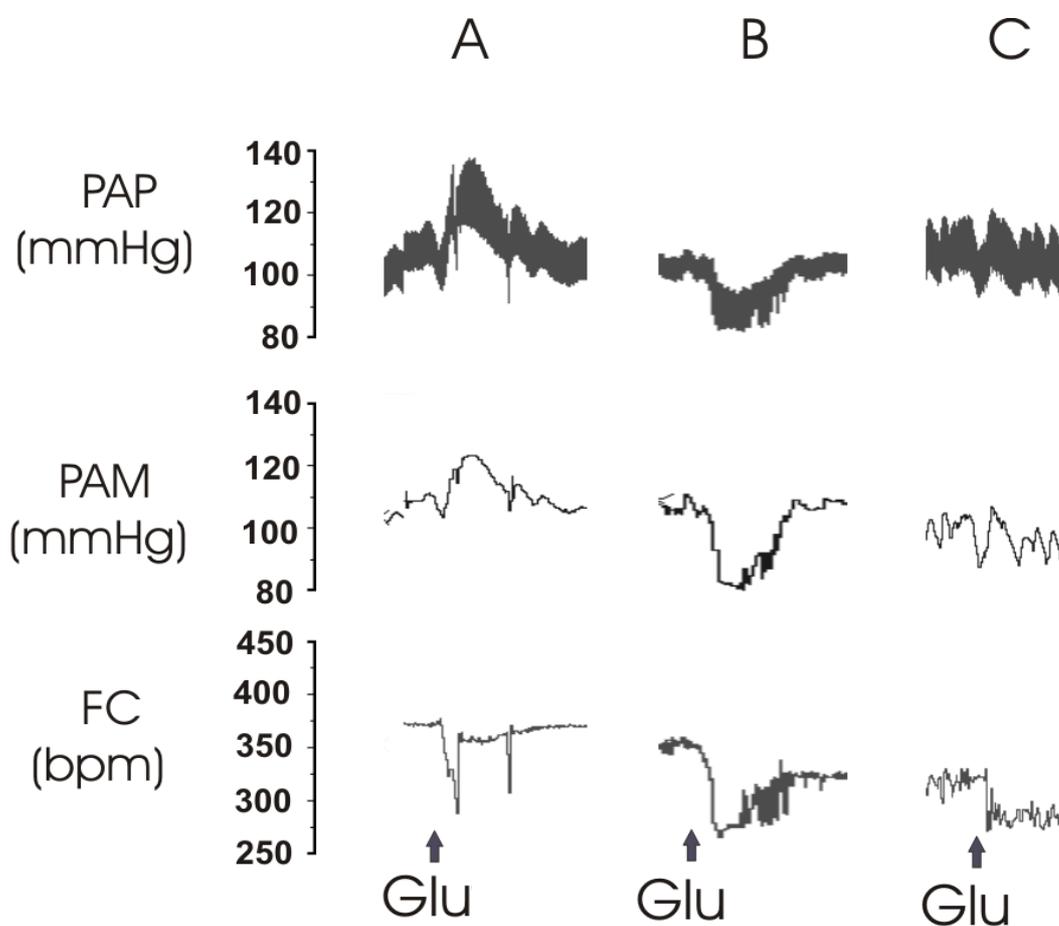
As bradicardias produzidas pela injeção de glutamato (5 nmol/100 nl) no NTS em ratos com lesão aguda e crônica da região AV3V ( $-65 \pm 26$  e  $-90 \pm 29$  bpm, respectivamente), não foram diferentes das bradicardias produzidas pelo glutamato no NTS em animais com lesão fictícia nos mesmos períodos ( $-76 \pm 13$  e  $-90 \pm 15$  bpm, respectivamente), [ $F(3, 33) = 0,315$ ;  $p > 0,05$ ], (Figura 4).

Injeção de salina no NTS não promoveu alterações na pressão arterial e nem na frequência cardíaca em nenhum dos grupos estudados.

Na figura 5 estão apresentados traçados típicos de ratos representativos dos grupos com lesão aguda e crônica da região AV3V ou lesão fictícia que receberam injeções de glutamato na dose de 5 nmol no NTS.



**Figura 4:** Respostas pressoras e bradicárdicas produzidas pela injeção de glutamato (5 nmol) em ratos com lesão da região AV3V (1 e 15 dias) ou lesão fictícia (controle). Os resultados estão expressos como médias  $\pm$  EPM. Entre parênteses está indicado o número de animais.



**Figura 5:** Traçados de três ratos representativos dos grupos testados mostrando os efeitos sobre pressão arterial pulsátil (PAP, mmHg), pressão arterial média (PAM, mmHg) e frequência cardíaca (FC, bpm) produzidos pelo glutamato (5 nmol/100 nl – setas) injetado no NTS em (A) ratos com lesão fictícia, (B) lesão aguda (1 dia) da região AV3V e (C) lesão crônica (15 dias) da região AV3V.

### **3- Efeitos da lesão da região AV3V nas respostas pressoras e taquicárdicas produzidas pela injeção de substância P no NTS.**

A PAM basal dos animais com lesão aguda (1 dia) e crônica (15 dias) da região AV3V ( $116 \pm 4$  e  $123 \pm 3$  mmHg, respectivamente), não foi diferente da PAM basal dos ratos com lesão fictícia nos mesmos períodos ( $109 \pm 3$  e  $116 \pm 3$  mmHg, respectivamente), [ $F(3, 29) = 2,260$ ;  $p > 0,05$ ]. A FC basal dos animais com lesão aguda (1 dia) e crônica (15 dias) da região AV3V ( $376 \pm 16$  e  $383 \pm 14$  bpm, respectivamente), também não foi diferente da FC basal dos animais com lesão fictícia nos mesmos períodos ( $352 \pm 11$  e  $348 \pm 6$  bpm, respectivamente), [ $F(3,29) = 1,264$ ;  $p > 0,05$ ].

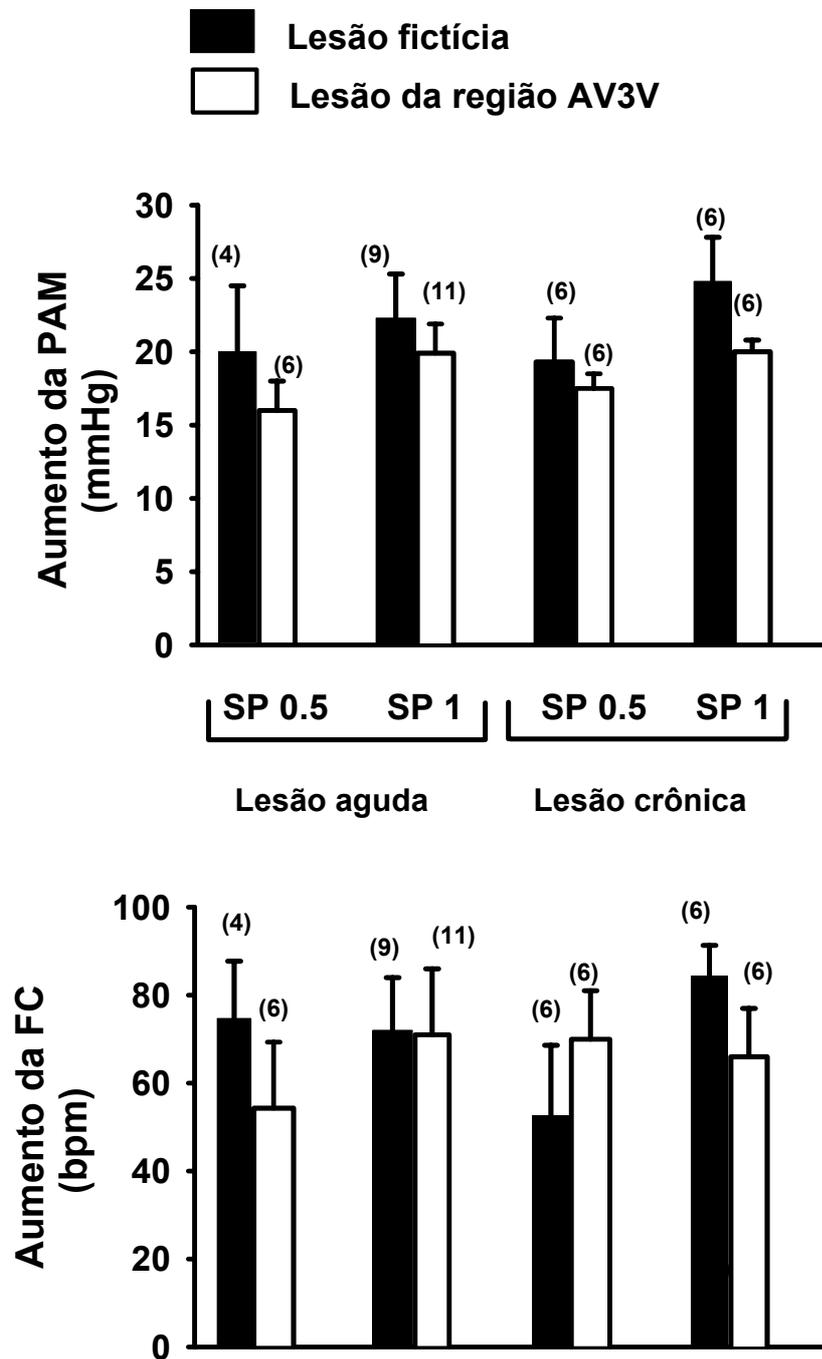
As respostas pressoras produzidas pelas injeções de substância P (0,5 e 1 nmol/100 nl) no NTS de ratos com lesão aguda ( $16 \pm 2$  e  $20 \pm 2$  mmHg, respectivamente) e crônica ( $17,5 \pm 1$  e  $20 \pm 0,8$  mmHg, respectivamente) não foram diferentes daquelas produzidas pelas mesmas doses de substância P injetadas no NTS dos ratos com lesão fictícia aguda ( $20 \pm 5$  e  $22 \pm 3$  mmHg, respectivamente) ou crônica ( $19 \pm 3$  e  $25 \pm 3$  mmHg, respectivamente), [ $F(7,46) = 0,895$ ;  $p > 0,05$ ], (Figura 6).

As respostas taquicárdicas produzidas pelas injeções de substância P (0,5 e 1 nmol/100 nl) no NTS de ratos com lesão aguda ( $54 \pm 15$  e  $71 \pm 15$  bpm, respectivamente) e crônica ( $70 \pm 11$  e  $66 \pm 12$  bpm, respectivamente) também não foram diferentes daquelas produzidas pelas mesmas doses de substância P injetadas no NTS dos ratos com lesão fictícia aguda ( $75 \pm 13$  e  $72 \pm 12$  bpm,

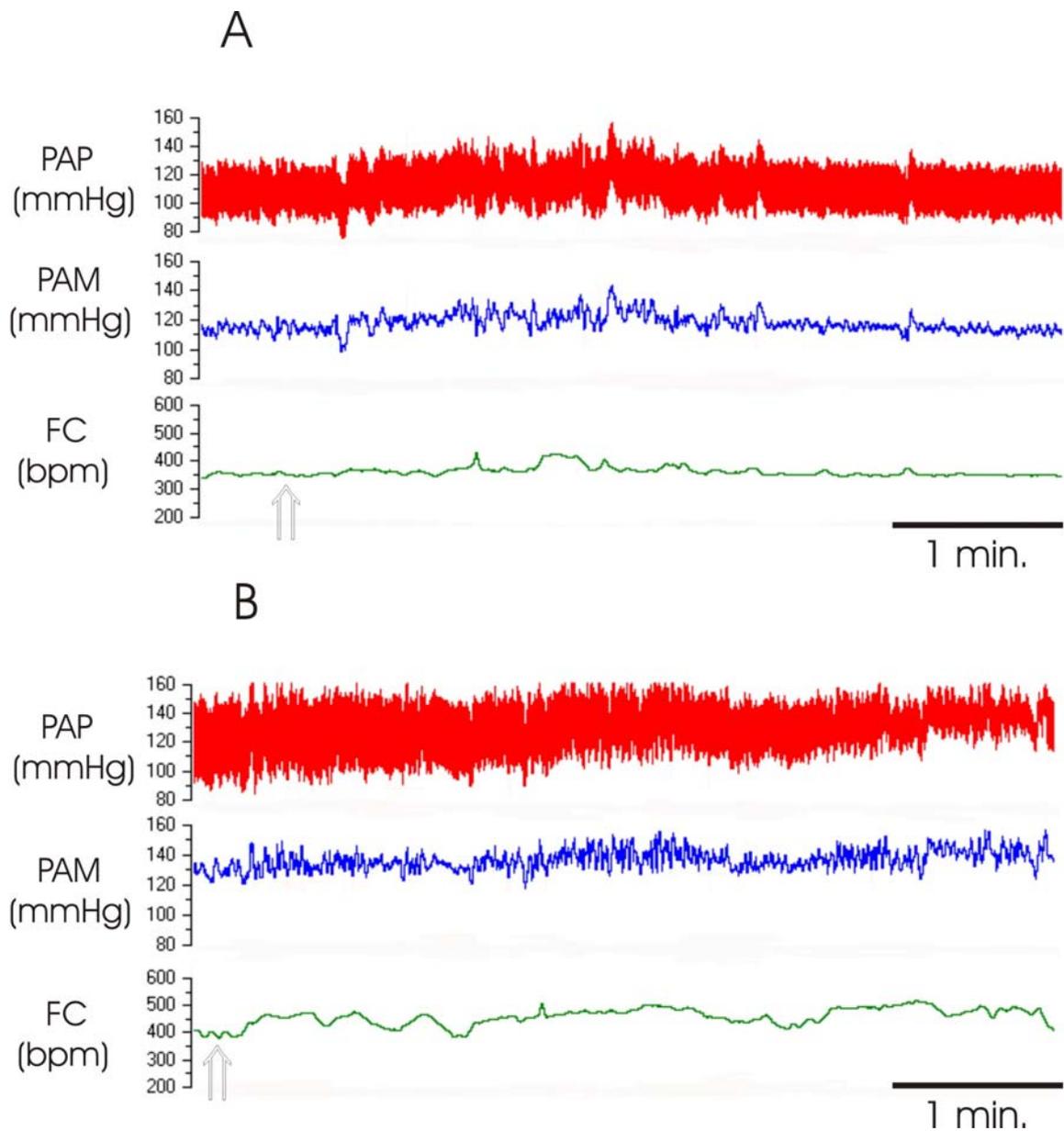
respectivamente) ou crônica ( $53 \pm 16$  e  $84 \pm 7$  bpm, respectivamente), [  $F(7,46) = 0,500$ ;  $p > 0,05$  ],(Figura 6).

Injeção de salina no NTS não promoveu alterações na pressão arterial e nem na frequência cardíaca em nenhum dos grupos estudados.

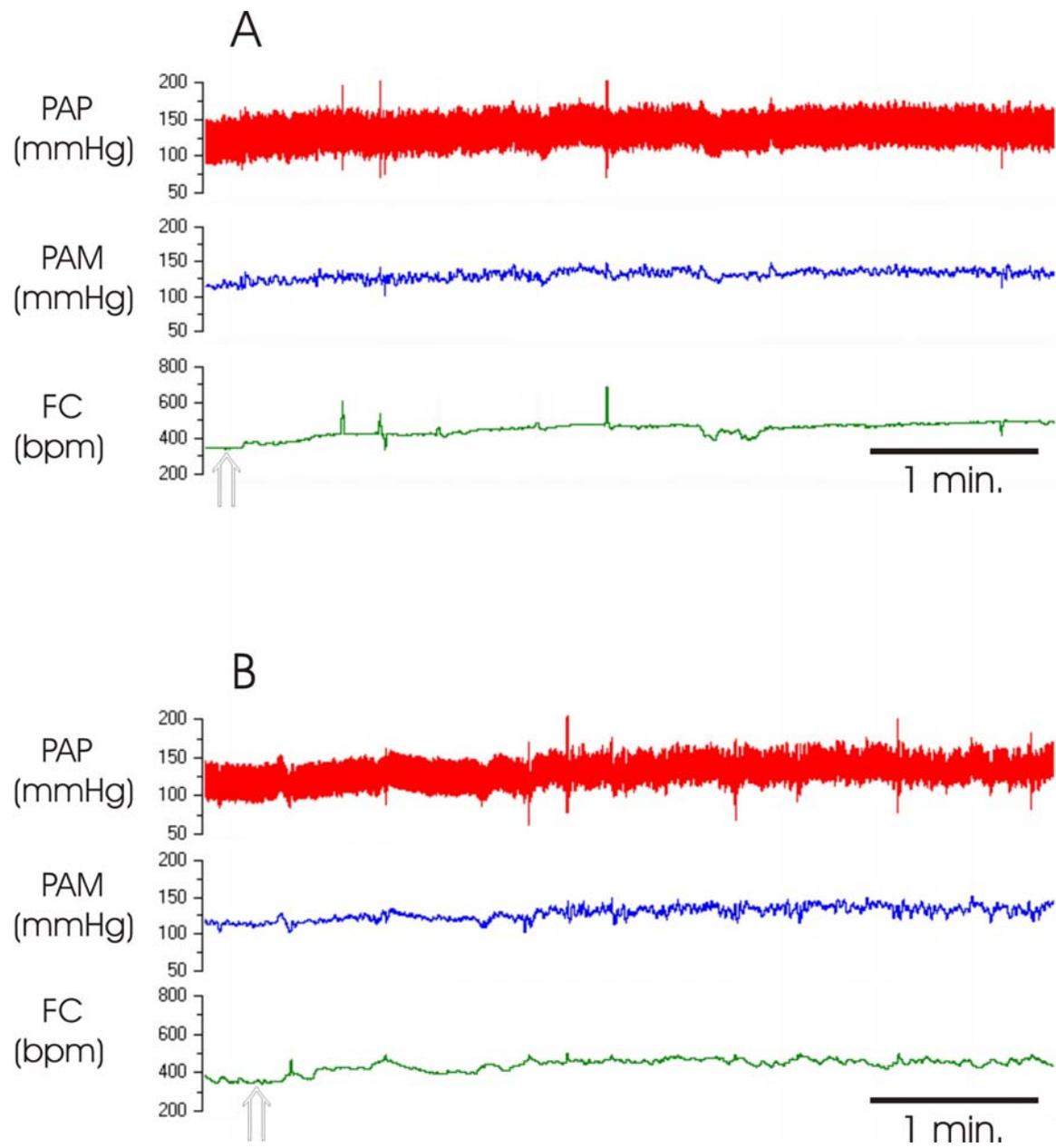
Nas Figuras 7 e 8 estão apresentados traçados típicos de ratos representativos dos grupos com lesão da região aguda ou fictícia da região AV3V e nas figuras 9 e 10, os traçados representativos de ratos com lesão crônica ou fictícia da região AV3V que receberam injeções no NTS de substância P nas doses de 0,5 e 1 nmol, respectivamente.



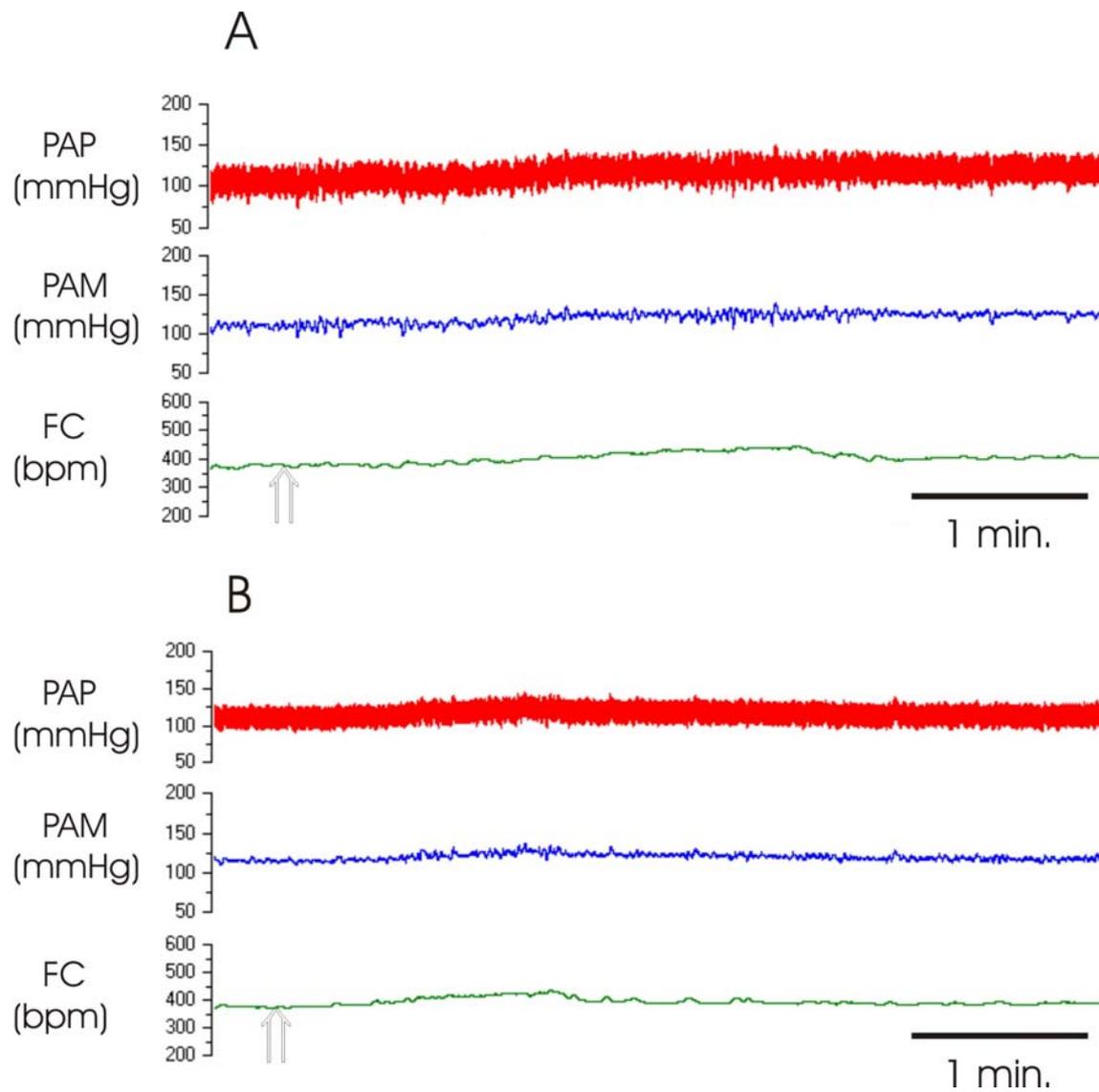
**Figura 6:** Respostas pressoras e taquicárdicas produzidas pela injeção de substância P (0,5 e 1 nmol) em ratos com lesão aguda (1 dia) ou crônica (15 dias) da região AV3V ou lesão fictícia (controle). Os resultados estão expressos como médias  $\pm$  EPM. Entre parênteses está indicado o número de animais.



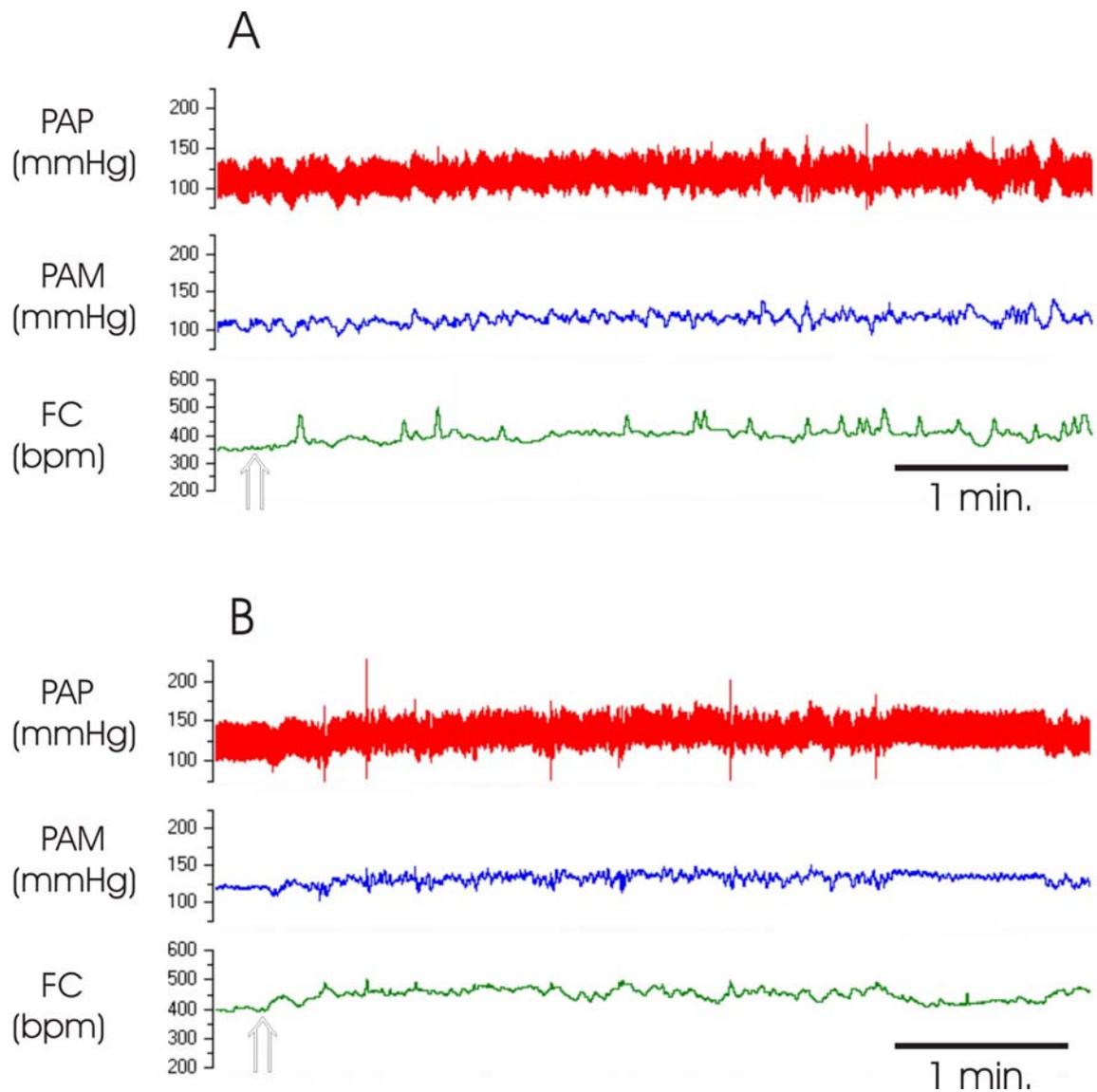
**Figura 7:** Traçados de dois ratos representativos dos grupos testados mostrando os efeitos sobre pressão arterial pulsátil (PAP, mmHg), pressão arterial média (PAM, mmHg) e frequência cardíaca (FC, bpm) produzidos pela injeção de substância P (0,5 nmol/100 nl) no NTS. Em (A), rato com lesão fictícia e em (B), rato com lesão aguda (1 dia) da região AV3V.



**Figura 8:** Traçados de dois ratos representativos dos grupos testados mostrando os efeitos sobre pressão arterial pulsátil (PAP, mmHg), pressão arterial média (PAM, mmHg) e frequência cardíaca (FC, bpm) produzidos pela injeção de substância P (1 nmol/100 nl) no NTS. Em (A), rato com lesão fictícia e em (B), rato com lesão aguda (1 dia) da região AV3V.



**Figura 9:** Traçados de dois ratos representativos dos grupos testados mostrando os efeitos sobre pressão arterial pulsátil (PAP, mmHg), pressão arterial média (PAM, mmHg) e frequência cardíaca (FC, bpm) produzidos pela injeção de substância P (0,5 nmol/100 nl) no NTS. Em (A), rato com lesão fictícia e em (B), rato com lesão crônica (15 dias) da região AV3V.



**Figura 10:** Traçados de dois ratos representativos dos grupos testados mostrando os efeitos sobre pressão arterial pulsátil (PAP, mmHg), pressão arterial média (PAM, mmHg) e frequência cardíaca (FC, bpm) produzidos pela injeção de substância P (1 nmol/100 nl) no NTS. Em (A), rato com lesão fictícia e em (B), rato com lesão crônica (15 dias) da região AV3V.

#### **4- Efeitos da lesão da região AV3V nas respostas cardiovasculares produzidas pela injeção de glutamato na área RVL.**

A PAM basal dos animais não foi modificada pela lesão aguda (1 dia) da região AV3V ( $120 \pm 3$  mmHg, vs. lesão fictícia:  $126 \pm 2$  mmHg), [F(1, 22) = 3.028;  $p > 0,05$ ] ou crônica (15 dias), ( $117 \pm 3$  mmHg, vs. lesão fictícia:  $120 \pm 2$  mmHg), [F(1,18) = 1.145;  $p > 0,05$ ]. A FC basal nos animais com 1 dia de lesão da região AV3V ( $428 \pm 13$  bpm) foi maior do que a FC basal dos animais com lesão fictícia ( $368 \pm 14$  bpm), [F(1, 22) = 7.640;  $p < 0,05$ ], mas a lesão crônica da região AV3V não modificou a FC basal ( $341 \pm 10$  bpm, vs. lesão fictícia:  $360 \pm 11$  bpm), [F(1,18) = 1.671;  $p > 0,05$ ].

As respostas pressoras produzidas pelas injeções de glutamato (1, 5 e 10 nmol/100 nl) na área RVL dos ratos com lesão aguda da região AV3V ( $9 \pm 4$ ,  $39 \pm 6$  e  $37 \pm 4$  mmHg, respectivamente) foram menores do que aquelas produzidas pelas mesmas doses de glutamato injetado na área RVL dos animais com lesão fictícia ( $33 \pm 5$ ,  $54 \pm 3$  e  $56 \pm 8$  mmHg, respectivamente), [F(7, 70) = 26,474;  $p < 0,001$ ], (Figura 11). A resposta produzida pela dose de 1 nmol de glutamato injetada nos animais com lesão da região AV3V, não foi diferente daquela produzida pelas injeções de salina nos mesmos animais ou nos animais com lesão fictícia.

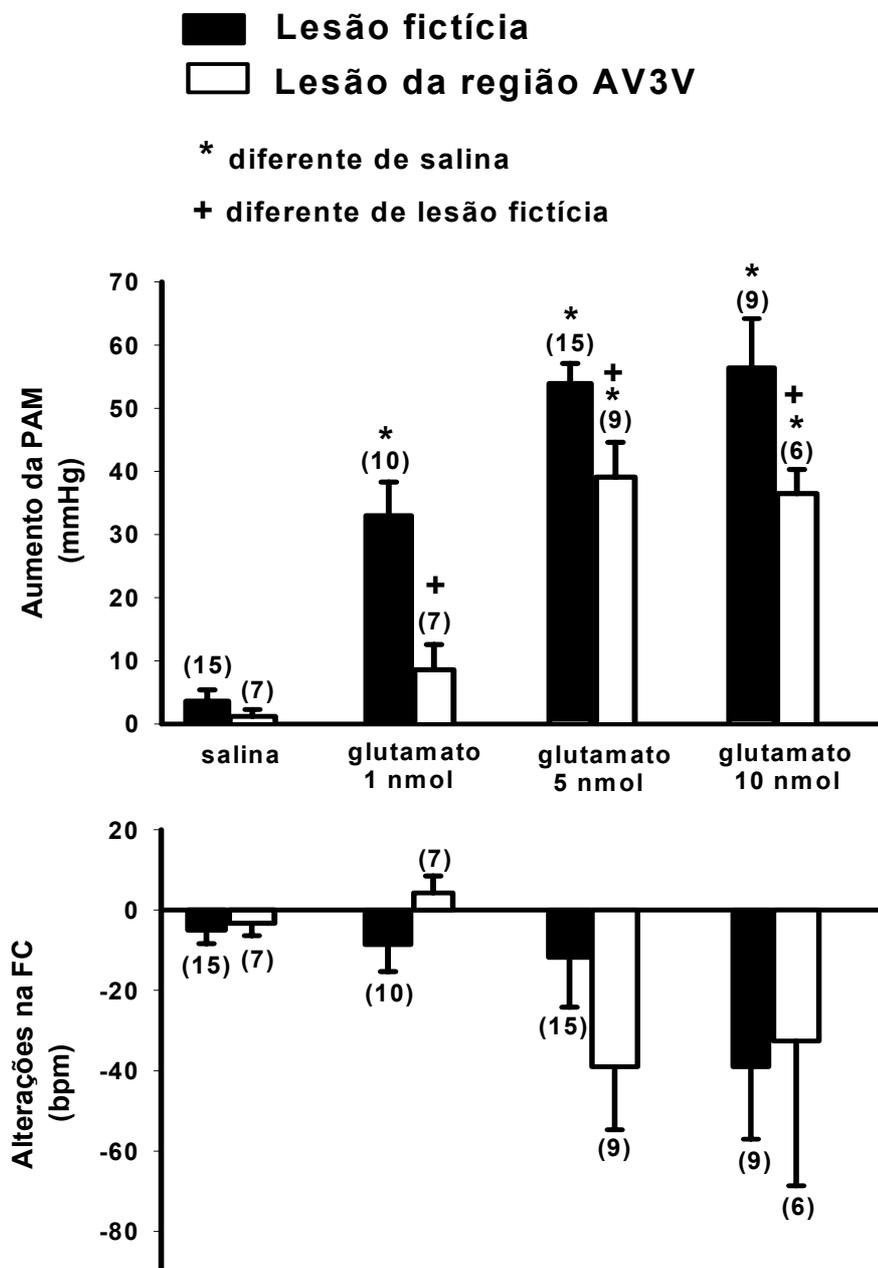
As alterações de FC produzidas pelas injeções de glutamato (1, 5 e 10 nmol/100 nl) na área RVL tanto em ratos com lesão aguda da região AV3V, ( $4 \pm 4$ ,  $-39 \pm 16$  e  $-32 \pm 37$  bpm, respectivamente) como em animais com lesão fictícia ( $-9 \pm 7$ ,  $-12 \pm 12$  e  $-39 \pm 18$  bpm, respectivamente) não foram diferentes das

alterações após injeção de salina na área RVL,  $[F(7, 70) = 1,451; p > 0,05]$ , (Figura 11).

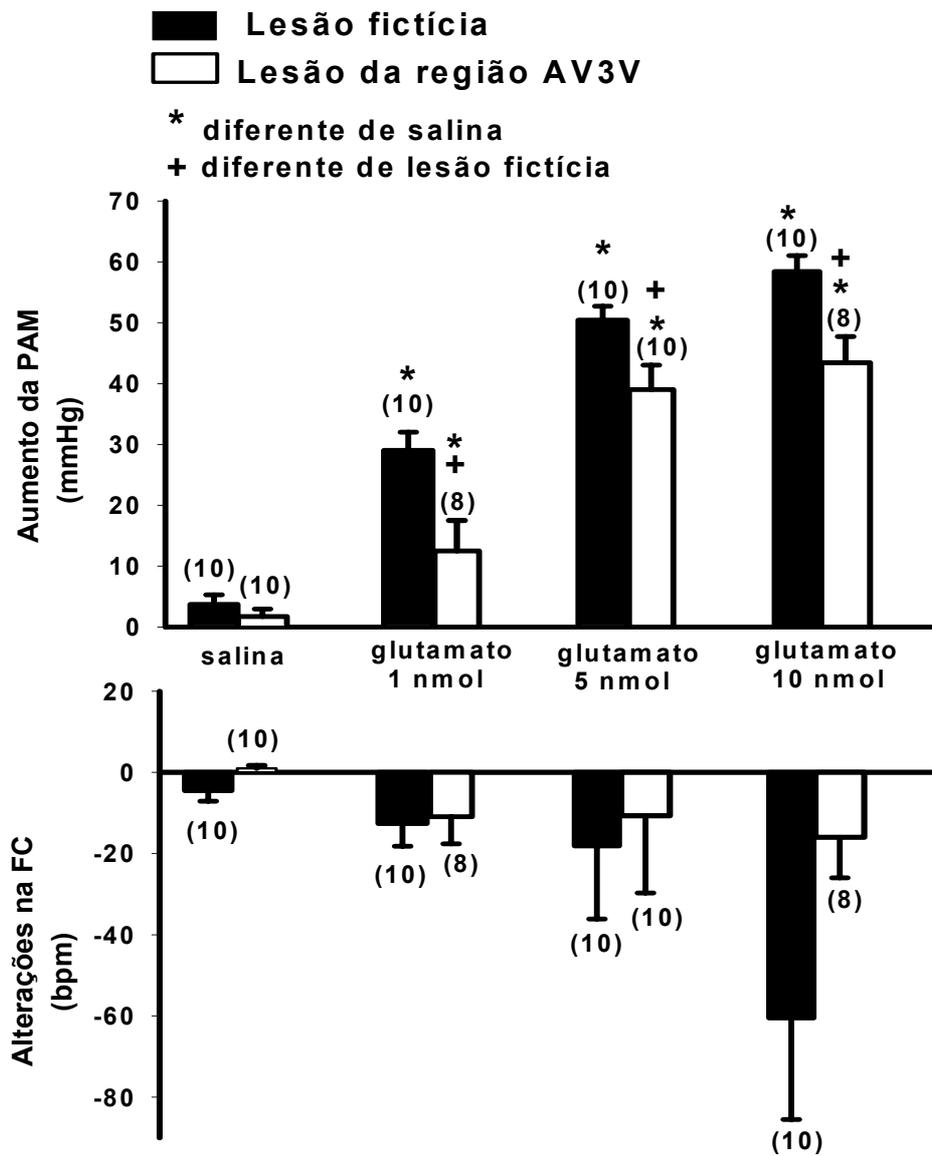
As respostas pressoras produzidas pelas injeções de glutamato (1, 5 e 10 nmol/100 nl) na área RVL dos ratos com lesão crônica da região AV3V ( $13 \pm 6$ ,  $39 \pm 4$  e  $43 \pm 4$  mmHg, respectivamente) também foram menores do que aquelas produzidas pelas mesmas doses de glutamato injetado na área RVL dos animais com lesão fictícia ( $29 \pm 3$ ,  $50 \pm 2$  e  $58 \pm 3$  mmHg, respectivamente),  $[F(7, 68) = 46.012; p < 0,001]$ , (Figura 12).

As alterações de FC produzidas pelas injeções de glutamato (1, 5 e 10 nmol/100 nl) na área RVL tanto em ratos com lesão crônica da região AV3V ( $-11 \pm 7$ ,  $-11 \pm 19$  e  $-16 \pm 10$  bpm, respectivamente) como em animais com lesão fictícia ( $-13 \pm 6$ ,  $-18 \pm 18$  e  $-61 \pm 25$  bpm, respectivamente) não foram diferentes das alterações que ocorreram após a injeção de salina na área RVL,  $[F(7, 68) = 1.802; p > 0,05]$ , (Figura 12).

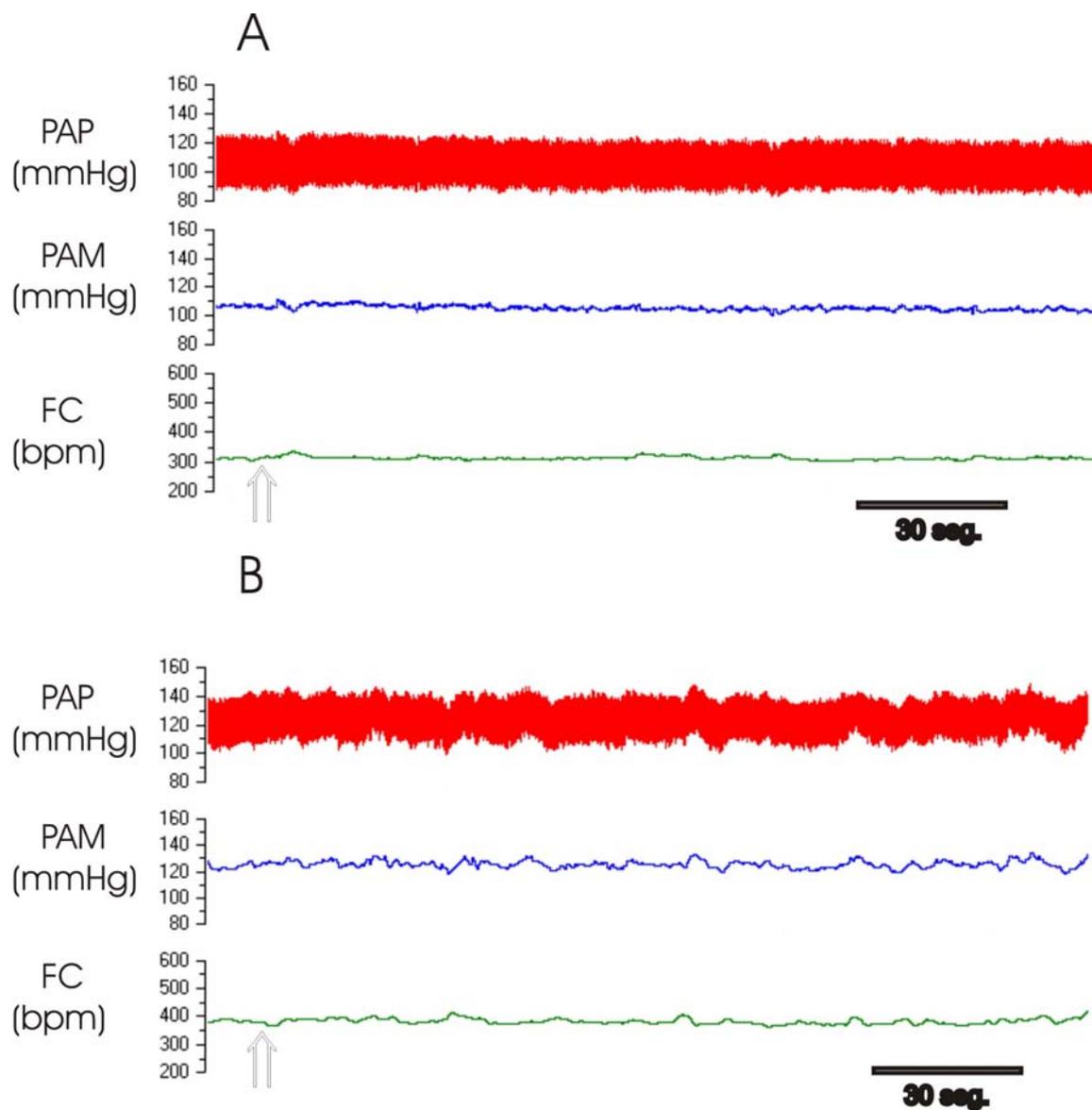
Nas figuras 14, 15 e 16 estão apresentados traçados típicos de ratos representativos dos grupos com lesão aguda da região AV3V ou lesão fictícia e nas figuras 17, 18 e 19 estão apresentados traçados típicos de ratos representativos dos grupos com lesão crônica da região AV3V ou lesão fictícia que receberam injeções de glutamato nas doses de 1, 5 e 10 nmol na área RVL.



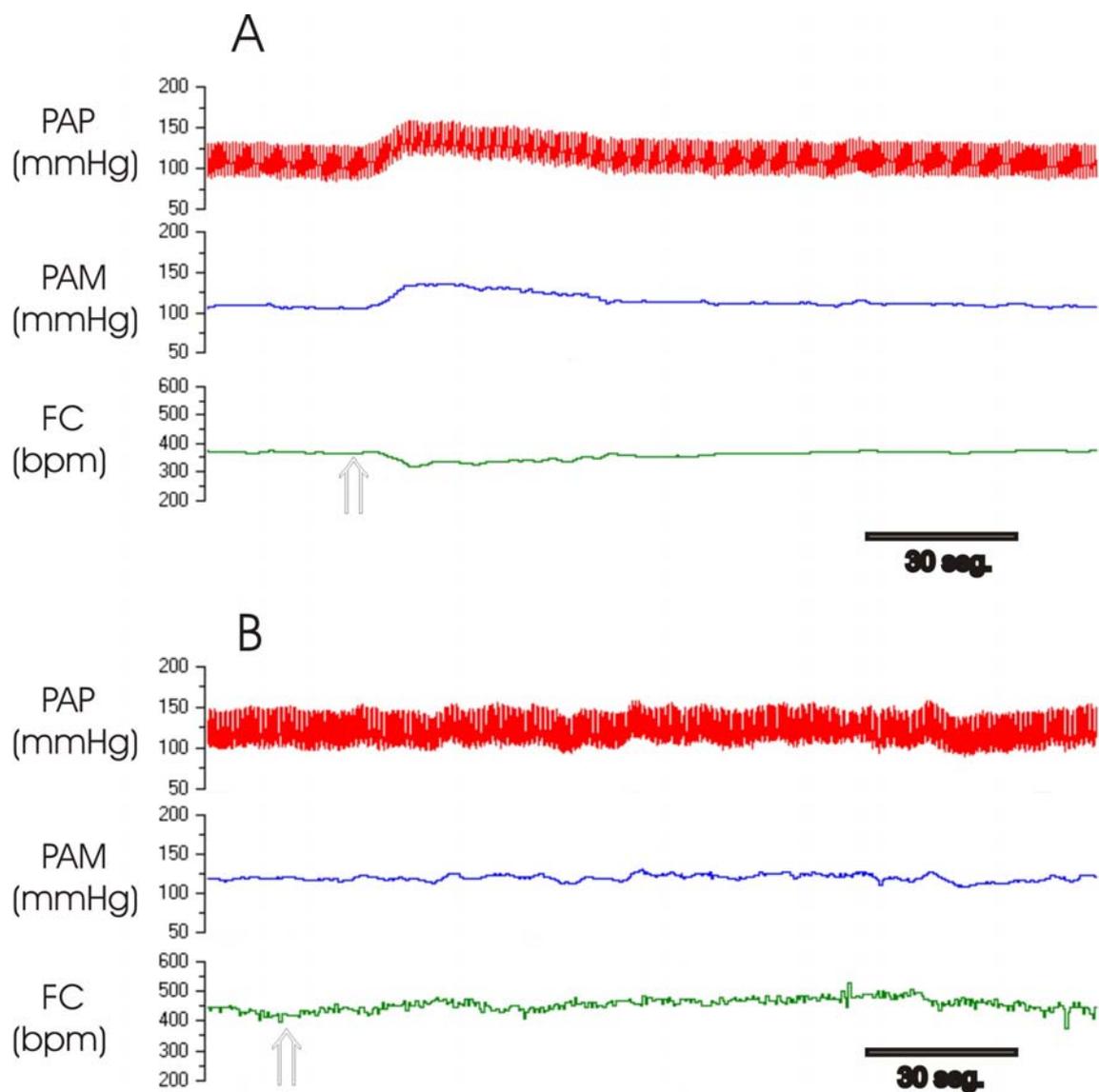
**Figura 11:** Alterações da pressão arterial média e frequência cardíaca produzidas pela injeção de glutamato (1, 5 e 10 nmol) em ratos com lesão da região AV3V (1 dia) ou lesão fictícia (controle). Os resultados estão expressos como médias  $\pm$  EPM. Entre parênteses está indicado o número de animais.



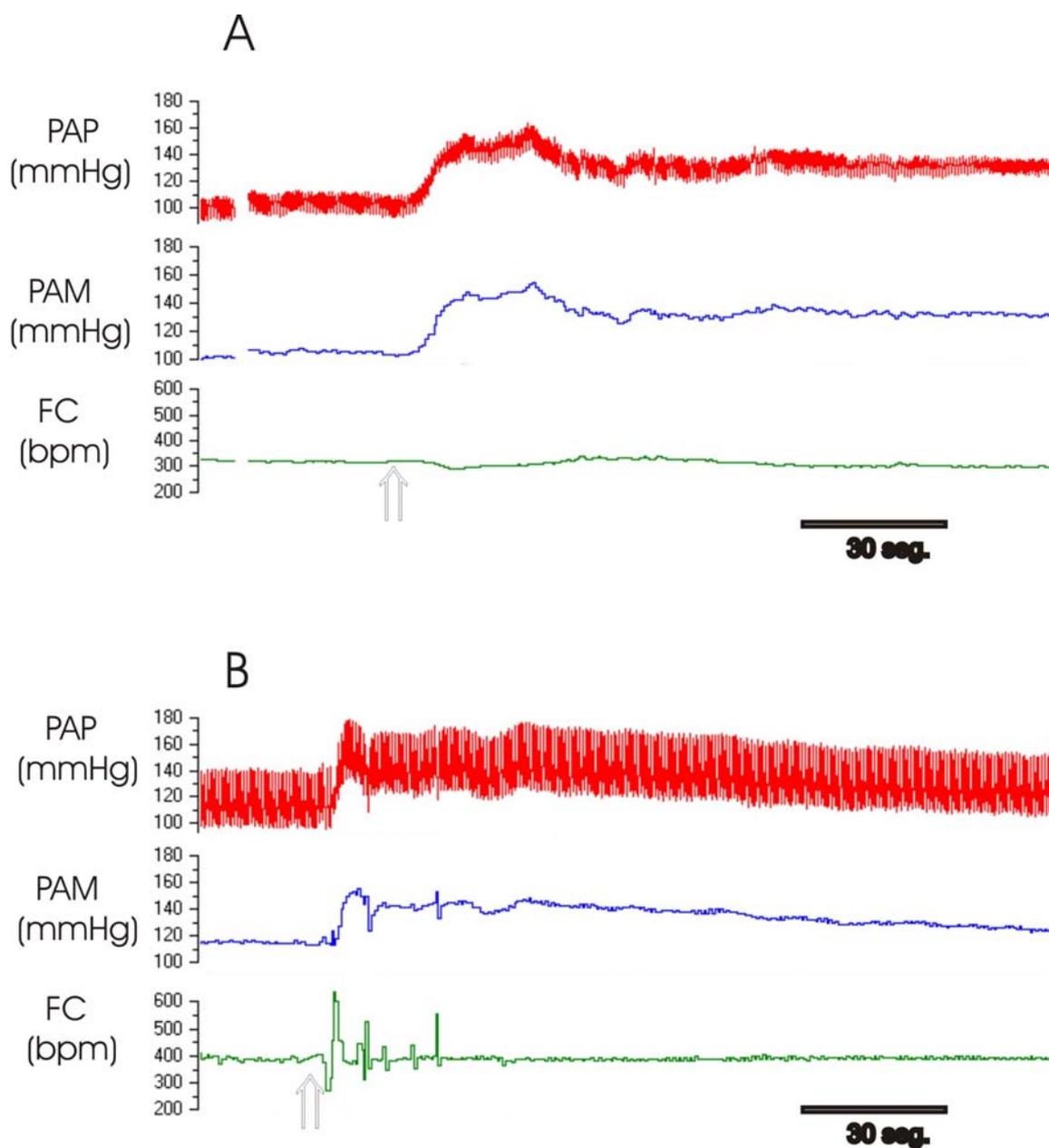
**Figura 12:** Alterações da pressão arterial média e freqüência cardíaca produzidas pela injeção de glutamato (1, 5 e 10 nmol) em ratos com lesão da região AV3V (15 dias) ou lesão fictícia (controle). Os resultados estão expressos como médias  $\pm$  EPM. Entre parênteses está indicado o número de animais.



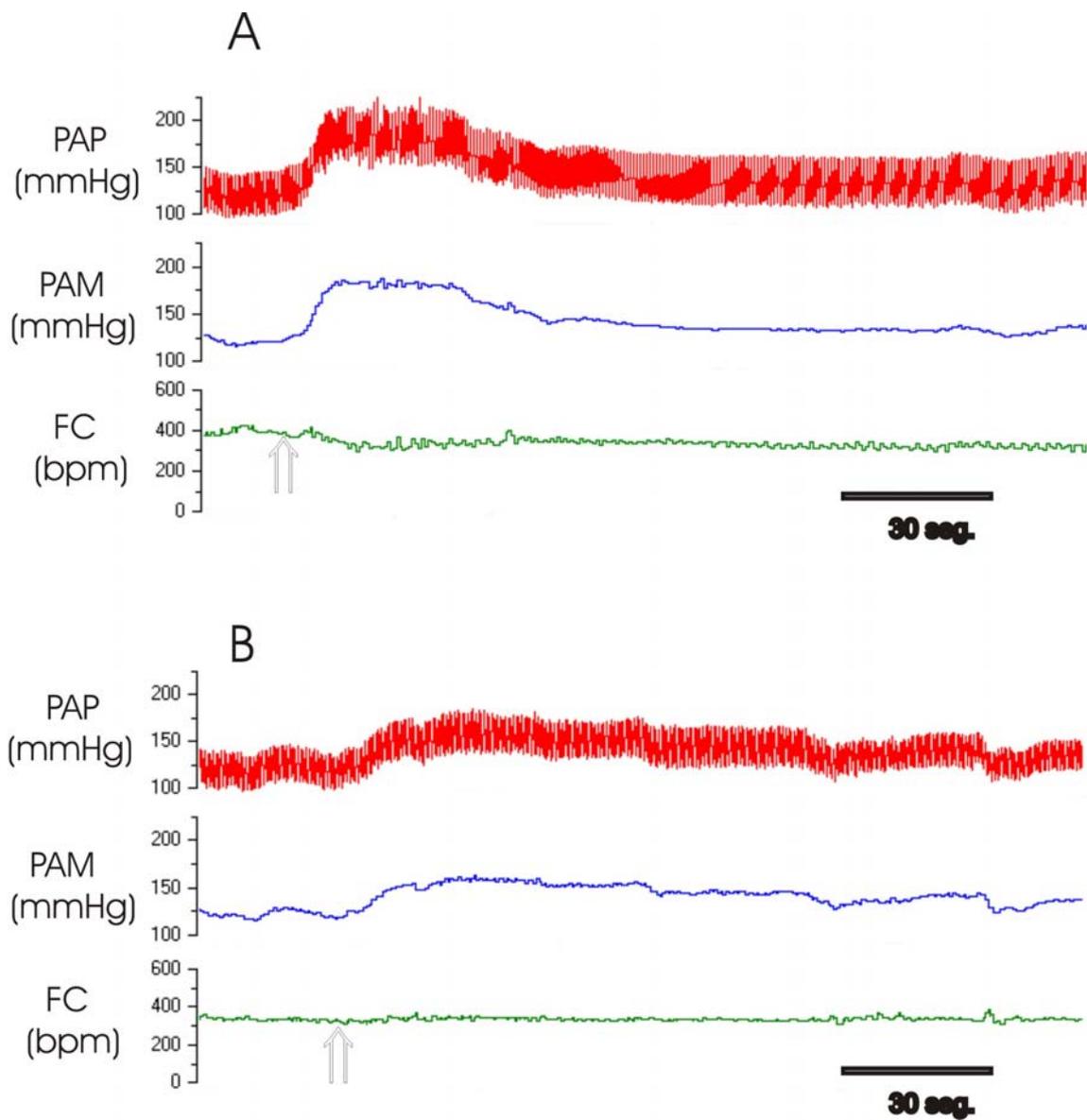
**Figura 13:** Traçados de dois ratos representativos dos grupos testados mostrando os efeitos sobre pressão arterial pulsátil (PAP, mmHg), pressão arterial média (PAM, mmHg) e frequência cardíaca (FC, bpm) produzidos pela injeção de salina (100 nl) na área RVL. Em (A), rato com lesão fictícia e em (B), rato com lesão aguda (1 dia) da região AV3V.



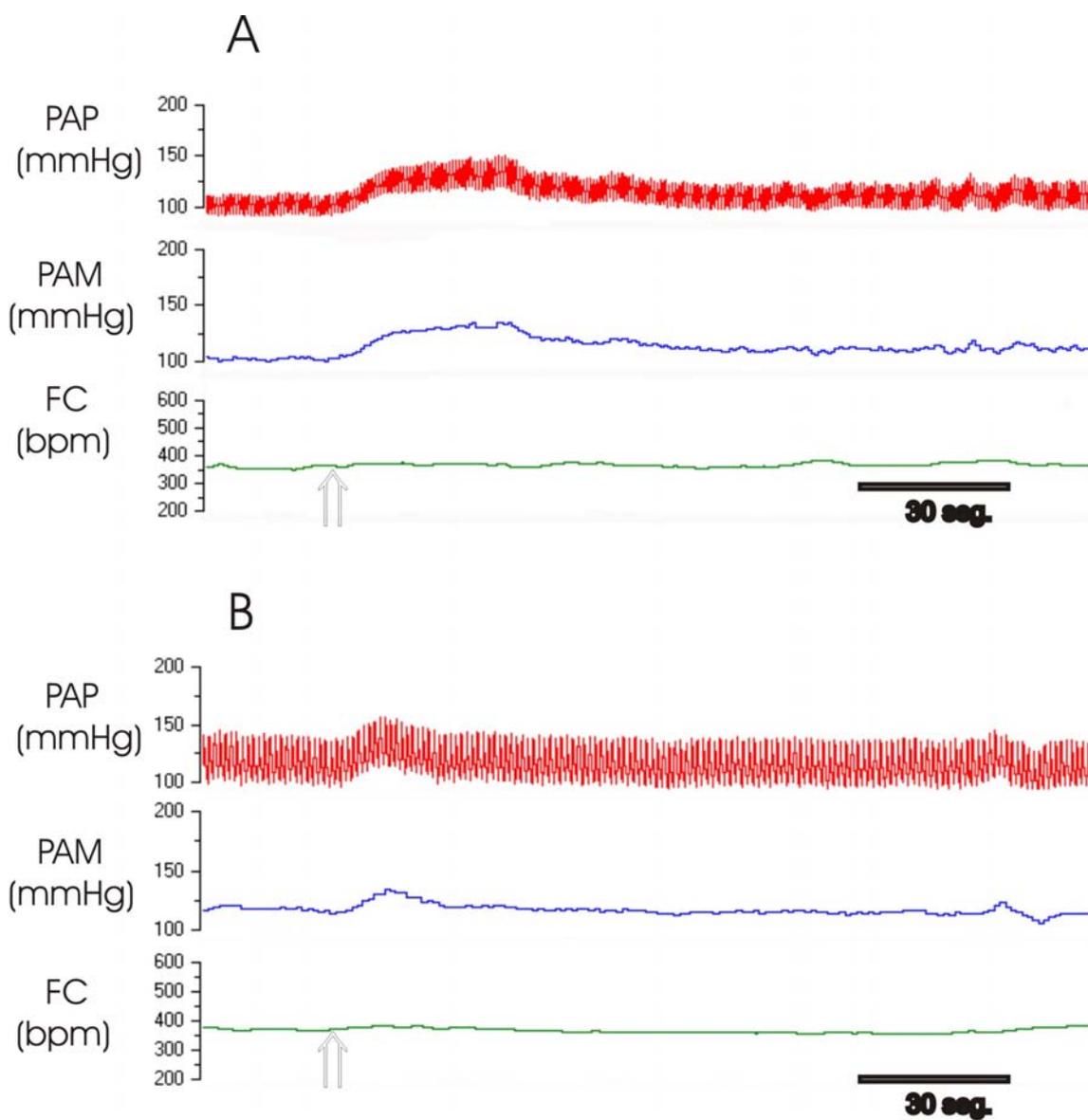
**Figura 14:** Traçados de dois ratos representativos dos grupos testados mostrando os efeitos sobre pressão arterial pulsátil (PAP, mmHg), pressão arterial média (PAM, mmHg) e frequência cardíaca (FC, bpm) produzidos pela injeção de glutamato (1 nmol/100 nl) na área RVL. Em (A), rato com lesão fictícia e em (B), rato com lesão aguda (1 dia) da região AV3V.



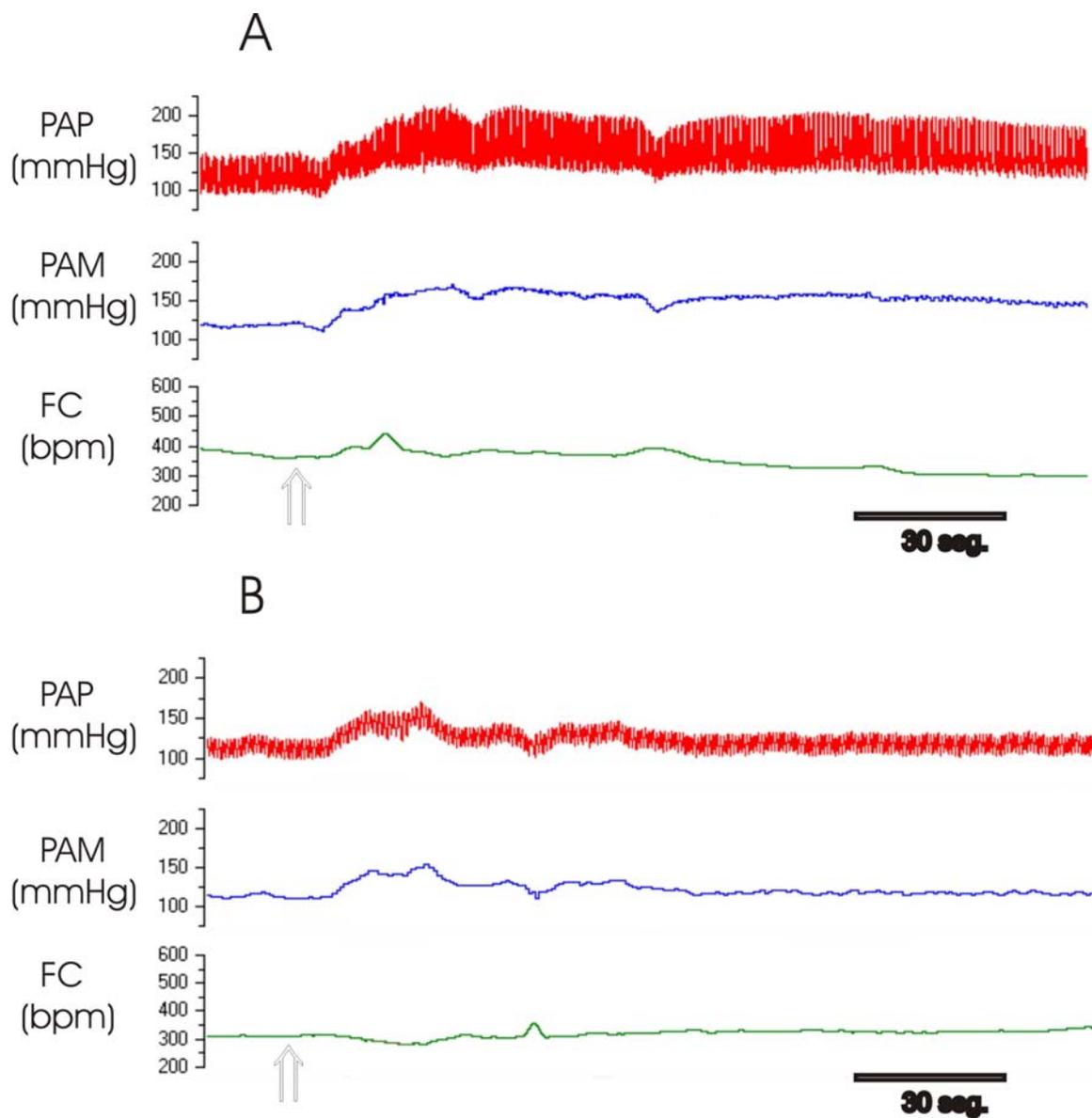
**Figura 15:** Traçados de dois ratos representativos dos grupos testados mostrando os efeitos sobre pressão arterial pulsátil (PAP, mmHg), pressão arterial média (PAM, mmHg) e frequência cardíaca (FC, bpm) produzidos pela injeção de glutamato (5 nmol/100 nl) na área RVL. Em (A), rato com lesão fictícia e em (B), rato com lesão aguda (1 dia) da região AV3V.



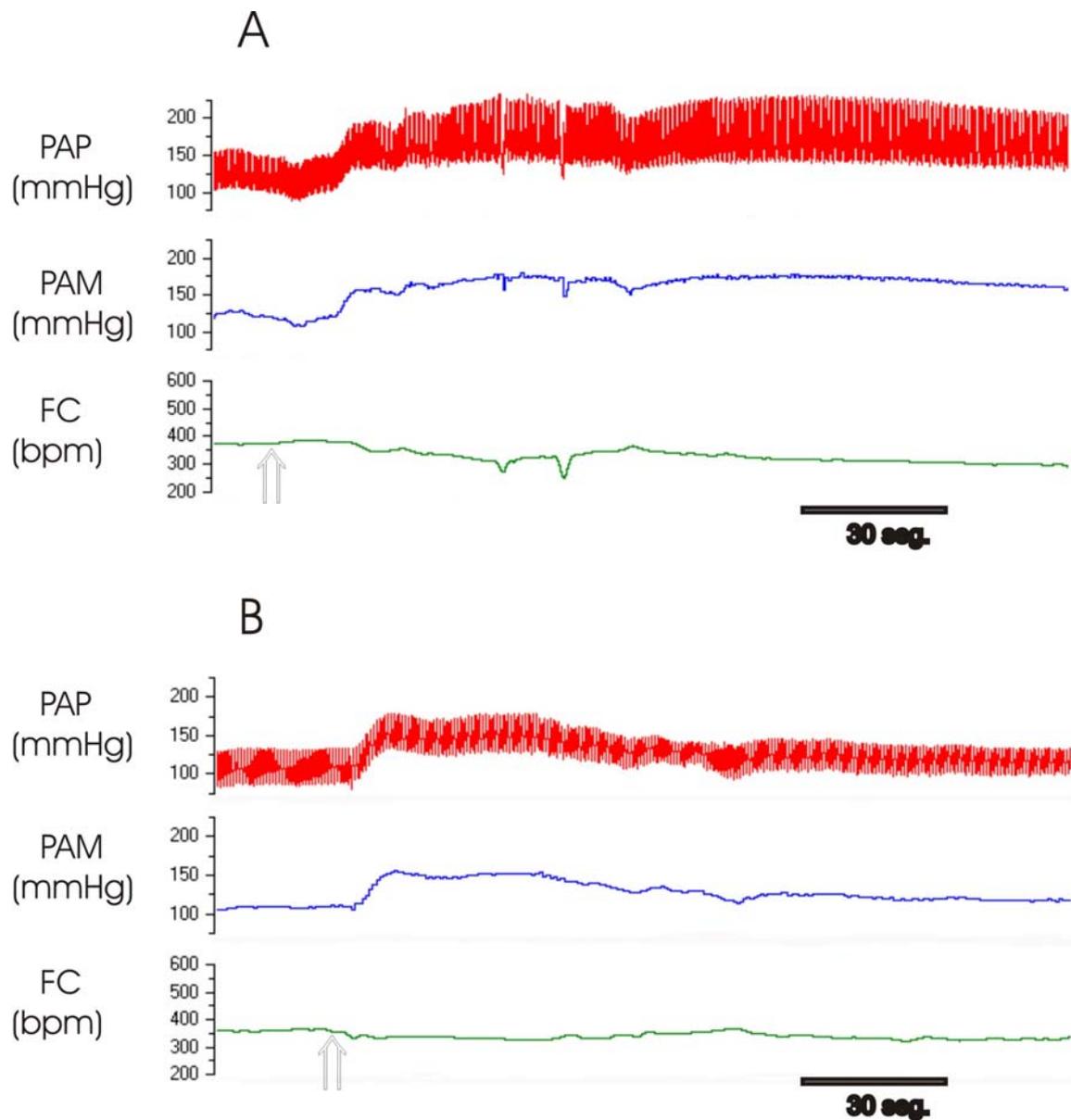
**Figura 16:** Traçados de dois ratos representativos dos grupos testados mostrando os efeitos sobre pressão arterial pulsátil (PAP, mmHg), pressão arterial média (PAM, mmHg) e frequência cardíaca (FC, bpm) produzidos pela injeção de glutamato (10 nmol/100 nl) na área RVL. Em (A), rato com lesão fictícia e em (B), rato com lesão aguda (1 dia) da região AV3V.



**Figura 17:** Traçados de dois ratos representativos dos grupos testados mostrando os efeitos sobre pressão arterial pulsátil (PAP, mmHg), pressão arterial média (PAM, mmHg) e frequência cardíaca (FC, bpm) produzidos pela injeção de glutamato (1 nmol/100 nl) na área RVL. Em (A), rato com lesão fictícia e em (B), rato com lesão crônica (15 dias) da região AV3V.



**Figura 18:** Traçados de dois ratos representativos dos grupos testados mostrando os efeitos sobre pressão arterial pulsátil (PAP, mmHg), pressão arterial média (PAM, mmHg) e frequência cardíaca (FC, bpm) produzidos pela injeção de glutamato (5 nmol/100 nl) na área RVL. Em (A), rato com lesão fictícia e em (B), rato com lesão crônica (15 dias) da região AV3V.



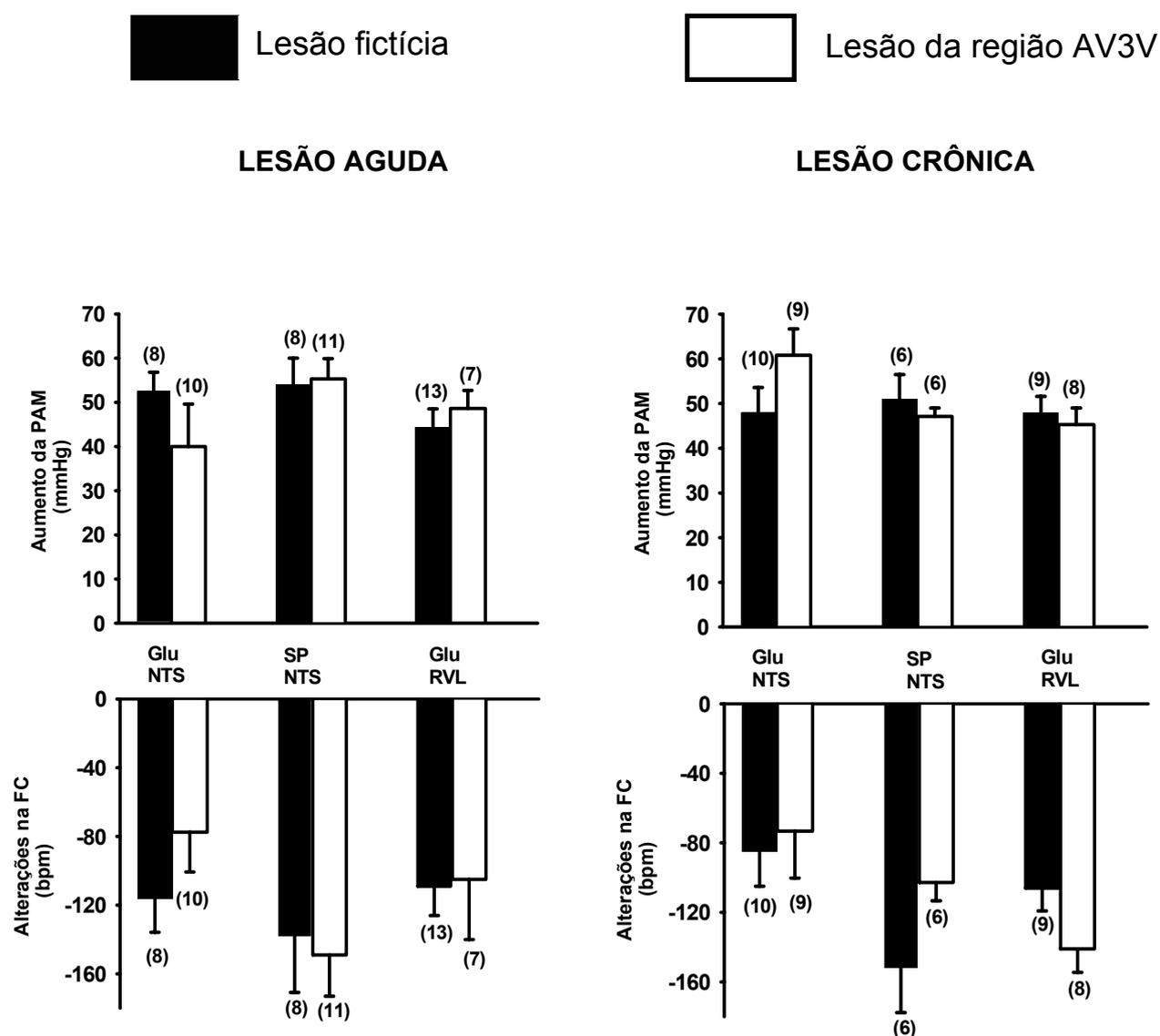
**Figura 19:** Traçados de dois ratos representativos dos grupos testados mostrando os efeitos sobre pressão arterial pulsátil (PAP, mmHg), pressão arterial média (PAM, mmHg) e frequência cardíaca (FC, bpm) produzidos pela injeção de glutamato (10 nmol/100 nl) na área RVL. Em (A), rato com lesão fictícia e em (B), rato com lesão crônica (15 dias) da região AV3V.

## **5- Respostas pressoras e bradicárdicas induzidas pela ativação do quimiorreflexo com injeção i.v. de KCN nos ratos com lesão da região AV3V pertencentes aos diferentes grupos estudados.**

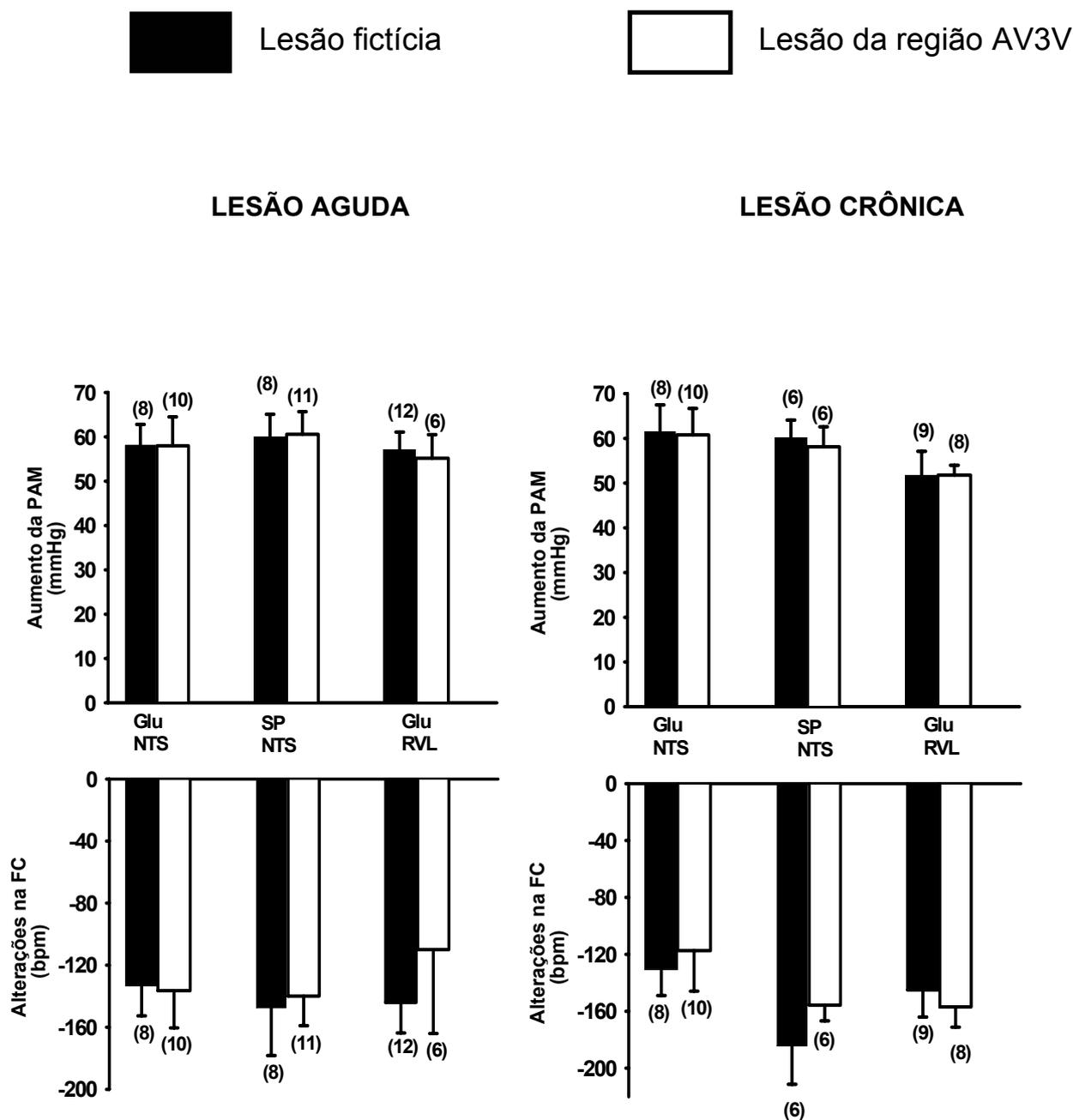
As respostas pressoras e bradicárdicas produzidas pela injeção i.v. de KCN (20 e 40  $\mu\text{g}$ ) foram testadas em todos os ratos que receberam injeções no NTS ou na área RVL e os resultados apresentados pelos diferentes grupos de ratos com lesão aguda (1 dia) ou crônica (15 dias) da região AV3V ou lesão fictícia estão apresentados nas Figuras 20 e 21.

As respostas pressoras produzidas pela injeção i.v. de KCN (20  $\mu\text{g}$ ) nos diversos grupos de ratos com lesão aguda, [F(5, 51) = 1,087;  $p > 0,05$ ] ou crônica da região AV3V [F(5, 42) = 1,247;  $p > 0,05$ ] não foram diferentes daquelas observadas nos ratos com lesão fictícia, (Figura 20). As respostas bradicárdicas produzidas pela injeção i.v. de KCN (20  $\mu\text{g}$ ) nos diversos grupos de ratos com lesão aguda, [F(5, 51) = 1,138;  $p > 0,05$ ], ou crônica da região AV3V [F(5, 42) = 2,244;  $p > 0,05$ ] também não foram diferentes das respostas nos ratos com lesão fictícia (Figura 20).

As respostas pressoras produzidas pela injeção i.v. de KCN (40  $\mu\text{g}$ ) nos diversos grupos de ratos com lesão aguda, [F(5, 49) = 0,126;  $p > 0,05$ ] ou crônica da região AV3V [F(5, 42) = 0,783;  $p > 0,05$ ], assim como as respostas bradicárdicas produzidas pela injeção i.v. de KCN (40  $\mu\text{g}$ ) nos ratos com lesão aguda, [F(5, 49) = 0,193;  $p > 0,05$ ] ou crônica da região AV3V [F(5, 42) = 1,099;  $p > 0,05$ ], também não foram diferentes das respostas observadas nos ratos com lesão fictícia, (Figura 21).



**Figura 20:** Alterações da pressão arterial média e frequência cardíaca produzidas pela injeção i.v. de KCN (20  $\mu$ g) em ratos com lesão aguda (1 dia, painéis à esquerda) ou crônica (15 dias, painéis à direita) da região AV3V ou lesão fictícia (controle) pertencentes aos grupos de ratos que receberam injeções de glutamato no NTS (Glu NTS), substância P no NTS (SP NTS) ou glutamato na área RVL (Glu RVL). Os resultados estão expressos como médias  $\pm$  EPM. Entre parênteses está indicado o número de animais.

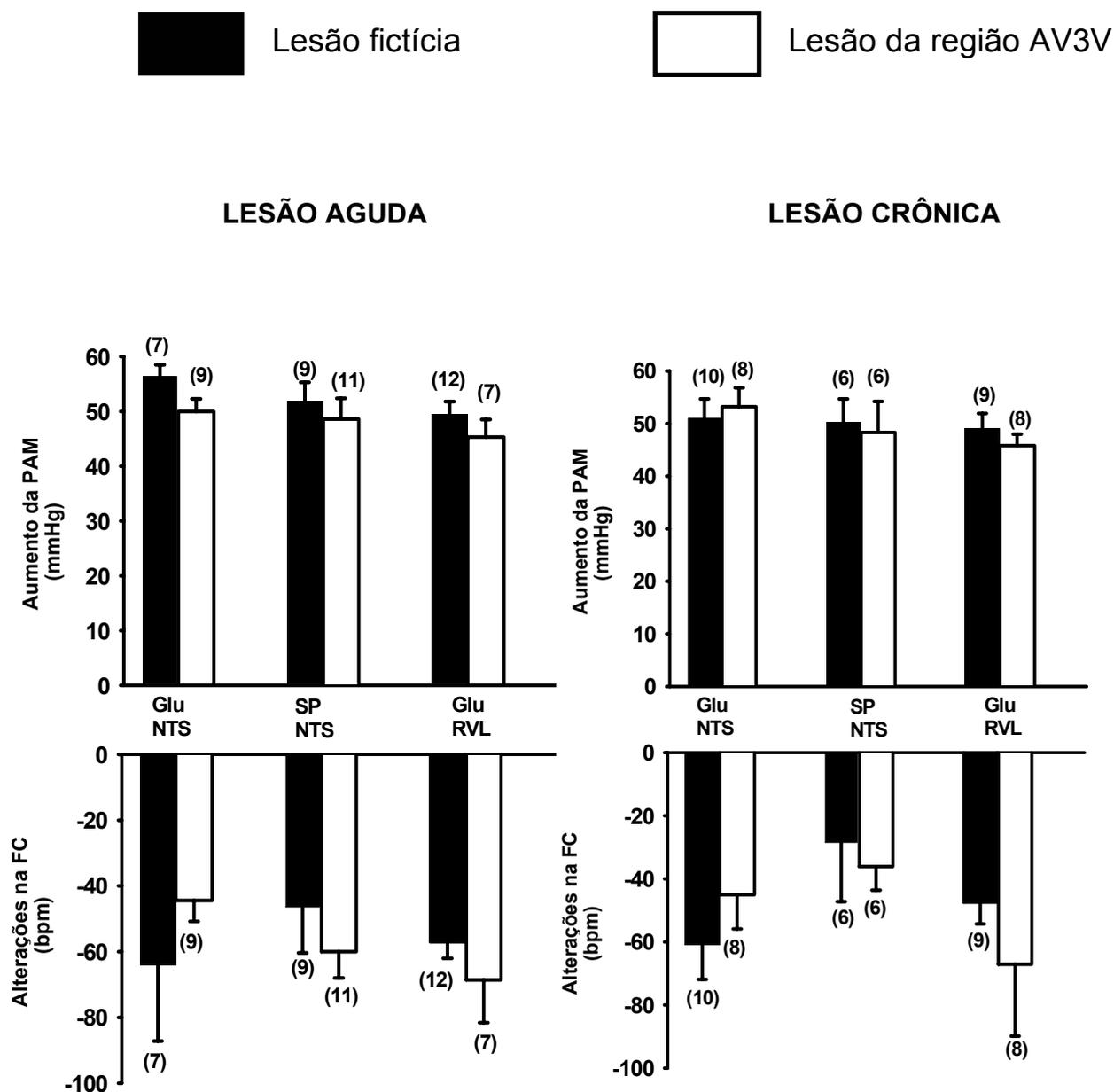


**Figura 21:** Alterações da pressão arterial média e frequência cardíaca produzidas pela injeção i.v. de KCN ( $40 \mu\text{g}$ ) em ratos com lesão aguda (1 dia, painéis à esquerda) ou crônica da região AV3V (15 dias, painéis à direita) ou lesão fictícia (controle) pertencentes aos grupos de ratos que receberam injeções de glutamato no NTS (Glu NTS), substância P no NTS (SP NTS) ou glutamato na área RVL (Glu RVL). Os resultados estão expressos como médias  $\pm$  EPM. Entre parênteses está indicado o número de animais.

## **6- Respostas pressoras e bradicárdicas induzidas pela injeção i.v. de fenilefrina nos ratos com lesão da região AV3V pertencentes aos diferentes grupos estudados.**

As respostas pressoras e bradicárdicas produzidas pela injeção i.v. de fenilefrina (5 µg/kg) foram testadas em todos os ratos que receberam injeções no NTS ou na área RVL e os resultados apresentados pelos diferentes grupos de ratos com lesão aguda (1 dia) ou crônica (15 dias) da região AV3V ou lesão fictícia estão apresentados na Figura 22.

As respostas pressoras produzidas pela injeção i.v. de fenilefrina (5 µg/kg de peso corporal) em ratos com lesão aguda, [F(5, 49) = 1,160; p > 0,05], ou crônica da região AV3V, [F(5, 41) = 0,468; p > 0,05], assim como as respostas bradicárdicas nos ratos com lesão AV3V aguda, [F(5, 49) = 0,632; p > 0,05], ou crônica, [F(5, 41) = 1,012; p > 0,05], não foram diferentes das respostas pressoras e bradicárdicas produzidas pela fenilefrina i.v. nos ratos com lesão fictícia, (Figura 22).

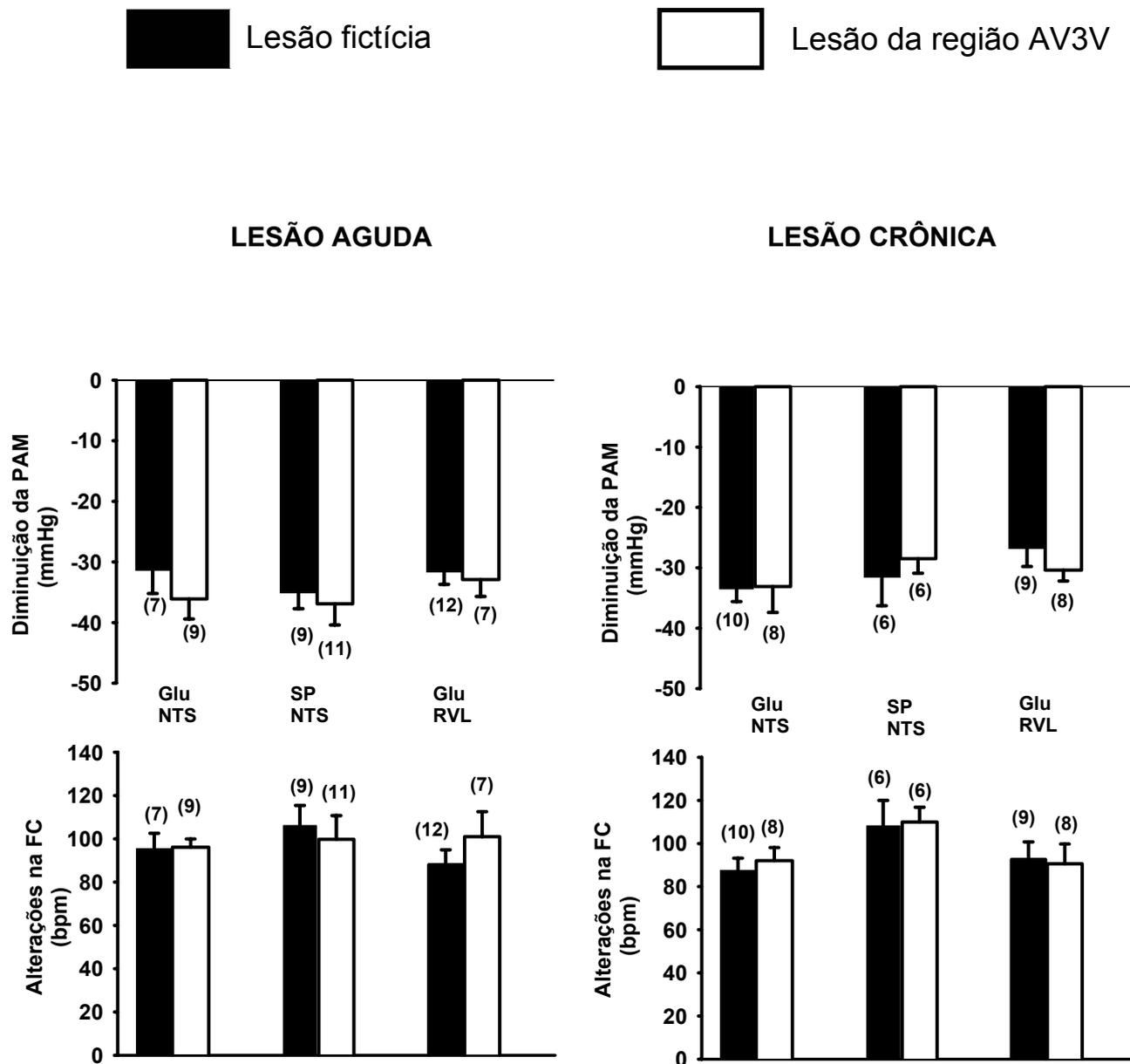


**Figura 22:** Alterações da pressão arterial média e freqüência cardíaca produzidas pela injeção i.v. de fenilefrina ( $5 \mu\text{g}/\text{kg}$  de peso corporal) em ratos com lesão aguda (1 dia, painéis à esquerda) ou crônica da região AV3V (15 dias, painéis à direita) ou lesão fictícia (controle) pertencentes aos grupos de ratos que receberam injeções de glutamato no NTS (Glu NTS), substância P no NTS (SP NTS) ou glutamato na área RVL (Glu RVL). Os resultados estão expressos como médias  $\pm$  EPM. Entre parênteses está indicado o número de animais.

## **7- Respostas hipotensoras e taquicárdicas induzidas pela injeção i.v. de nitroprussiato de sódio nos ratos com lesão da região AV3V pertencentes aos diferentes grupos estudados.**

As respostas hipotensoras e taquicárdicas produzidas pela injeção i.v. de nitroprussiato de sódio (30  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de peso corporal) foram testadas em todos os ratos que receberam injeções no NTS ou na área RVL e os resultados apresentados pelos diferentes grupos de ratos com lesão aguda (1 dia) ou crônica (15 dias) da região AV3V ou lesão fictícia estão apresentados na Figura 23.

As respostas hipotensoras produzidas pela injeção i.v. de nitroprussiato de sódio (30  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de peso corporal) em ratos com lesão aguda, [F(5, 49) = 0,613;  $p > 0,05$ ], ou crônica da região AV3V, [F(5, 41) = 0,767;  $p > 0,05$ ], assim como as respostas taquicárdicas produzidas pelas injeções de nitroprussiato de sódio em ratos com lesão aguda, [F(5, 49) = 0,549;  $p > 0,05$ ] ou crônica da região AV3V, [F(5, 41) = 1,303;  $p > 0,05$ ], na foram diferentes daquelas produzidas pelo nitroprussiato de sódio i.v. nos ratos com lesão fictícia, (Figura 23).



**Figura 23:** Alterações da pressão arterial média e freqüência cardíaca produzidas pela injeção i.v. de nitroprussiato de sódio (30  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de peso corporal) em ratos com lesão aguda (1 dia, painéis à esquerda) ou crônica da região AV3V (15 dias, painéis à direita) ou lesão fictícia (controle) pertencentes aos grupos de ratos que receberam injeções de glutamato no NTS (Glu NTS), substância P no NTS (SP NTS) ou glutamato na área RVL (Glu RVL). Os resultados estão expressos como médias  $\pm$  EPM. Entre parênteses está indicado o número de animais.

## DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo mostram que as respostas pressoras produzidas pela ativação glutamatérgica tanto do núcleo do trato solitário (NTS), quanto da área rostroventro lateral (RVL) do bulbo são prejudicadas em ratos com lesão da região anteroventral do terceiro ventrículo (AV3V), enquanto que a resposta pressora produzida pela injeção de substância P no NTS não é modificada pela lesão da região AV3V. Na verdade, o aumento da pressão arterial produzido pela injeção de glutamato no NTS de ratos não anestesiados é transformada em resposta hipotensora nos ratos com lesão aguda (1 dia) da região AV3V, e abolida nos ratos com lesão crônica (15 dias). A bradicardia que ocorre simultaneamente com o aumento da pressão arterial média (PAM) não é afetada pela lesão aguda ou crônica da região AV3V. Os presentes resultados sugerem o envolvimento de mecanismos dependentes de áreas prosencefálicas, em especial da região AV3V, nas respostas pressoras induzidas pelo glutamato em área bulbares. Por outro lado, as respostas pressoras e taquicárdicas produzidas pela estimulação do NTS com substância P não dependem da integridade da região AV3V, pois as lesões da região AV3V aguda ou crônica não modificaram essas respostas. A substância P é um peptídeo pertencente à classe das taquicininas e diversos estudos tem indicado que essa substância age como neuromodulador (Gatti e cols, 1995; Lawrence e Jarrot, 1996) ou neurotransmissor das aferências dos baro e quimiorreceptores no NTS, podendo ser liberada juntamente com o glutamato (Otsuka e Yoshioka, 1993). Considerando-se os resultados da injeção de glutamato no NTS e na área RVL, não podemos ainda concluir se os efeitos da lesão da região AV3V são específicos para as respostas

pressoras produzidas pelo glutamato no NTS ou na área RVL, mas o fato da lesão da região AV3V não modificar a resposta pressora produzida pela substância P injetada no NTS, mostra que a lesão da região AV3V não afeta de maneira inespecífica as respostas pressoras produzidas por qualquer neurotransmissor injetado nessas áreas bulbares, ou seja, mesmo após a lesão da região AV3V, alguns mecanismos pressores bulbares continuam intactos e respondem normalmente, como é o caso da injeção de substância P no NTS.

O efeito pressor da injeção de glutamato no NTS de ratos não anestesiados foi demonstrado há alguns anos (Machado e Bonagamba, 1992; Colombari e cols, 1994). O fato do glutamato produzir resposta pressora quando injetado no NTS de ratos não anestesiados foi uma surpresa, uma vez que até então o glutamato era considerado o mediador químico liberado pelas aferências dos pressorreceptores no NTS, ou seja, no ponto onde as aferências dos pressorreceptores realizam a primeira sinapse no sistema nervoso central. Esse papel do glutamato como mediador químico das aferências do pressorreceptores era sempre facilmente demonstrado e comprovado quando se observava que a injeção de glutamato no NTS de ratos anestesiados produzia imediatamente hipotensão e bradicardia, ou seja, respostas típicas produzidas pela ativação dos pressorreceptores (Talman e cols, 1980; Ohta e Talman, 1994; Machado e Bonagamba, 1992). Como o glutamato injetado no NTS de ratos não anestesiados produz resposta pressora, começou-se a questionar qual o verdadeiro papel do glutamato no NTS e qual o mecanismo responsável pela resposta pressora produzida pelo glutamato injetado no NTS. Como a resposta produzida pela injeção de glutamato no NTS é semelhante à resposta produzida pela ativação dos quimiorreceptores, uma

possibilidade seria que o efeito da injeção de glutamato no NTS mimetizasse a ativação do quimiorreflexo (Haibara e cols, 1995). Porém, até hoje essa é uma possibilidade que não foi plenamente comprovada. Os resultados do presente estudo indicam que o efeito pressor produzido pelo glutamato injetado no NTS depende da atividade de áreas prosencefálicas ou mais especificamente de uma atividade normal da região AV3V. Na ausência da região AV3V, a injeção de glutamato no NTS de ratos não anestesiados produz hipotensão e bradicardia, ou seja uma resposta similar àquela produzida quando o glutamato é injetado no NTS de ratos anestesiados. Portanto, é possível se pensar que as diferenças nos efeitos do glutamato injetado no NTS de ratos anestesiados e não anestesiados sejam devidas a um possível bloqueio produzido pela anestesia na interação entre áreas prosencefálicas, nesse caso a região AV3V e áreas bulbares.

A região AV3V constituída pelas estruturas periventriculares da porção anterior do terceiro ventrículo, incluindo o órgão vascular da lâmina terminal, núcleo mediano ventral, e as porções periventriculares da área preóptica média, é uma região muito importante para o controle cardiovascular e do equilíbrio hidroeletrólítico (Brody e cols, 1978; Brody e cols, 1984; Brody e Johnson, 1980; Colombari e cols, 1992a; Colombari e cols, 1992b; Johnson, 1985; Menani e cols, 1990). A lesão eletrolítica da região AV3V agudamente produz adipsia (de 5 a 7 dias de duração) em ratos. A mesma lesão abole de maneira permanente as respostas pressora e dipsogênica produzidas pela injeção intracerebroventricular (icv) de angiotensina II (ANG II) ou do agonista colinérgico carbacol. A lesão da região AV3V também reduz ao mesmo tempo a ingestão e a excreção renal de sódio e a secreção de vasopressina (ADH), provocando hipernatremia mesmo

cronicamente (Brody e cols, 1978; Brody e cols, 1984; Brody e Johnson, 1980; Colombari e cols, 1992a; Colombari e cols, 1992b; Johnson, 1985; Menani e cols, 1990). São marcantes também os efeitos da lesão da região AV3V prejudicando o desenvolvimento das mais diversas formas de hipertensão experimental em ratos, com exceção da hipertensão em ratos espontaneamente hipertensos (SHR), (Brody e cols, 1978; Brody e cols, 1984; Brody e Johnson, 1980; Menani e cols, 1988a; Menani e cols, 1988b). Portanto, respostas pressoras de diferentes origens são bloqueadas pela lesão da região AV3V.

À semelhança dos efeitos sobre as respostas pressoras produzidas pela ativação glutamatérgica do NTS, a lesão da região AV3V aguda ou crônica também prejudicou a resposta pressora produzida pela ativação glutamatérgica da área RVL. As injeções de glutamato (1, 5 e 10 nmol) na área RVL produziram aumento dose dependente da PAM sem alterações significativas da FC tanto em animais com lesão da região AV3V como em animais com lesão fictícia, porém as respostas pressoras foram menores nos ratos com lesão da região AV3V. Nos ratos com lesão aguda da região AV3V, a resposta pressora produzida pela dose menor (1 nmol) de glutamato injetado na área RVL foi abolida enquanto que as respostas pressoras produzidas pelas doses de (5 e 10 nmol) injetadas na área RVL foram apenas reduzidas.

A lesão crônica da região AV3V também produziu significativa redução nas respostas pressoras produzidas pela injeção de glutamato na área RVL. Essa redução na resposta pressora ocorreu com todas as doses de glutamato estudadas (1, 5 e 10 nmol). É importante se observar que a resposta pressora produzida pela dose menor (1 nmol) de glutamato injetada na área RVL foi abolida

nos ratos com lesão da região AV3V aguda, enquanto que nos ratos com lesão crônica, a resposta pressora com a mesma dose de glutamato na área RVL foi apenas reduzida. Não apenas para a dose de 1 nmol de glutamato, mas também para as outras doses, de uma maneira geral a redução da resposta pressora do glutamato é mais intensa nos ratos com lesão da região AV3V aguda do que nos ratos com lesão crônica. Assim, enquanto as respostas pressoras produzidas pelo glutamato na área RVL nos ratos com lesão aguda da região AV3V são em média 20 mmHg menores do que aquelas dos ratos com lesão fictícia, nos ratos com lesão crônica a diferença entre as respostas pressoras dos ratos lesados e as respostas dos ratos com lesão fictícia é em torno de 10 mmHg. Isso indica uma tendência à recuperação das respostas pressoras do glutamato na área RVL à medida que a lesão vai se tornando mais crônica. Algo parecido também ocorre com as injeções de glutamato no NTS, ou seja, enquanto nos ratos com lesão aguda da região AV3V a injeção de glutamato no NTS produz hipotensão, nos ratos com lesão crônica o glutamato no NTS não produz nem hipotensão e nem hipertensão. No caso da injeção de glutamato no NTS, a ausência de resposta nos ratos com lesão crônica pode ser interpretado como uma recuperação parcial dos mecanismos pressores que nesses ratos já estariam neutralizando os mecanismos hipotensores que aparentemente seriam os mais ativados pelo glutamato no NTS nos ratos com lesão aguda, mas não nos ratos com lesão crônica. De qualquer maneira, a resposta pressora do glutamato injetado na área RVL continua atenuada em ratos com lesão crônica da região AV3V. Já foi descrito que algumas funções podem ser prejudicadas em ratos com lesão aguda da região AV3V, mas se recuperam em ratos com lesão crônica da região AV3V

como mostrado em estudos de ingestão de água e salivação (Brody e Johnson, 1980; Renzi e cols, 1993). Cronicamente, a recuperação de uma função prejudicada imediatamente após a lesão de uma área cerebral é possível devido à plasticidade cerebral e pode depender de alguma outra área assumir as funções da área lesada. No caso da ingestão de água e do aumento da excreção urinária de sódio e potássio ocorre recuperação quando a estimulação colinérgica é feita na área pré-óptica lateral, indicando que áreas mais laterais poderiam assumir a função de uma área medial como a região AV3V (Gonçalves e cols, 1992).

A lesão da região AV3V aguda ou cronicamente não modificou a PAM basal, enquanto que a FC basal aumentou somente no grupo de ratos com lesão da região AV3V aguda com cânula na área RVL, mas não naqueles com cânula no NTS. Taquicardia nos primeiros dias após a lesão da região AV3V e um pequeno aumento da PAM basal no primeiro dia após a lesão já foi relatada em trabalhos anteriores (Menani e cols, 1988b). As diferenças entre os presentes resultados e aqueles de trabalhos anteriores provavelmente se devem a diferenças na extensão da lesão. A lesão da região AV3V é heterogênea envolvendo diferentes núcleos que podem ser lesados em maior ou menor extensão dependendo do eletrodo ou da corrente elétrica utilizada e também do tempo de aplicação da corrente. Uma pequena redução da extensão da lesão, geralmente difícil de ser controlada ou quantificada, pode ser suficiente para reduzir os efeitos da lesão da região AV3V sobre a PAM e FC basais.

O tônus vasomotor simpático é gerado e mantido por neurônios localizados na área RVL (Guertzenstein e Silver, 1974; Guyenet e cols, 1990; Morrison e Reis, 1991; Chalmers e Pilowsky, 1991). É nessa região que se origina o tônus

simpático e quando a área RVL é ativada há aumento na resistência dos leitos vasculares periféricos e na pressão arterial (Campos e McAllen, 1999; De Paula e Machado, 2001). Por outro lado, a região AV3V tem se mostrado importante para a regulação cardiovascular em especial para as respostas cardiovasculares dependentes de ativação simpática como são as respostas produzidas pelas injeções centrais de ANG II ou do agonista colinérgico carbacol, (Brody e cols, 1978; Brody e cols, 1984; Brody e Johnson, 1980; Johnson, 1985; Johnson e cols, 1978; Johnson e Loewy, 1990; Menani e cols, 1988a; Menani e cols, 1988b; Menani e cols, 1990; Valladão e cols, 1992). Enquanto nos estudos anteriores se mostrava que a região AV3V é importante para os efeitos cardiovasculares que envolviam ativação simpática e secreção de ADH a partir da estimulação de áreas prosencefálicas (Colombari e cols, 1992a; Colombari e cols, 1992b; Menani e cols, 1988a; Valladão e cols, 1992), no presente estudo a região AV3V se mostra importante para as respostas pressoras dependentes de ativação simpática que são produzidas pela estimulação glutamatérgica de áreas bulbares como o NTS e área RVL. Outra resposta pressora dependente de vias glutamatérgicas que é abolida com a lesão da região AV3V é a resposta pressora provocada pela estimulação sistêmica com análogos do receptor NMDA (Whalen e cols, 1999).

A lesão da região AV3V não modificou as respostas barorreflexas produzidas pelas injeções endovenosas do agonista  $\alpha_1$ -adrenérgico fenilefrina e do doador de óxido nítrico nitroprussiato de sódio, bem como das respostas pressoras e bradicárdicas produzidas pelas injeções do bloqueador da cadeia respiratória cianeto de potássio (KCN) i.v. A ausência de efeito da lesão da região

AV3V na resposta barorreflexa já foi demonstrado em um trabalho anterior (Bealer, 1995), enquanto outro estudo demonstrou modificação na sensibilidade do barorreflexo em ratos com 56 dias de lesão da região AV3V, (Lewis e cols, 1999). O fato da lesão da região AV3V no período estudado não modificar as respostas barorreflexas é uma evidência de que os mecanismos reflexos cardiovasculares estão intactos nos ratos com lesão da região AV3V, e dessa maneira, é pouco provável que os efeitos da lesão da região AV3V nas respostas do glutamato se devam a modificações na atividade dos reflexos cardiovasculares. Além disso, a lesão da região AV3V atenuou a resposta do glutamato no NTS e na área RVL, mas não da substância P no NTS. Se a redução das respostas do glutamato dependesse de uma modificação dos reflexos cardiovasculares deveriam ser influenciados de forma inespecífica todas as respostas pressoras, e não apenas algumas. Deve ser lembrado que nos animais com cânulas no NTS e que receberam injeções de substância P, os reflexos foram testados antes das injeções centrais, pois a injeção de substância P tem como características possuir longa duração (aproximadamente 25 minutos, com seu pico máximo entre 3 e 5 minutos), e como foram testadas 2 doses de substância P (0,5 e 1 nmol), a PAM de alguns ratos após a dose de (1 nmol) permanecia em níveis basais altos, dificultando o aparecimento de respostas reflexas confiáveis. Diferentemente no grupo de ratos que receberam injeções de glutamato no NTS ou na área RVL, o baro e o quimiorreflexo foram testados 15 minutos após as injeções centrais, pois a resposta pressora que ocorre é rápida (aproximadamente 15 segundos no NTS e 1 minuto e meio na área RVL, tendo seu pico máximo aos 40 segundos), e os níveis basais da PAM não se alteram.

O NTS é a primeira estação sináptica dos pressos e quimiorreceptores periféricos. Quando liberado pelas aferências de baro ou quimiorreceptores dentro do NTS, o glutamato respectivamente inibe ou facilita a atividade simpática e o resultado final é o efeito oposto na pressão arterial. Diferente da ativação dos pressos ou quimiorreceptores periféricamente, o glutamato pode ativar os mecanismos de baro ou quimiorreceptores simultaneamente. Em se tratando do quimiorreflexo, o KCN é uma substância que serve como uma ferramenta confiável e aceita para a ativação dos quimiorreceptores periféricos (Barros e cols, 2002). Com a ativação dos quimiorreceptores pela injeção i.v. de KCN duas vias distintas são ativadas, uma simpato-excitatória produzindo resposta pressora e uma parassimpato-excitatória produzindo bradicardia (Machado, 2001; Franchini e Krieger, 1992; Haibara e cols, 1995). Uma questão que surgiu com o presente estudo é sobre a participação do glutamato como neurotransmissor das aferências simpato-excitatória do quimiorreflexo no NTS. É difícil se entender como as respostas pressoras do glutamato injetado no NTS são abolidas e as respostas da injeção na área RVL são atenuadas pela lesão da região AV3V enquanto que nos mesmos ratos, a lesão da região AV3V não modifica a resposta da ativação do quimiorreflexo, que em última análise liberaria glutamato tanto no NTS quanto na área RVL (Guyenet, 1990; Vardhan e cols, 1993; Zhang e Mifflin, 1993; Ciriello e cols, 1994; Colombari e cols, 1994; Haibara e cols, 1995) para produzir resposta pressora. Uma sugestão é que o glutamato poderia não atuar como o único neurotransmissor liberado pelas aferências do quimiorreflexo, tanto no NTS, quanto na área RVL. Outra sugestão é que o mecanismo simpato-excitatório ativado pelo glutamato injetado no NTS ou na área RVL não seria o mesmo

ativado pelo quimiorreflexo, pois se assim fosse não somente a injeção de glutamato no NTS e na área RVL seria modificada, mas também a resposta pressora resultante da ativação do quimiorreflexo com KCN i.v. A injeção de glutamato no NTS e na área RVL poderia estar atingindo uma população de neurônios muito maior do que aquela que a liberação endógena dos terminais glutamatérgicos dos neurônios ativados pelo quimiorreflexo estaria atingindo, mas não há boas razões para se acreditar que a população de neurônios ativados pelo glutamato exógeno não incluiria aqueles ativados pelo quimiorreflexo. Por outro lado, o fato da lesão da região AV3V não interferir na resposta pressora produzida pela substância P no NTS mostra que algumas vias pressoras bulbares estão respondendo de forma normal nos ratos com lesão da região AV3V, e isso permitiria que algumas respostas pressoras aparecessem normalmente, como é o caso do quimiorreflexo. Além disso, é preciso lembrar que a injeção de DL-2-amino-5-phosphonovaleric acid (AP-5), um seletivo antagonista de receptor NMDA no NTS de ratos não anestesiados somente consegue bloquear o componente bradicárdico, mas não o componente pressor do quimiorreflexo ativado com KCN i.v. (Haibara e cols, 1995).

Os efeitos da lesão da região AV3V reduzindo ou abolindo respostas pressoras de diversas origens e prejudicando o desenvolvimento de diversas formas de hipertensão coloca essa área como uma importante área integradora e com um papel importante para respostas cardiovasculares, em especial respostas hipertensoras. O circuito bulbar do qual fazem parte o NTS e o bulbo ventrolateral é fundamental para a regulação cardiovascular, mas a resposta final como estão mostrando os presentes resultados pode depender da participação de um circuito

central muito mais complexo onde áreas prosencefálicas podem definir como será a resposta à estimulação de uma determinada área bulbar. Conexões da região AV3V com áreas bulbares, em particular com o NTS, tem sido demonstradas usando marcadores de vias neuronais (Knuepfer e cols, 1984a; Knuepfer e cols, 1984b; Calaresu e Ciriello, 1980; Knuepfer e cols, 1985; Ricardo e Koh, 1978). As evidências funcionais dessas interações são mais escassas. Com os presentes resultados, fica claro que respostas produzidas pela estimulação de uma área bulbar podem ser influenciadas pela atividade de áreas prosencefálicas. É possível se pensar que quando injetado no NTS, o glutamato poderia estar ativando a via simpato-inibitória para a área caudoventro lateral (CVL) do bulbo, mas por outro lado, também estaria ativando 2 vias simpato-excitatórias, uma via que se projeta diretamente para a área RVL, e outra que ativaria neurônios pertencentes a região AV3V, ativando uma via simpato-excitatória hipotalâmica. Nesse jogo de inibição e excitação, as vias simpato-excitatórias prevaleceriam em animais não anestesiados e intactos. Porém, em animais com lesão da região AV3V ou mesmo animais anestesiados a via simpato-excitatória hipotalâmica não estaria funcionando e as inibitórias prevaleceriam. Outra possibilidade seria as áreas prosencefálicas como a região AV3V exercerem uma influência tônica sobre áreas bulbares ou no caso específico o NTS e a área RVL modulando as possíveis respostas de neurônios dessas áreas ao glutamato. Assim, dependendo de como estão as despolarizações ou as influências da região AV3V sobre determinados neurônios do NTS ou da área RVL, eles poderão responder mais ou menos facilmente à ação do glutamato ou até mesmo não responder à ação do glutamato e o resultado final são modificações nos efeitos produzidos pelo

glutamato. É preciso lembrar, porém, que os presentes resultados não são os primeiros a mostrar que a lesão da região AV3V pode reduzir respostas pressoras produzidas pela ativação de áreas cerebrais caudais à região AV3V, pois já foi demonstrado que a lesão da região AV3V reduz respostas pressoras produzidas pela estimulação colinérgica do núcleo ventromediano do hipotálamo (Valladão e cols, 1992). Também nesse caso das respostas devidas à estimulação colinérgica do núcleo ventromediano do hipotálamo, as alterações produzidas pela lesão da região AV3V podem ser explicadas por qualquer uma das hipóteses levantadas para se explicar os efeitos da lesão da região AV3V nas respostas cardiovasculares do glutamato injetado no NTS.

A estimulação elétrica dos neurônios pertencentes à região AV3V causa intensa queda no fluxo sanguíneo nos leitos renais e mesentérico, refletindo uma vasoconstrição dependente de atividade simpática, sendo esta abolida pela administração do bloqueador ganglionar hexametônio (Brody e Johnson, 1980) ou mesmo pela ablação cirúrgica da região AV3V (Fink e cols, 1978). Os presentes resultados mostram que a lesão da região AV3V reduz respostas pressoras que dependem da ativação simpática, porém produzidas pela ativação de áreas bulbares, o NTS e a área RVL que comanda diretamente os neurônios pré-ganglionares simpáticos. Recentes observações de nosso laboratório mostraram que a resposta pressora do glutamato injetado na área RVL foi abolida pela injeção sistêmica do antagonista  $\alpha_1$  adrenérgico prazosin, mas não pelo antagonista de receptores  $V_1$  de ADH mostrando mais uma vez que o glutamato ativa os neurônios pré-ganglionares simpáticos e essa ativação é o principal fator

responsável pela resposta pressora observada (Sun, 1995; Willette e cols, 1983). Os sinais produzidos pelo glutamato atuando em áreas bulbares também poderiam ascender à região AV3V que por sua vez modularia a atividade simpática através de suas conexões com estruturas bulbares e também ativando estruturas hipotalâmicas como o (NPV) e pontinas como o núcleo parabraquial lateral (NPBL), ambas estruturas que tem participação em respostas cardiovasculares. O NPV pode participar da ativação simpática tanto ativando os neurônios da área RVL (Yang e Coote, 1998; Pyner e Coote, 1997), bem como os neurônios motores simpáticos da coluna intermédio lateral (IML), (Pyner e Coote, 1997). Dados da literatura (Agarwal e Calaresu, 1993) mostraram também que a estimulação química com glutamato nos neurônios do NPBL provoca excitação dos neurônios barosensíveis da área RVL. Desta forma, a lesão da região AV3V retiraria forte projeção excitatória direcionada para estas outras duas regiões responsáveis pela atividade simpática (NPV e NPBL). Evidências indicam que o NPBL é um importante sítio dentro da rede neural relacionada ao controle cardiovascular, podendo enviar e receber projeções de áreas envolvidas com o controle do equilíbrio hidroeletrólítico (Ohman e Johnson, 1986; Ohman e Johnson, 1989, Jhamandas e cols, 1992). O envolvimento de mecanismos colinérgicos (Wang e cols, 2001) e angiotensinérgicos (Dampney e cols, 2002) na atividade dos neurônios da área RVL já foi observado, bem como interações entre mecanismos colinérgicos e glutamatérgicos nessa mesma área (Kubo e cols, 2000). Assim, como a lesão da região AV3V prejudica respostas pressoras produzidas por ativação colinérgica e angiotensinérgica central (Menani e cols, 1990) talvez os efeitos da lesão da região AV3V sobre os mecanismos

colinérgicos e angiotensinérgicos centrais pudessem prejudicar a resposta do glutamato na área RVL. Além de prejudicar mecanismos facilitadores de respostas pressoras é preciso considerar que a lesão da região AV3V também poderia facilitar o aparecimento de respostas inibitórias possivelmente gabaérgicas que poderiam modificar a atividade da área RVL. Dampney e cols, (2003) discutem a possibilidade dos neurônios da área RVL terem sua atividade ajustada por meio de entradas neuronais tanto excitatórias quanto inibitórias. A área RVL pode ser inibida por neurônios da área CVL ativados pelo barorreflexo, mas também por neurônios do CVL não dependentes do barorreflexo (Cravo e cols, 1991). A origem da ativação dos neurônios não dependentes de barorreflexo ainda não é conhecida. Uma possibilidade seria que nas situações em que região AV3V estivesse com menor atividade ou mesmo quando lesada ocorresse uma maior ativação de neurônios inibitórios do CVL. Uma dificuldade para se justificar a maior ativação de mecanismos inibitórios em animais com lesão da região AV3V deve-se ao fato de não ocorrer redução da pressão arterial basal nesses animais. A diminuição de aferências facilitatórias para a área RVL dificultando a ativação simpática e aumentos de pressão arterial poderiam ocorrer se a lesão da região AV3V prejudicasse a função de áreas que enviam informações facilitatórias para o RVL como o NPBL, o NPV ou mesmo o NTS (Agarwal e Calaresu, 1993; Haibara e cols, 2002; Kubo e cols, 2000; Machado, 2001). O fato da lesão da região AV3V modificar os efeitos do glutamato injetado na área RVL pode sugerir novas interpretações para os efeitos da lesão da região AV3V sobre muitas das respostas pressoras observadas, e também na atenuação de quadros de hipertensão experimental. Além da destruição de sítios onde se localizam

receptores colinérgicos e angiotensinérgicos centralmente, a lesão da região AV3V poderia modificar as respostas produzidas pela ativação de áreas prosencefálicas e bulbares (presentes resultados) prejudicando os mecanismos pressores da área RVL.

## REFEFÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDALA, A. P. L., HAIBARA, A. S., COLOMBARI, E. Cardiovascular effects to substance P in the nucleus tractus solitarii: microinjection study in conscious rats. **Am. J. Physiol. (Heart Circ. Physiol.)**, 285(2):H891-898, 2003.
- AGARWAL, S.K., CALARESU, F.R. Supramedullary inputs to cardiovascular neurons of rostral ventro-lateral in rats. **Am. J. Physiol. (Regulatory Integrative Comp. Physiol.)**, 34:R111-R116, 1993.
- ARMSTRONG, D.M., PICKEL, V.M., JOH, T.H., REIS, D.J., MILLER, R.J. Immunocytochemical localization of catecholamine synthesizing enzymes and neuropeptides in area postrema and medial nucleus tractus solitarius of rat brain. **J. Comp. Neurol.**, 196:505-517, 1981.
- BARROS, R.C.H., BONAGAMBA, L.G.H., OKAMOTO-CANESIN, R., DE OLIVEIRA, M., BRANCO, L.G.S., MACHADO, B.H. Cardiovascular responses to chemoreflex activation with potassium cyanide or hypoxic hypoxia in awake rats. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**, 97:110-115, 2002.
- BEALER, S.L. Preoptic recess ablation selectively increases baroreflex sensitivity to angiotensin II in conscious rats. **Peptides**, 16:1197-1201, 1995.
- BEDRAN DE CASTRO, M.T., MOREIRA, E.D., KRIEGER, E.M. Reflex and central components of carotid occlusion in conscious rats. Effect of lesion of the medial forebrain bundle. **Hypertension**, 8 (Suppl. I): I-47 - I-51, 1986.
- BEDRAN-DE-CASTRO, M.T., BEDRAN-DE-CASTRO, J., MENANI, J.V. The effects of forebrain multiple lesions on the pressor response induced by bilateral carotid occlusion in conscious rats. **Brain Res.**, 612:243-246, 1993.

- BLESSING, W.W., GOODCHILD, A.K., DAMPNEY, R.A., 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.
- BRODY, M.J., FINK, G.D., BUGGY, T., HAYWOOD, J.R., GORDON, F.J., JOHNSON, A.K. The role of the anteroventral third ventricle (AV3V) region in experimental hypertension. **Circ. Res.**, 43:1-13, 1978.
- BRODY, M.J., JOHNSON, A.K. Role of the anteroventral third ventricle region in fluid and electrolyte balance, arterial pressure regulation and hypertension. In: **Frontiers in Neuroendocrinology**, edited by Martini, L. and Ganong, W.F. New York: Raven Press, p. 249-292, 1980.
- BRODY, M.J., FABER, J.E., MANGIAPANE, M.L., 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, p. 474-494, 1984.
- BROWN, D.L., GUYENET, P.G. Cardiovascular neurons of brainstem with projections to spinal cord. **Am. J. Physiol.**, 247:R1009-R1016, 1984.
- CALARESU, F.R., CIRIELLO, J. Projections to the hypothalamus from buffer nerves and nucleus tractus solitarius in the cat. **Am. J. Physiol.**, 239:R130-R136, 1980.
- CAMPOS, R.R., McALLEN, R.M. Cardiac inotropic, chronotropic, and dromotropic actions of subretrofacial neurons of cat RVLM. **Am. J. Physiol.**, 276:R1102-R1111, 1999.

- CHALMERS, J., PILOWSKY, P. Brainstem and bulbospinal neurotransmitter systems in the control of blood pressure. **J. Hyperten.**, 9:675-694, 1991.
- CHAN, J.H.Y., TSOU, M.-Y.W., LEN, B., LEE, T.-Y., CHAN, S.H.H. Participation of noradrenergic neurotransmission in the enhancement of baroreceptor reflex response by substance P at the nucleus tractus solitarii of the rat: a reverse microdialysis study. **J. Neurochem.**, 64:2644-2652, 1995.
- CIRIELLO, J., HOCHSTENBAH, S.L., 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.
- COLOMBARI, D.S.A., SAAD, W.A., CAMARGO, L.A.A., RENZI, A., De LUCA Jr., L.A., COLOMBARI, E., MENANI, J.V. AV3V lesion impairs responses induced by cholinergic activation of SFO in rats. **Am. J. Physiol.**, 263:R1277-R1283, 1992a.
- COLOMBARI, D.S.A., SAAD, W.A., CAMARGO, L.A.A., RENZI, A., DE LUCA Jr. L.A., 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.
- COLOMBARI, E., BONAGAMBA, L.G.H., MACHADO, B.H. Mechanisms of pressor and bradycardic responses to L-glutamate microinjected into the NTS of conscious rats. **Am. J. Physiol.**, 266:R730-R738, 1994.
- COLOMBARI, E., MENANI, J.V., TALMAN, W.T. Commissural NTS contributes to pressor responses to glutamate injected into the medial NTS of awake rats, **Am. J. Physiol.**, 270:R1220-R1225, 1996.

- COTTLE, M. Degeneration studies of primary afferents of XIth and Xth cranial nerves in the cat. **J. Comp. Neurol.**, 122:329-345, 1964.
- CRAVO, S.L., MORRION, S.F., REIS, D.J. Differentiation of two cardiovascular regions within caudal ventro-lateral medulla. **Am. J. Physiol. (Regulatory Integrative Comp. Physiol.)**, 261(30):R985-R994, 1991.
- DAMPNEY, R.A., FONTES M.A., HIROOKA, Y., HORIUSHI, J., POTTS, P.D., 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.
- DAMPNEY, R.A.L., HORIUCHI, J., TAGAWA, T., FONTES, M.A.P., POTTS, D., POISON, J.W. Medullary and supramedullary mechanisms regulating sympathetic vasomotor tone. **Acta Physiol Scand.**, 177:209-218, 2003.
- DE PAULA, P.M., 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.
- FINK, G.D., BUGGY, J., HAYWOOD, J.R., JOHNSON, A.K., 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.
- FRANCHINI, K.G., KRIEGER, E.M. Cardiovascular responses of conscious rats to carotid body chemoreceptor stimulation by intravenous KCN. **J. Auton. Nerv. Syst.**, 42:63-70, 1992.

- GATTI, P.J., SHIRAHATA, M., JOHNSON, T.A., MASSARI, V.J. Synaptic interactions of substance P immunoreactive nerve terminals in baro- and chemoreceptor reflexes of the cat. **Brain Res.**, 693:133-147, 1995.
- GILLIS, R.A., HELKE, B.L., HAMILTON, B.L., NORMAN, W.P., JACOBOWITZ, D.M. Evidence that substance P is a neurotransmitter of baro- and chemoreceptor afferents in nucleus tractus solitarius. **Brain Res.**, 181:476-481, 1980.
- GONÇALVES, P.C., ALVES, M.B., SILVEIRA, J.E., SAAD, W.A., CAMARGO, L.A., RENZI, A., DE LUCA Jr., LA., 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):173-7, 1992.
- GORDON, F.J., 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.
- GRANATA, A. R., WOODRUFF, G.N. A central hypertensive action of substance P in rats. **IRCS Medical Science**, 8:205, 1980.
- GUERTZEINSTEIN, P.G., 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.
- 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.

GUYENET, P.G., KOSHIYA, N. Respiratory-sympathetic integration in the medulla oblongata. In: G.Kunos, J. Ciriello (Eds). **Central Neural Mechanisms in Cardiovascular Regulation**, Birkhauser, Boston, pp.226-247, 1992.

HAIBARA, A.S., COLOMBARI, E., CHIANCA JR, D.A., BONAGAMBA, L.G.H., MACHADO, B.H. NMDA receptors in NTS are involved in bradycardic but not in pressor response of chemoreflex. **Am. J. Physiol.**, 269:H1421-H1427, 1995.

HAIBARA, A.S., TAMASHIRO, E., OLIVAN, M.V., BONAGAMBA, L.G.H., MACHADO, B.H. Involvement of the parabrachial nucleus in the pressor response to chemoreflex activation in awake rats. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**, 101:60-67, 2002.

HELKE, C.J., SHULTS, C.W., CHASE, T.N., O'DONOHUE, T.L. Autoradiographic localization of substance P receptors in rat medulla: effect of vagotomy and nodose ganglionectomy. **Neuroscience**, 12:215-223, 1984.

HEPPENSTALL, P.A., FLEETMOOD-WALKER, S.M. The glycine site of the NMDA receptor contributes to neurokinin 1 receptor agonist facilitation of NMDA receptor agonist-evoked activity in rat dorsal horn neurons. **Brain Res.**, 744:235-245, 1997.

JHAMANDAS, J.H., RENAUD, L.P. Diagonal band neurons may mediate arterial baroreceptor input to hypothalamic vasopressin-secreting neurons. **Neurosc. Lett.**, 65:214-218, 1986.

JHAMANDAS, J.H., HARRIS, K.H., PETROV, V.U., KRUKOFF, T.L. Characterization of the parabrachial nucleus input to the hypothalamic paraventricular nucleus in the rat. **J. Endocrinol.**, 4:461-471, 1992.

- JOHNSON, A.K. The periventricular anteroventral third ventricle (AV3V): its relationship with the subfornical organ and neural system involved in maintaining body fluid homeostasis. **Brain Res. Bull.**, 15:595-601, 1985.
- JOHNSON, A.K., LOEWY, A.D. Circumventricular organs and their role in visceral functions. In: A.D. Loewy and K.M. Spyer (Eds.), **Central Regulation of Autonomic Function**. New York, Oxford University Press, pp. 247-267, 1990.
- KNUEPFER, M.M., JOHNSON, A.K., BRODY, M.J. Vasomotor projections from the anteroventral third ventricle (AV3V) region. **Am. J. Physiol.**, 247:H139-H145, 1984a.
- KNUEPFER, M.M., JOHNSON, A.K., BRODY, M.J. Identification of brainstem projections mediating hemodynamic responses to stimulation of the anteroventral third ventricle (AV3V) region. **Brain Res.**, 294:305-314, 1984b.
- KNUEPFER, M.M., GEBHART, G.F., BRODY, M.J. Effects of baroreceptor activation on single unit activity of the anteroventral third ventricle region of the rat, **Neurosc.Lett.**, 56:79-85, 1985.
- KUBO, T., HAGIWARA, Y., KEKIYA, D., CHIBA, S., KUKUMORI, R. Cholinergic inputs to rostral ventrolateral medulla pressor neurons from hypothalamus. **Brain Res. Bull.**, 53(3): 275-282, 2000.
- LAWRENCE, J.A., JARROT, B. Neurochemical modulation of cardiovascular control in the nucleus tractus solitarius. **Prog.Neurobiol.**, 48:21-53, 1996.
- LEWIS, S.J., WHALEN, E.J., BELTZ, T.G., JOHNSON, A.K. Effects of chronic lesions of the anteroventral third ventricle region on baroreceptor reflex function in conscious rats. **Brain Res.**, 835: 330-333, 1999.

- LINDEFORS, N., YAMAMOTO, Y., PANTALEO, T., LAGERCRANTZ, H., BRODIN, E., UNGERSTEDT, U. *In vivo* release of substance P in the nucleus tractus solitarii increases during hypoxia. **Neurosc. Lett.**, 69:94-97, 1986.
- LIU, X., ANDRÉ, D., PUIZILLOUT, J.J. Substance P post-synaptically potentiates glutamate-induced currents in dorsal vagal neurons. **Brain Res.**, 804:95-104, 1998.
- LONG, Q., MCQUEENEY, A.J., BARNES, K.L. Presynaptic or postsynaptic location of receptors for angiotensin II and substance P in the medial solitary tract nucleus. **Journal of Neurophysiology**, 75(6):2220-2228, 1996.
- LOPES, O.U., CIPOLA NETO, J., ROCHA E SILVA, M. Jr. Hypothalamus component in pressor response to carotid occlusion in the rat. **Am. J. Physiol.**, 233:H240-H247, 1977.
- LOPES, O.U., TIMO-LARIA, C., LEITÃO FILHO, H.A.P. Suppression of the late component of the carotid occlusion reflex by lesion of the medial forebrain bundle in the rat. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, 14:37-41, 1981.
- MACHADO, B.H., 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.
- 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.
- MARTINS-PINGE, M.C., ARAÚJO, G.C., LOPES, O.U. Nitric Oxide-dependent guanylyl cyclase participates in the glutamatergic neurotransmission within the rostral ventrolateral medulla of awake rats. **Hypertension**, 34(part 2):748-751, 1999.

- MENANI, J.V., BEDRAN DE CASTRO, M.T., KRIEGER, E.M. Influence of the anteroventral third ventricle region and sinoaortic denervation on the pressor response to carotid occlusion. **Hypertension**, 11: I-178 – I-181, 1988a.
- MENANI, J.V., MACHADO, B.H., KRIEGER, E.M., 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.
- MENANI, J.V., SAAD, W.A., CAMARGO, L.A.A., RENZI, A., De LUCA Jr., L.A., COLOMBARI, E. The anteroventral third ventricle (AV3V) region is essential for pressor, dipsogenic and natriuretic responses to central carbacol. **Neurosc.Lett.**, 113: 339-344, 1990.
- MIURA, M., TAKAYAMA, K., OKADA, J. Study of possible transmitter in the solitary tract nucleus of the cat involved in the carotid sinus baro-and chemoreceptor reflexes. **Am. Auton. Nerv. Syst.**, 19:179-188, 1987.
- MORILAK, D.A., MORRIS, M., CHALMERS, J. Release of substance P in the nucleus tractus solitarii measured by *in vivo* microdialysis: response to stimulation of the aortic depressor nerves in rabbit. **Neurosc. Lett.**, 94:131-137, 1988.
- MORRISON, S.F., MILNER, T.A., REIS, D.J. Reticulospinal vasomotor neurons of the rat rostral ventro-lateral medulla: relationship to sympathetic nerve activity and C1 adrenergic cell group. **J. Neurosc.**, 8(4):1286-1301, 1988.
- MORRINSON, S.F., REIS, D.J. Responses of sympathetic preganglionic neurons to rostral ventrolateral medullary stimulation. **Am. J. Physiol.**, 261:R1247-R1256, 1991.

NIJKAMP, F.P., DE JONG, W. Alpha-methylnoradrenaline induced hypotension and bradycardia after administration into the area of the nucleus tractus solitarii. **Eur. J. Pharmacol.**, 32(2):361-364, 1975.

OLIVAN, M.V., BONAGAMBA, L.G.H., 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.

OHTA, H., TALMAN, W.T. Both NMDA and non-NMDA receptors participate in the baroreceptor reflex in rats. **Am. J. Physiol.**, 267:R1065-R1070, 1994.

OHMAN, L.E., JOHNSON, A.K. Lesions in the lateral parabrachial nucleus enhance drinking to angiotensin II and isoproterenol. **Am. J. Physiol.**, 251:R504-R509, 1986.

OHMAN, L.E., JOHNSON, A.K. Brainstem mechanisms and the inhibition of angiotensin-induced drinking. **Am. J. Physiol.**, 256:R264-R269, 1989.

OTSUKA, M., YOSHIOKA, K. Neurotransmitter functions of mammalian tachykinins. **Physiol. Ver.**, 73:229-308, 1993.

PALKOVITS, M., 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.

PALKOVITS, M., JACOBOWITZ, D.M. Topographic atlas of catecholamine and acetylcholinesterase-containing neurons in the rat brain. II. Hindbrain (mesencephalon, rhombencephalon). **J. Comp. Neurol.**, 157(1):29-42, 1974.

PERRONE, M.H. Biochemical evidence that L-glutamate is a neurotransmitter of primary vagal afferent nerve fibers. **Brain Res.**, 230(1-2):283-293, 1981.

- PYNER, S., COOTE, J.H. The organization of the PVN projection to the RVLM and sympathetic preganglionic neurons in the spinal cord of rats. **J. Physiol.**, 501:82-83, 1997.
- RENZI, A., COLOMBARI, E., MATTOS FILHO, T.R., SILVEIRA, J.E.N., SAAD, W.A., CAMARGO, L.A.A., De LUCA Jr., L.A., DERÓBIO, J.G., MENANI, J.V. Involvement of the central nervous system in the salivary secretion induced by pilocarpine in rats. **J. Dental Res.**, 72:1481-1484, 1993.
- RICARDO, J.A., KOH, E.T. Anatomical evidence of direct projections from the nucleus of the solitary tract to the hypothalamus, amygdala and other forebrain structures in the rat. **Brain Res.**, 153: 1-26, 1978.
- ROSS, C.A., RUGGIERO, D.A., 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.
- ROSS, C.A., RUGGIERO, D.A., PARK, D.H., JOH, T.H., SVED, A.F., FERNANDEZ-PARDAL, J., SAAVEDRA, J.M., 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.
- ROSS, C.A., Ruggiero, D.A., REIS, D.J. Projections from the nucleus tractus solitarii to the rostral ventrolateral medulla. **J. Comp. Neurol.**, 242: 511-534, 1985.
- RUSIN, K.I., BLEAKMAN, D., CHARD, P.S., RANDIC, M., MILLER, R.J. Tachykinins potentiate N-metil-D-aspartate responses in acutely isolated neurons from the dorsal horn. **Journal of Neurochemistry**, 60:952-960, 1993.

- SAPER, C.B., REIS, D.J., JOH, T. Medullary catecholamine inputs to the anteroventral third ventricular cardiovascular regulatory region in the rat, **Neurosc. Lett.**, 42:285-291, 1983.
- SEAGARD, J.L., DEAN, C.D., HOOP, A. Modulation of the carotid baroreceptor reflex by substance P in the nucleus tractus solitarius. **J. Auton. Nerv. Syst.**, 78:77-85, 2000.
- SPYER, K.M. Baroreceptor sensitive neurones in the anterior hypothalamus of the cat. **J. Physiol.**, 224:45-257, 1972.
- SRINIVASAN, M., GOINY, M., PANTALEO, T., LAGERCRANTZ, H., BRODIN, E., RUNOLD, M., YAMAMOTO, Y. Enhanced *in vivo* release of substance P in the nucleus tractus solitarii during hypoxia in the rabbit: role of peripheral input. **Brain Res.**, 546:211-216, 1991.
- SUN, M.K. Central neural organization and control of sympathetic nervous system in mammals. **Prog. Neurob.**, 47:157-233, 1995.
- SVED, A.F., 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.
- SWANSON, L.W., HARTMAN, B.K. The central adrenergic system. An immunofluorescence study of the location of cell bodies and their efferent connections in the rat utilizing dopamine-beta-hydroxylase as a marker. **J. Comp. Neurol.**, 163(4):467-505, 1975.
- TALMAN, W.T., PERRONE, M.H., REIS, D.J. Evidence for L-glutamate as the neurotransmitter of baroreceptor afferent nerve fibers. **Science**, 209:813-815, 1980.

- TALMAN, W.T. Kynurenic acid microinjected into the nucleus tractus solitarius of rat blocks the arterial baroreflex but not responses to glutamate. **Neurosc. Lett.**, 102:247-252, 1989.
- URBANSKI, R.W., SAPRU, H.N. Evidence for a sympatoexcitatory pathway from the nucleus tractus solitarii to the ventromedullary pressor area. **J. Auton. Nerv. Syst.**, 23:161-174, 1988.
- WANG, W.Z., RONG, W.F., WANG, C.M., WANG, J.W., WANG, J.J., YUAN, W.J. Effect of acetylcholine on the discharge of presympathetic neurons of the rostral ventro-lateral medulla of rats. **Sheng Li Xue Bao**, 53(4):270-4, 2001.
- WILLETTE, R.N., BARCAS, P.P., KRIEGER, A.J., SAPRU, H.N. Vasopressor and depressor areas in the rat medulla. **Neuropharmacology**, 22(9):1071-1079, 1983.
- WHALEN, E.J, BELTZ, T.G., LEWIS, S.J., JOHNSON, A.K. AV3V lesions attenuate the cardiovascular responses produced by blood-borne excitatory amino acid analogs. **Am. J. Physiol. (Heart Circ. Physiol.)**, 276(45):H1409-H1415, 1999.
- VALLADÃO, A.S., SAAD, W.A., CAMARGO, L.A.A., RENZI, A., DE LUCA Jr., L.A., MENANI, J.V. AV3V lesion reduces the pressor, dipsogenic, and natriuretic responses to ventromedial hypothalamus activation. **Brain Res. Bull.**, 28:909-914, 1992.
- VARDHAN, A., KACHROO, A., SAPRU, H.N. Excitatory amino acid receptor in commissural nucleus of the NTS mediate carotid chemoreceptor responses. **Am. J. Physiol.**, 264:R41-R50, 1993.

YANG, Z., COOTE, J.H. Influence of the hypothalamic paraventricular nucleus on cardiovascular neurons in the rostral ventrolateral medulla of the rat. **J. Physiol.**, 513:521-530, 1998.

ZHANG, W., MIFFLIN, S.W. Excitatory amino acid receptors within NTS mediate arterial chemoreceptor reflexes in rats. **Am. J. Physiol.**, 265:H770-H773, 1993.