

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “Júlio de Mesquita Filho”
PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS
(PIPGCF UFSCar/UNESP)**

**Mecanismos prosencefálicos e da área
rostroventrolateral do bulbo no controle de
respostas cardiovasculares em ratos acordados**

Joelma Maria Cardoso Gomide

Orientador: Prof. Dr. José Vanderlei Menani

Apoio financeiro: FAPESP e CNPq

Bolsa de doutorado: FAPESP

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “Júlio de Mesquita Filho”
PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS
(PIPGCF UFSCar/UNESP)**

**Mecanismos prosencefálicos e da área
rostroventrolateral do bulbo no controle de
respostas cardiovasculares em ratos
acordados**

Joelma Maria Cardoso Gomide

Tese de doutorado apresentada ao Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de São Carlos e Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” como requisito para obtenção do grau de Doutor em Ciências

São Carlos

2013

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

G633mp

Gomide, Joelma Maria Cardoso.

Mecanismos prosencefálicos e da área rostroventrolateral do bulbo no controle de respostas cardiovasculares em ratos acordados / Joelma Maria Cardoso Gomide. -- São Carlos : UFSCar, 2013.

121 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2013.

1. Fisiologia. 2. Pressão arterial - regulação. 3. RVL. 4. Equilíbrio hidroeletrólítico. 5. Glutamato monossódico. 6. Sistema cardiovascular. I. Título.

CDD: 612 (20^a)

Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências
Fisiológicas
Associação Ampla UFSCar/UNESP

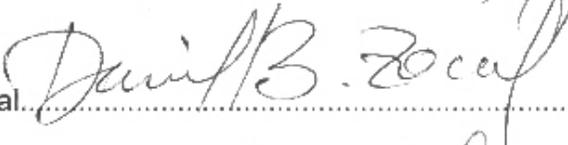
Folha de Aprovação

Tese de Doutorado de Joelma Maria Cardoso Gomide

Dia 28/06/2013

Prof. Dr. José Vanderlei Menani.....

Prof. Dr. Deoclécio Alves Chianca Junior.....

Prof. Dr. Daniel Breseghello Zoccal.....

Prof. Dr. João Carlos Callera.....

Prof. Dr. Carlos Cesar Crestani.....

*Aos Meus Pais, Minhas Irmãs e Minha Avó, por me apoiarem
incondicionalmente e com muita luta e esforço me conduzirem até aqui,
sendo sempre exemplo de vida, conduta e amor.*

Agradecimentos

A Deus, pela vida e sabedoria.

Ao meu orientador Prof. Dr. José Vanderlei Menani, pelo exemplo, confiança, paciência, diversificados ensinamentos e por me dar oportunidade de tamanho crescimento científico, profissional e pessoal.

Aos Meus Pais, obrigado pela grandeza e imponência do amor incondicional.

As Minhas Irmãs, que devido a nossa amizade e companheirismo celebraremos juntas mais essa vitória.

A Minha Avó, que sempre se orgulhou, incentivou e apoiou todos os caminhos em que me aventurei.

A Meus Padrinhos, Tios, Tias e Primos por serem presença constante em todas as minhas conquistas.

A todo corpo docente do Departamento de Fisiologia e Patologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, pela contribuição no trabalho e conhecimentos adquiridos nessa caminhada.

A todos os colegas de laboratório, pós-graduandos e estagiários, pela amizade, apoio, ensinamentos e diversão.

Aos funcionários Adriano, Ana, Reginaldo, Silvana, Sílvia e Silas pela dedicação, atenção e contribuição nas tarefas do Laboratório.

A Mariana e Sílvia, pelo apoio, companheirismo, paciência e principalmente por serem minha família em Araraquara.

Às SELETAS, por tudo que fizeram e fazem por mim e também por serem sinônimo de união, amor e companheirismo.

RESUMO

A região rostroventrolateral do bulbo (RVL) é um dos principais locais de origem de neurônios pré-motores simpáticos no sistema nervoso central (SNC) e tem uma importante participação na geração e manutenção do tônus vasomotor simpático. A região RVL recebe influências tanto excitatórias quanto inibitórias de diferentes regiões do SNC. Resultados recentes de nosso laboratório sugerem que a atividade de mecanismos angiotensinérgicos e colinérgicos prosencefálicos e da região anteroventral do terceiro ventrículo (AV3V) é importante para a resposta pressora produzida pela injeção do aminoácido excitatório glutamato na região RVL. Injeções intracerebroventriculares (icv) de carbacol (agonista colinérgico) ou angiotensina II (ANG II) causam respostas pressoras dependentes da ativação simpática e secreção de vasopressina que são abolidas pela lesão da região AV3V. Estudos em ratos anestesiados sugerem que modificações do equilíbrio hidroeletrolítico, particularmente em ratos com acesso apenas a ração normal e NaCl 0,9% por 14 dias, resultam em aumento da atividade simpática e da pressão arterial após injeções de glutamato na área RVL. No presente estudo, investigamos as respostas cardiovasculares produzidas por injeção de glutamato, acetilcolina, angiotensina II ou GABA na área RVL em ratos acordados após 24 h de privação hídrica ou do acesso apenas a ração normal e NaCl 0,9% durante 14 dias e neste último também foram testadas as respostas a diferentes doses de glutamato (0,1; 1; 3 e 5 nmol/100 nl) injetadas na área RVL. A PAM e a FC basais dos animais com privação hídrica (108 ± 2 mmHg e 354 ± 17 bpm, respectivamente) ou dos ratos tratados com ração normal e NaCl 0,9% durante 14 dias (115 ± 2 mmHg e 359 ± 17 bpm, respectivamente) não foram diferentes daquelas dos animais controles (113 ± 2 mmHg e 383 ± 16 bpm, respectivamente). As variações da PAM dos animais com 24

h de privação hídrica não foram diferentes das observadas nos animais controles após injeção na área RVL de glutamato (5 nmol/100 nl) (51 ± 3 mmHg, vs. controles: 55 ± 4 mmHg), acetilcolina (10 nmol/100 nl) (22 ± 9 mmHg, vs. controles: 15 ± 12 mmHg), angiotensina II (200 ng/100 nl) (41 ± 5 mmHg, vs. controles: 50 ± 6 mmHg) ou GABA (1 nmol/100 nl) (-19 ± 3 mmHg, vs. controles: -19 ± 3 mmHg). Nos animais que tiveram acesso a NaCl 0,9% por 14 dias, as alterações da PAM também foram similares às dos animais controles após injeção na área RVL de glutamato (42 ± 7 mmHg, vs. controles: 46 ± 16 mmHg), acetilcolina (31 ± 3 mmHg, vs. controles: 26 ± 2 mmHg), angiotensina II (53 ± 4 mmHg, vs. controles: 46 ± 8 mmHg) ou GABA (-22 ± 5 mmHg, vs. controles: -17 ± 4 mmHg). Em ratos com acesso a NaCl 0,9% por 14 dias também não foram observadas diferenças nas alterações da PAM produzidas pela injeção de glutamato na área RVL nas doses de 0,1 nmol/100 nl (11 ± 1 mmHg, vs. controles: 10 ± 4 mmHg), 1 nmol/100 nl (17 ± 6 mmHg, vs. controles: 14 ± 4 mmHg), 3 nmol/100 nl (24 ± 9 mmHg, vs. controles: 43 ± 11 mmHg) ou 5 nmol/100 nl (43 ± 6 mmHg, vs. controles: 56 ± 6 mmHg). As variações de FC produzidas pelos diferentes tratamentos na área RVL em ratos controles, com 24 h de privação hídrica ou que tiveram acesso a NaCl 0,9% por 14 dias também foram semelhantes. Diferentemente do que sugerem resultados da literatura obtidos em ratos anestesiados, os presentes resultados sugerem que o acesso apenas a ração normal e NaCl 0,9% por 14 dias não modifica as respostas cardiovasculares produzidas pela injeção de diferentes doses de glutamato, acetilcolina, ANG II ou GABA na área RVL em ratos acordados. O mesmo é válido para ratos acordados com 24 h de privação hídrica.

Outro objetivo deste estudo foi Investigar as respostas cardiovasculares produzidas pela injeção de glutamato na área RVL em ratos acordados pré-tratados

com carbacol (agonista colinérgico) ou angiotensina II (ANG II) injetados no ventrículo lateral (LV). A PAM e a FC basais dos animais foram 117 ± 4 mmHg e 400 ± 17 bpm, respectivamente. A resposta pressora produzida pela injeção de glutamato (5 nmol/100 nl) na área RVL aumentou após o pré-tratamento com carbacol (4 nmol/1 μ l) ou ANG II (50 ng/1 μ l) injetados intracerebroventricularmente (icv) (59 ± 3 e 68 ± 5 mmHg, respectivamente) em comparação com as respostas controles produzidas pela injeção de glutamato na área RVL combinada com injeção de veículo icv (37 ± 3 mmHg). As respostas pressoras produzidas pela injeção de carbacol ou ANG II icv (que alcançaram o máximo de 56 ± 3 e 44 ± 3 mmHg, respectivamente) já se encontravam reduzidas (9 ± 2 e 6 ± 3 mmHg, respectivamente) no momento da injeção de glutamato na área RVL (20 min após a injeção icv). Não houve diferença nas modificações de FC que ocorreram após a injeção de carbacol ou ANG II no VL ou glutamato injetado na área RVL sozinhos ou combinados. Estes resultados sugerem que a ativação colinérgica ou angiotensinérgica central facilita a resposta pressora produzida pela ativação glutamatérgica da área RVL.

A moxonidina (agonista de receptores adrenérgicos α_2 /imidazólicos), usada como anti-hipertensivo, reduz descargas simpáticas por ação central. Assim, foram investigados os efeitos de injeções prévias de moxonidina na área RVL sobre as respostas cardiovasculares produzidas por injeções de glutamato na mesma área. A PAM e a FC basais dos animais foram 112 ± 4 mmHg e 393 ± 30 bpm, respectivamente. A injeção prévia de moxonidina (5 nmol/100 nl) reduziu a resposta pressora produzida pela injeção de glutamato (5 nmol/100 nl) na área RVL (23 ± 3 mmHg, vs. após veículo: 45 ± 6 mmHg), sem modificações significantes da bradicardia (-7 ± 18 bpm, vs. após veículo: -28 ± 15 bpm). Os resultados sugerem que a ativação de receptores adrenérgico α_2 e/ou imidazólicos pela injeção de

moxonidina na área RVL atenua a resposta pressora que resulta da ativação simpática produzida pela estimulação glutamatérgica desta área.

Por último foram investigadas as respostas cardiovasculares produzidas pela injeção de carbacol no VL de ratos tratados com moxonidina injetada bilateralmente na área RVL combinada ou não com antagonista vasopressinérgico injetado intravenosamente (iv). A PAM e a FC basais dos animais que foram tratados com carbacol no VL combinado ou não com o antagonista de AVP iv + moxonidina na área RVL foram 118 ± 3 mmHg e 404 ± 12 bpm, respectivamente. As injeções bilaterais de moxonidina (5 nmol/100 nl) na área RVL também nestes ratos causaram redução da PAM quando comparado com o valor pré-injeção ou aos valores controles. Em relação à frequência cardíaca foi observada redução após as injeções de moxonidina da área RVL apenas quando comparados ao controle. As injeções prévias de moxonidina (5 nmol/100 nl) na área RVL reduziram a resposta pressora inicial (2 minutos) produzida pela injeção de carbacol (4 nmol/1 µl) no VL (21 ± 4 mmHg, vs. veículo: 40 ± 2 mmHg), enquanto que mais tardiamente (de 8 a 18 min após a injeção de carbacol) levou a uma potenciação da resposta pressora do carbacol (63 ± 4 mmHg, vs. veículo: 44 ± 2 mmHg). A injeção iv prévia do antagonista de receptores V_1 de vasopressina (10 µg/kg de peso corporal) reduziu a resposta pressora tardia (de 8 a 18 min) produzida pela injeção de carbacol (4 nmol/1 µl) no VL em ratos tratados com injeções de moxonidina (5 nmol/100 nl) na área RVL (8': 22 ± 3 mmHg; 10': 19 ± 3 mmHg; 12': 18 ± 3 mmHg; 14': 18 ± 3 mmHg; 16': 14 ± 3 mmHg; 18': 12 ± 3 mmHg) ou tratados com veículo na área RVL (8': 20 ± 3 mmHg; 10': 16 ± 3 mmHg; 12': 14 ± 3 mmHg; 14': 13 ± 3 mmHg; 16': 12 ± 3 mmHg; 18': 12 ± 3 mmHg). Nos ratos tratados com antagonista de AVP também ocorreu redução da resposta pressora inicial (2 minutos) nos grupos que receberam moxonidina na área

RVL (17 ± 3 mmHg) ou veículo na área RVL (29 ± 4 mmHg). Não houve diferença na resposta tardia do carbacol entre ratos que receberam injeção de veículo ou moxonidina na área RVL combinada com antagonista de vasopressina iv. As modificações de frequência cardíaca que ocorreram após a injeção de carbacol no VL combinada com moxonidina ou veículo injetado na área RVL em ratos que receberam ou não antagonista de vasopressina iv foram semelhantes. O pico da resposta pressora do carbacol injetado no VL em ratos tratados com moxonidina na área RVL que foi maior (63 ± 4 mmHg) do que aquele dos ratos tratados com veículo na área RVL (43 ± 2 mmHg), foi reduzido para valores semelhantes em ratos com bloqueio dos receptores V_1 de vasopressina tratados com moxonidina (26 ± 2 mmHg) ou veículo na área RVL (32 ± 2 mmHg). Assim, os presentes resultados sugerem que o aumento tardio da resposta pressora produzida por injeções de carbacol icv em ratos tratados com moxonidina na área RVL é devido ao aumento da secreção de vasopressina.

Abstract

The rostromedullary lateral medulla (RVLM) is a main central area of origin of sympathetic premotor neurons in the central nervous system (CNS) and has an important role in the generation and maintenance of sympathetic vasomotor tone. The RVLM receives both excitatory and inhibitory influences from different regions of the CNS. Recent results from our laboratory suggest that the activity of forebrain cholinergic and angiotensinergic mechanisms and anteroventral region of the third ventricle (AV3V) is important for the pressor response produced by injection of the excitatory amino acid glutamate in the RVLM. Intracerebroventricular (icv) injection of carbachol (cholinergic agonist) or angiotensin II (ANG II) causes pressor responses dependent on sympathetic activation and vasopressin secretion that are abolished by lesions of the AV3V region. Studies in anesthetized rats suggested that changes in fluid-electrolyte balance, particularly in rats with access to only normal chow and 0.9% NaCl for 14 days, increases sympathetic activity and blood pressure in response to injections of glutamate into the RVLM. In the present study, we investigated the cardiovascular responses produced by injection of glutamate, acetylcholine, GABA and angiotensin II in the RVLM in unanesthetized rats after 24 h water deprivation or access to only normal chow and 0.9% NaCl for 14 days. In this last protocol it was also tested the effects of different doses of glutamate (0.1, 1, 3 and 5 nmol/100 nl) injected into the RVLM. Basal mean arterial pressure (MAP) and heart rate (HR) in rats with 24 h of water deprivation (108 ± 2 mmHg and 354 ± 17 bpm, respectively) or rats treated with normal chow and 0.9% NaCl for 14 days (115 ± 2 mmHg and 359 ± 17 bpm, respectively) were not different from those of control animals (113 ± 2 mmHg and 383 ± 16 bpm, respectively). Changes in MAP of

animals with 24 h water deprivation were not different from those observed in control animals after injection into the RVLM of glutamate (5 nmol/100 nl) (51 ± 3 mmHg, vs. controls: 55 ± 4 mmHg), acetylcholine (10 nmol/100 nl) (22 ± 9 mmHg, vs. controls: 15 ± 12 mmHg), angiotensin II (200 ng/100 nl) (41 ± 5 mmHg, vs. controls: 50 ± 6 mmHg) or GABA (1 nmol/100 nl) (-19 ± 3 mmHg, vs. controls: -19 ± 3 mmHg). In animals that had access to 0.9% NaCl for 14 days, the changes in MAP were also similar to control animals after injection into the RVLM of glutamate (42 ± 7 mmHg, vs. controls: 46 ± 16 mmHg), acetylcholine (31 ± 3 mmHg, vs. controls: 26 ± 2 mmHg), angiotensin II (53 ± 4 mmHg, vs. controls: 46 ± 8 mmHg) or GABA (-22 ± 5 mmHg vs. controls: -17 ± 4 mmHg). In rats with access to 0.9% NaCl for 14 days we did not observe differences in the changes in MAP produced by injection of glutamate into the RVLM at doses of 0.1 nmol/100 nl (11 ± 1 mmHg, vs. controls: 10 ± 4 mmHg), 1 nmol/100 nl (17 ± 6 mmHg, vs. controls: 14 ± 4 mmHg), 3 nmol/100 nl (24 ± 9 mmHg, vs. controls: 43 ± 11 mmHg) or 5 nmol/100 nl (43 ± 6 mmHg, vs. controls: 56 ± 6 mmHg). The HR variations produced by the different treatments in the RVLM in control rats, rats with 24 h of water deprivation or those that had access to 0.9% NaCl for 14 days were also similar. Unlike the results in the literature with anesthetized rats, the present results suggest that the access to normal chow and 0.9% NaCl for 14 days does not modify the cardiovascular responses produced by the injection of different doses of glutamate, acetylcholine, ANG II or GABA into the RVLM in unanesthetized rats. The same is true for unanesthetized rats with 24 h water deprivation.

Another objective of this study was to investigate the cardiovascular responses produced by injection of glutamate into the RVLM in awake rats pretreated with either carbachol (cholinergic agonist) or ANG II injected into the lateral ventricle

(LV). Basal MAP and HR of the animals were 117 ± 4 mmHg and 400 ± 17 bpm, respectively. The pressor response produced by injection of glutamate (5 nmol/100 nl) into the RVLM increased after pretreatment with carbachol (4 nmol/1 μ l) or Ang II (50 ng/1 μ l) injected icv (59 ± 3 and 68 ± 5 mmHg, respectively) compared with the control responses produced by glutamate injection in the RVLM combined with icv injection of vehicle (37 ± 3 mmHg). The pressor responses produced by the injection of carbachol or ANG II icv (which reached a maximum of 56 ± 3 and 44 ± 3 mmHg, respectively) were already reduced (9 ± 2 and 6 ± 3 mmHg, respectively) at the time of injection glutamate into the RVLM (20 min after icv injection). There was no difference in the changes in HR that occurred after the injection of carbachol or ANG II into the LV or glutamate injected into the RVLM alone or combined. These results suggest that central cholinergic or angiotensinergic activation facilitates the pressor response produced by RVLM glutamatergic activation.

Moxonidine (α_2 adrenergic/imidazole receptor agonist), used as antihypertensive, reduces sympathetic discharges by central action. Thus, we investigated the effect of previous injection of moxonidine into the RVLM on the cardiovascular responses produced by glutamate injection in the same area. Basal MAP and HR of the animals were 112 ± 4 mmHg and 393 ± 30 bpm, respectively. The previous injection of moxonidine (5 nmol/100 nl) into the RVLM reduced the pressor response produced by the injection of glutamate (5 nmol/100 nl) into the RVLM (23 ± 3 mmHg, vs. after vehicle: 45 ± 6 mmHg) without significant changes in the bradycardic response (-7 ± 18 bpm, vs. after vehicle: -28 ± 15 bpm). The results suggest that activation of α_2 adrenergic/imidazole receptors by the injection of moxonidine into the RVLM attenuates the pressor response resulting from sympathetic activation produced by glutamatergic stimulation of this area.

Finally we investigated the cardiovascular responses produced by the injection of carbachol into the LV in rats treated with moxonidine injected bilaterally into the RVLM combined or not with vasopressinergic antagonist (AVP) injected intravenously (iv). Baseline MAP and HR of the animals that were treated with carbachol in the LV combination or not with the antagonist of AVP iv + moxonidine into the RVLM were 118 ± 3 mmHg and 404 ± 12 bpm, respectively. Bilateral injections of moxonidine (5 nmol/100 nl) into the RVLM in these rats caused a reduction in MAP when compared with the pre-injection values or controls. HR reduction was also observed after injections of moxonidine into the RVLM when compared to control. Previous injections of moxonidine (5 nmol/100 nl) into the RVLM reduced the initial pressor response (2 minutes) produced by the injection of carbachol (4 nmol/1 μ l) into the LV (21 ± 4 mmHg, vs. vehicle 40 ± 2 mmHg), whereas later (8 to 18 min after the injection of carbachol) occurred a potentiation of the pressor response to carbachol (63 ± 4 mmHg, vs. vehicle 44 ± 2 mmHg). The prior iv injection of the vasopressin V₁ receptor antagonist (10 mg/kg body weight) reduced the late pressor response (8 to 18 min) produced by the injection of carbachol (4 nmol/1 μ l) in the rats treated with LV injections of moxonidine (5 nmol/100 nl) into the RVLM (8': 22 ± 3 mmHg; 10': 19 ± 3 mmHg; 12': 18 ± 3 mmHg; 14': 18 ± 3 mmHg; 16': 14 ± 3 mmHg; 18': 12 ± 3 mmHg) or vehicle treated in RVLM (8': 20 ± 3 mmHg; 10': 16 ± 3 mmHg; 12': 14 ± 3 mmHg; 14': 13 ± 3 mmHg; 16': 12 ± 3 mmHg; 18': 12 ± 3 mmHg). In rats treated with AVP antagonist the initial pressor response (2 minutes) was also reduced in the groups receiving moxonidine in the RVLM (17 ± 3 mmHg) or vehicle in RVLM the (29 ± 4 mmHg). There was no difference in the late response to carbachol of rats receiving injections of vehicle or moxonidine into the RVLM combined with vasopressin antagonist iv. The HR changes that occurred after the injection of

carbachol into the LV combined with moxonidine or vehicle injected into the RVLM in rats receiving or not vasopressin antagonist iv were similar. The peak pressor response to carbachol injected into the LV of rats treated with moxonidine injected into the RVLM which was higher (63 ± 4 mm Hg) than that of vehicle-treated rats in RVLM (43 ± 2 mmHg) was reduced to similar values in rats with blockade of vasopressin V_1 receptor treated with moxonidine (26 ± 2 mmHg) or vehicle in RVLM (32 ± 2 mmHg). Thus, the present results suggest that the late increase in the pressor response produced by injections of carbachol icv in rats treated with moxonidine in RVLM is due to increased secretion of vasopressin.

Índice

Introdução	25
Objetivos	35
Material e Métodos	36
1) Animais.....	36
2) Implante das cânulas cerebrais.....	36
3) Injeções cerebrais.....	37
4) Drogas utilizadas.....	37
5) Medida da pressão arterial e frequência cardíaca.....	37
6) Histologia cerebral.....	38
7) Análise dos resultados.....	39
Experimentos realizados	40
1) Respostas cardiovasculares produzidas por injeções de glutamato, acetilcolina, ANG II ou GABA na área RVL em ratos com 24 h de privação hídrica.	40
2) Respostas cardiovasculares produzidas por injeções de glutamato, acetilcolina, ANG II ou GABA na área RVL em ratos que ingeriram diariamente salina 0,9% durante 14 dias.	41
3) Respostas cardiovasculares produzidas por injeções de glutamato em diferentes concentrações na área RVL em ratos tratados com salina 0,9% durante 14 dias.....	42
4) Respostas cardiovasculares produzidas por injeções de glutamato na área RVL combinadas com salina ou carbacol injetados intracerebroventricularmente.	43
5) Respostas cardiovasculares produzidas por injeções de glutamato na área RVL combinados com salina ou ANG II injetados intracerebroventricularmente.	44

6) Efeitos de injeções de moxonidina na área RVL sobre a resposta pressora produzida pela injeção de glutamato na mesma área.	45
7) Efeitos de injeções bilaterais de moxonidina na área RVL sobre a resposta pressora produzida pela injeção de carbacol no VL.	46
8) Efeitos de injeções bilaterais de moxonidina na área RVL sobre a resposta pressora produzida pela injeção de carbacol no VL após injeção iv de antagonista de vasopressina.....	47
RESULTADOS.....	48
1) Respostas cardiovasculares produzidas por injeções de glutamato, acetilcolina, ANG II ou GABA na área RVL em ratos com 24 h de privação hídrica.	48
2) Respostas cardiovasculares produzidas por injeções de glutamato, acetilcolina, ANG II ou GABA na área RVL de ratos não anestesiados mantidos com ração normal e água ou NaCl 0,9% por 14 dias.	51
3) Respostas cardiovasculares produzidas por injeções de diferentes doses de glutamato na área RVL em ratos mantidos com ração normal e água ou NaCl 0,9% por 14 dias.....	55
4) Alterações na PAM e FC em animais que receberam injeções de glutamato na área RVL combinadas com salina ou carbacol injetados intracerebroventricularmente	59
5) Alterações da PAM e FC em animais que receberam injeções de glutamato na área RVL combinadas com salina ou ANG II injetadas intracerebroventricularmente	65
6) Respostas cardiovasculares produzidas pela combinação de moxonidina e glutamato na área RVL.....	71

7– Respostas cardiovasculares produzidas pela combinação de carbacol no VL e moxonidina bilateralmente na área RVL	73
8) Respostas cardiovasculares produzidas pela injeção de carbacol no VL em ratos tratados com moxonidina injetada bilateralmente na área RVL combinada com antagonista vasopressinérgico injetado iv.....	81
9) Análise histológica	91
Discussão	98
Referência Bibliográfica	Error! Bookmark not defined.

Lista de figuras

Figura 1: Alterações (A) da pressão arterial média (Δ PAM) e (B) da frequência cardíaca (Δ FC) produzidas pelas injeções de glutamato (5 nmol/100 nl), GABA (1 nmol/100 nl), acetilcolina (10 nmol/100 nl) e ANG II (200 ng/100 nl) na área RVL em ratos acordados controles ou com 24 h de privação hídrica.....45

Figura 2: Alterações (A) da PAM (Δ PAM) e (B) da FC (Δ FC) produzidas pela injeção de glutamato (5 nmol/100 nl), GABA (1 nmol/100 nl), acetilcolina (10 nmol/100 nl) ou ANG II (200 ng/100 nl) na área RVL em ratos acordados que foram mantidos com ração normal e água ou NaCl 0,9% durante 14 dias. (C) Ingestão diária de líquidos dos ratos que tiveram acesso a ração normal e água ou NaCl 0,9% durante 14 dias.....49

Figura 3: Alterações (A) da PAM (Δ PAM) e (B) da FC (Δ FC) produzidas pelas injeções de glutamato (0,1; 1; 3 e 5 nmol/100 nl) na área RVL em ratos acordados que foram mantidos com ração normal e água ou NaCl 0,9% durante 14 dias. (C) Ingestão diária de líquidos dos ratos que tiveram acesso a ração normal e água ou NaCl 0,9% durante 14 dias.....53

Figura 4: Alterações (A) da pressão arterial média (Δ PAM) e (B) da frequência cardíaca (Δ FC) produzidas pela injeção glutamato (5 nmol/100 nl) na área RVL combinado com injeções de salina ou carbacol (4 nmol/1 μ l) injetados intracerebroventricularmente em ratos acordados.....57

Figura 5: Registros representativos típicos da pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) antes e após a injeção de glutamato (5 nmol/100 nl) na área RVL em ratos acordados que receberam injeção intracerebroventricular de salina ou carbacol (4 nmol/ 1 µl) no VL.....58

Figura 6: Alterações (A) da pressão arterial média (Δ PAM) e (B) da frequência cardíaca (Δ FC) produzidas pela injeção glutamato (5 nmol/100 nl) na área RVL combinada com injeções de salina ou ANG II (50 ng/1 µl) intracerebroventricularmente em ratos acordados.....63

Figura 7: Registros representativos típicos da pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) antes e após a injeção de glutamato (5 nmol/100 nl) na área RVL em ratos acordados que receberam injeção intracerebroventricular de salina ou ANG II (50 ng/ 1 µl) no VL.....64

Figura 8: Alterações (A) da pressão arterial média (Δ PAM) e (B) da frequência cardíaca (Δ FC) produzidas pela injeção glutamato (5 nmol/100 nl) na área RVL combinada com injeções de veículo ou moxonidina (5 nmol/100 nl) na mesma área de ratos acordados.....68

Figura 9: Alterações da PAM (A) e (B) da FC após as injeções bilaterais de veículo ou moxonidina (5 nmol/100 nl) na área RVL.....72

Figura 10: Alterações temporais (A) da pressão arterial média (Δ PAM) e (B) da frequência cardíaca (Δ FC) produzidas pela injeção de carbacol (4 nmol/1 μ l) no VL em ratos com injeções bilaterais de veículo ou moxonidina (5 nmol/100 nl) na área RVL.....73

Figura 11: Alterações da PAM e FC induzidas pelas injeções iv de fenilefrina (fenil, 5 μ g/kg de peso corporal), nitroprussiato de sódio (NPS, 30 μ g/kg de peso corporal), fenilbiguanida (PBG, 40 μ g/kg de peso corporal), cianeto de potássio (KCN, 40 μ g/rato) em ratos tratados com injeções bilaterais de veículo ou moxonidina na área RVL combinadas com carbacol injetado no VL.....75

Figura 12: Alterações temporais (A) da pressão arterial média (Δ PAM) e (B) da frequência cardíaca (Δ FC) produzidas pela injeção de carbacol (4 nmol/1 μ l) no VL em ratos que receberam tratamento prévio com antagonista vasopressinérgico (10 μ g/kg de peso corporal) ou salina iv combinado com injeções bilaterais de veículo ou moxonidina (5 nmol/100 nl) na área RVL.....80

Figura 13: Aumento máximo da pressão arterial média (Δ PAM) produzido pela injeção carbacol (4 nmol/1 μ l) no VL em ratos que receberam tratamento prévio com salina ou antagonista de receptores vasopressinérgico V_1 (10 μ g/kg de peso corporal) iv combinado com injeções bilaterais de veículo ou moxonidina (5 nmol/100 nl) na área RVL.....81

Figura 14: Valores basais da pressão arterial média (PAM) em ratos tratados com injeções de salina ou antagonista de receptores vasopressinérgicos V_1 (10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal) iv combinadas com veículo ou moxonidina (5 nmol/100 nl) injetados na área RVL e carbacol (4 nmol/1 μl) no VL.....82

Figura 15: Registros representativos típicos mostrando as variações de pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) antes e após a injeção de carbacol (4 nmol/1 μl) no VL em ratos tratados previamente com injeções bilaterais de veículo ou moxonidina (5 nmol/100 nl) na área RVL (A) ou injeções de veículo ou moxonidina na área RVL combinadas com antagonista vasopressinérgico V_1 (10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal) iv (B).....83

Figura 16: Figura esquemática do cérebro de um rato mostrando a localização da área RVL (em vermelho).....87

Figura 17: Corte transversal do cérebro de um rato mostrando o local da injeção unilateral na área RVL (seta).....88

Figura 18: Cortes transversais do cérebro de um rato mostrando os locais das injeções bilaterais na área RVL (setas) (A; B e C - sequência de cortes no sentido rostro-caudal).....89

Figura 19: Corte transversal do cérebro de um rato mostrando o trajeto da cânula em direção ao VL (seta).....90

Figura 20: Corte transversal do cérebro de um rato mostrando o local das injeção no VL (seta).....	90
Figura 21: Cortes transversais do cérebro de um rato mostrando o local da injeção unilateral fora da área RVL (setas) (injeção lateralmente à área RVL).....	91
Figura 22: Corte transversal do cérebro de um rato mostrando o local da injeção unilateral fora da área RVL (seta) (lateralmente à RVL).....	92
Figura 23: Corte transversal do cérebro de um rato mostrando o local da injeção unilateral fora da área RVL (seta) (injeção rostralmente à RVL, no núcleo facial - NF).....	92
Figura 24: Cortes transversais do cérebro de um rato mostrando local da injeção unilateral fora da área RVL (setas) (injeção rostralmente à RVL – no núcleo facial - NF).....	93
Figura 25: Esquema de possível facilitação observada na resposta pressora causada pela injeção de glutamato na área RVL combinada com injeção de carbacol ou angiotensina II no VL.....	108
Figura 26: Esquema de possível interação observada na resposta pressora causada pela injeção de carbacol no VL (A) e combinado com injeção de moxonidina na área RVL (B).....	109

Lista de tabelas

Tabela 1: Alterações da PAM e FC produzidas pelas injeções iv de fenilefrina, nitroprussiato de sódio, fenilbiguanida ou KCN em ratos controles e com 24 h de privação hídrica.....47

Tabela 2: Alterações da PAM e FC produzidas pelas injeções iv de fenilefrina, nitroprussiato de sódio, fenilbiguanida ou cianeto de potássio em ratos mantidos com ração normal e água ou NaCl 0,9% por 14 dias.....51

Tabela 3: Alterações da PAM e FC produzidas pelas injeções iv de fenilefrina, nitroprussiato de sódio, fenilbiguanida ou cianeto de potássio em ratos mantidos com ração normal e água ou NaCl 0,9% por 14 dias.....55

Tabela 4: Alterações da PAM e FC induzidas pelas injeções iv de fenilefrina, nitroprussiato de sódio, fenilbiguanida ou cianeto de potássio após injeções intracerebroventriculares de salina ou carbacol combinado com injeção de glutamato na área RVL.....60

Tabela 5: Alterações da PAM e FC produzidas pelas injeções de glutamato fora da área RVL após injeções prévias de carbacol ou salina no VL.....61

Tabela 6: Alterações da PAM e FC induzidas pelas injeções iv de fenilefrina, nitroprussiato de sódio, fenilbiguanida ou cianeto de potássio após injeções intracerebroventriculares de salina ou ANG II combinado com injeção de glutamato na área RVL.....66

Tabela 7: Alterações da PAM e FC produzidas pelas injeções de glutamato fora da área RVL após injeções prévias de ANG II ou salina no VL.....67

Tabela 8: Alterações da PAM e FC produzidas pelas injeções de glutamato combinado com injeções prévias de moxonidina ou veículo fora da área RVL.....69

Tabela 9: Alterações da PAM e FC produzidas pelas injeções de carbacol no VL após injeções prévias de moxonidina ou veículo fora da área RVL.....76

Tabela 10: Alterações da PAM e FC induzidas pelas injeções iv de fenilefrina, nitroprussiato de sódio, fenilbiguanida ou cianeto de potássio em ratos tratados com carbacol no VL após injeções bilaterais de veículo ou moxonidina na área RVL combinadas com antagonista de AVP iv.....85

Tabela 11: Alterações da PAM e FC produzidas pelas injeções de carbacol no VL após injeções prévias de moxonidina ou veículo fora da área RVL combinadas com antagonista de AVP iv.....86

Introdução

Embora frequentemente possam ocorrer alterações na pressão arterial (PA) em diferentes condições fisiológicas, a sua manutenção dentro de determinados limites é importante para se evitar prejuízos para sobrevivência ou atividade celular. Receptores localizados em diferentes partes do sistema cardiovascular são responsáveis por perceberem alterações da pressão arterial e enviar sinais para o sistema nervoso central (SNC) que permitem os ajustes adequados da PA. Os principais sistemas aferentes envolvidos na regulação autonômica da PA são as aferências dos barorreceptores aórticos e carotídeos, os quimiorreceptores carotídeos e as aferências das fibras C cardiopulmonares (Guyenet, Darnall, and Riley, 1990; Machado e cols, 1997). Esses receptores enviam informações que são conduzidas pelos nervos vago e glossofaríngeo até o SNC onde fazem sua primeira sinapse no núcleo do trato solitário (NTS).

O papel essencial do cérebro na manutenção dos valores basais da PA foi demonstrado em 1863 após estudos realizados por Claude Bernard e em 1873, Dittmar mostrou que a região ventrolateral do bulbo era necessária para manutenção da PA (Gebber, Barman, and Kocsis, 1990; Sved, Ito, and Yajima, 2002). A região ventral do bulbo foi reconhecida como sendo controladora e provavelmente a origem mais importante do tônus simpático por Guertzenstein and Silver (1974). Localizada ventralmente ao núcleo ambíguo a região rostroventrolateral do bulbo (RVL) contém neurônios pré-motores simpáticos e tem sido foco de diversas pesquisas por ser uma área muito importante para a geração e manutenção do tônus vasomotor simpático (Brown and Guyenet, 1984; Guertzenstein and Silver, 1974; Sun e cols, 1988). Tanto estudos anatômicos (Blessing e cols, 1981; Ross, Ruggiero, and Reis,

1981) quanto estudos eletrofisiológicos (Brown and Guyenet, 1984; Morrison e cols, 1989) demonstraram que os neurônios da região RVL projetam-se monossinapticamente para a região pré-ganglionar da coluna intermédia lateral (CIL) produzindo respostas excitatórias de neurônios vasomotores simpáticos pré-ganglionares (de Paula and Machado, 2000; Guyenet, Darnall, and Riley, 1990; Willette e cols, 1983). Elevação na PA e aumento nas concentrações plasmáticas de vasopressina (ADH) e catecolaminas são observadas após estimulação elétrica da região RVL (Dampney e cols, 2002; Ross e cols, 1984). Por outro lado, quando ocorre a inibição bilateral dessa área a pressão arterial é reduzida a níveis próximos aos observados após transecção medular (Ross e cols, 1984), demonstrando assim o importante papel da área RVL sobre o controle da PA.

Apesar da importância da região RVL na manutenção da PA, outras áreas centrais também participam dos ajustes cardiovasculares, inclusive influenciando a atividade das regiões bulbares e da própria região RVL (Guyenet, 2006; Menezes and Fontes, 2007). Alguns estudos demonstraram existir conexões entre as regiões bulbares envolvidas na regulação cardiovascular e áreas localizadas nas regiões anteriores do encéfalo (Babic, Roder, and Ciriello, 2004; Hardy, 2001; Jhamandas and Renaud, 1986; Lind, Van Hoesen, and Johnson, 1982; Ricardo and Koh, 1978; Saper and Levisohn, 1983). Dampney e colaboradores (2000) mostraram que a área RVL recebe influências tanto excitatórias quanto inibitórias, as quais exercem um controle regulatório importante nas atividades cardiovasculares (Guyenet, Darnall, and Riley, 1990; Lovick and Li, 1989).

Uma das áreas de integração das funções autonômicas no prosencéfalo é o núcleo paraventricular (NPV) do hipotálamo. O NPV está localizado bilateralmente ao terceiro ventrículo na região hipotalâmica (Paxinos and Watson, 1986). O NPV é

composto por neurônios magnocelulares e parvocelulares (Swanson and Kuypers, 1980b; Swanson and Sawchenko, 1983). Os neurônios magnocelulares projetam-se para a hipófise posterior e são responsáveis pela secreção de vasopressina e oxitocina, já os neurônios parvocelulares projetam-se para outras áreas do SNC, incluindo regiões importantes para o controle autonômico da PA como a região RVL e a CIL (Swanson and Kuypers, 1980a; Swanson and Kuypers, 1980b). Assim, o NPV pode influenciar diretamente a atividade simpática através de suas conexões com a CIL ou indiretamente através de suas projeções para a região RVL, a qual também se projeta para a CIL (Badoer, 2001).

Outra área prosencefálica que tem grande importância no controle cardiovascular e também muito envolvida no equilíbrio hidroeletrolítico é a região anteroventral do terceiro ventrículo (AV3V) (Menani e cols, 1990). A lesão eletrolítica desta área atenua diversas formas de hipertensão experimental em ratos, com exceção da hipertensão espontânea (Brody e cols, 1984; Brody e cols, 1978; Brody and Johnson, 1980). A estimulação angiotensinérgica ou colinérgica central pela injeção de ANG II ou de agonistas colinérgicos, como o carbacol, no ventrículo lateral (VL) produz respostas pressoras dependentes da ativação simpática e secreção de vasopressina (Lappe and Brody, 1984; Menani e cols, 1990; Xu, Ross, and Johnson, 2001). A lesão da região AV3V reduz tanto a resposta pressora como a resposta dipsogênica produzida pela injeção central de ANG II e carbacol (Menani e cols, 1990; Vieira e cols, 2006; Vieira e cols, 2007). Assim torna-se notória a importância da região AV3V para respostas que dependem da ação do sistema nervoso simpático (Brody e cols, 1984; Brody e cols, 1978; Brody and Johnson, 1980; Lappe and Brody, 1984; Menani e cols, 1988; Menani e cols, 1990; Menani, Bedran-de-Castro, and Krieger, 1988; Vieira e cols, 2004; Vieira e cols, 2006).

Lesões agudas e crônicas da região AV3V atenuam a resposta pressora produzida pela injeção de glutamato ou de ANG II na área RVL (Vieira e cols, 2006; Vieira e cols, 2010). Esses resultados são parecidos com outros resultados de nosso laboratório que mostraram que a lesão da região AV3V aguda ou crônica bloqueia a resposta pressora do glutamato injetado no NTS de ratos não anestesiados (Lappe and Brody, 1984; Vieira e cols, 2004). Portanto mecanismos prosencefálicos dependentes da região AV3V são importantes para respostas pressoras produzidas pela ativação de áreas bulbares como o NTS e a área RVL. Resultados de nosso laboratório também mostraram que o bloqueio colinérgico ou angiotensinérgico central com injeção intracerebroventricular (icv) de atropina ou losartan reduziu a resposta pressora produzida pela injeção de glutamato na área RVL (Lappe and Brody, 1984; Vieira e cols, 2006; Vieira e cols, 2007; Vieira e cols, 2010; Vieira, Nahey, and Collister, 2010). Ou seja, parece que mecanismos colinérgicos e angiotensinérgicos presentes no prosencéfalo e que poderiam envolver a ativação da região AV3V geram sinais facilitatórios para a resposta pressora produzida pela ativação da área RVL com glutamato. Esses mecanismos quando ativados, tornariam os neurônios da área RVL mais excitáveis e, portanto, mais sensíveis ao glutamato (Vieira e cols, 2007). A ANG II não apenas ativando mecanismos prosencefálicos, mas também atuando diretamente na área RVL é uma substância que parece facilitar a ação do glutamato na mesma área, uma vez que o tratamento da área RVL com losartan atenua a resposta pressora do glutamato nessa área (Lappe and Brody, 1984; Vieira e cols, 2010; Vieira, Nahey, and Collister, 2010). Embora mecanismos prosencefálicos possam afetar a resposta pressora do glutamato na área RVL por interferirem diretamente na excitabilidade de neurônios da área RVL sensíveis ao glutamato, é preciso se considerar que as modificações na

excitabilidade de porções inferiores do SNC como na CIL poderiam também afetar a ativação simpática e, portanto, a resposta pressora do glutamato atuando na área RVL. E nesse caso projeções diretas de áreas prosencefálicas para a CIL como aquelas originárias do NPV poderiam ter um papel fundamental. Ou seja, não apenas a região AV3V, mas também o NPV poderia ser parte de um circuito prosencefálico que integraria os mecanismos responsáveis pela facilitação de mecanismos pressores bulbares.

O glutamato é considerado um dos principais neurotransmissores excitatórios do sistema nervoso central, particularmente envolvido com os mecanismos pressores na área RVL, e recentes estudos sugerem existir possíveis interações entre mecanismos colinérgicos, angiotensinérgicos e glutamatérgicos (Freeman and Brooks, 2007; Kubo e cols, 2000; Vieira e cols, 2004; Vieira e cols, 2006; Vieira e cols, 2007; Vieira e cols, 2010). As respostas pressoras da ANG II ou do carbacol icv dependem de atividade simpática e secreção de ADH (Bourque, 1998; Brooks, 1992; Imai e cols, 1989) e, portanto, poderiam depender de áreas prosencefálicas como o NPV que pode controlar diretamente a atividade simpática sem nenhuma participação da área RVL, mas até hoje não há estudos mostrando claramente o papel de áreas como o NPV ou RVL nessas respostas.

Osmolaridade e ANG II na regulação cardiovascular

Mesmo se demonstrado a participação de mecanismos colinérgicos e angiotensinérgicos prosencefálicos na facilitação de respostas pressoras, uma grande questão ainda é quais seriam as situações fisiológicas em que esses mecanismos poderiam desempenhar um papel fundamental. Seriam as situações de hipovolemia em que há aumento de atividade do sistema renina-angiotensina

plasmático? Situações de desidratação em que ocorre hiperosmolaridade plasmática? Ou ambas?

É bem estabelecido na literatura que a osmolaridade dos líquidos corporais é um crítico regulador da secreção de vasopressina e da sede (Antunes e cols, 2006; Brooks, Qi, and O'Donoghuy, 2005; Imai e cols, 1989; Toney e cols, 2003). Atualmente novos estudos sugerem um papel semelhante na modulação da pressão arterial e da atividade simpática (Brooks, Qi, and O'Donoghuy, 2005; Toney e cols, 2003). Áreas prosencefálicas, como o órgão subfornical (OSF) e o órgão vasculoso da lâmina terminal (OVLT) são livres de barreira hematoencefálica (BHE) e por essa razão, poderiam detectar alterações iônicas que ocorrem no plasma. Essas áreas livres de BHE possuem osmorreceptores que quando ativados acionam mecanismos colinérgicos prosencefálicos (Menani e cols, 2002; Shi, Stocker, and Toney, 2007). Esses mecanismos levam a um aumento na atividade simpática e nas concentrações plasmáticas de ADH, resultando em elevação da PA (Hoffman, Walter, and Bulat, 1977; Imai e cols, 1989; Richard and Bourque, 1992) .

Estudos têm procurado resolver esta questão utilizando abordagens experimentais como a privação hídrica, a injeção endovenosa de soluções hiperosmóticas ou tratamento crônico com solução de NaCl 0,9%, que podem levar a aumento da osmolaridade dos fluidos corporais, aumento dos níveis plasmático de vasopressina e ANG II, atividade simpática e PA (Adams, Bardgett, and Stocker, 2009; Bealer, 2000; Brooks, Freeman, and Clow, 2004; Brooks, Freeman, and O'Donoghuy, 2004; Haibara e cols, 1995; Scrogin, McKeogh, and Brooks, 2002; Stocker, Stricker, and Sved, 2001; Toney e cols, 2003). A ativação neurohumoral durante o aumento da osmolaridade parece facilitar a ação de mensageiros neurais produzindo diferentes mudanças na atividade simpática para vários órgãos (Stocker,

Stricker, and Sved, 2001). Além disso, sugere-se que o aumento na osmolaridade centralmente ativaria neurônios que se originam no NPV e se projetam para a região RVL, ocorrendo maior liberação de aminoácidos excitatórios (AAE) nesta região, aumentando assim o tônus simpático (Adams, Bardgett, and Stocker, 2009; Toney e cols, 2003). O bloqueio não seletivo de receptores ionotrópicos para os AAE na região RVL reduziu a PA de ratos anestesiados com privação hídrica, mas não alterou a PA de animais hidratados. Além disso, a resposta pressora após injeção unilateral de doses crescentes de glutamato são maiores em animais desidratados do que nos animais hidratados (Brooks, Freeman, and Clow, 2004; Brooks, Freeman, and O'Donoghuy, 2004; Freeman and Brooks, 2007). Alterações na ingestão de sal promovem modificações na osmolaridade dos fluidos corporais levando a alterações nas respostas cardiovasculares dependentes da excitação e/ou inibição da região RVL (Brooks, Qi, and O'Donoghuy, 2005; Ito, Gordon, and Sved, 1999). O aumento da resposta pressora central mediada por uma dieta hipersódica ou redução dessa resposta em decorrência de uma dieta hipossódica sugere que mecanismos centrais de controle da PA respondem a alterações na ingestão desse mineral na dieta. Assim, o consumo de sal associado a mudanças nas respostas cardiovasculares pode predispor a um aumento ou redução da PA por interação entre vários outros mecanismos que a regulam (Ito, Gordon, and Sved, 1999).

Ainda não está bem estabelecido se as alterações ocorridas na PA após alterações na osmolaridade são devido ao aumento na sensibilidade da região RVL ou ao aumento na liberação de AAE nessa região (Brooks, Freeman, and Clow, 2004; Brooks, Freeman, and O'Donoghuy, 2004). A osmolaridade, através de uma ação central, pode ser um sensível e importante regulador do sistema nervoso simpático como é para a sede e para a secreção de vasopressina (Brooks, Qi, and

O'Donaughy, 2005). Adams, Bardgett, and Stocker (Adams, Bardgett, and Stocker, 2009) demonstraram que a ingestão crônica de solução isotônica (NaCl 0,9%), após 14 dias, altera a resposta hipertensora do glutamato e a hipotensora do GABA de ratos anestesiados.

Embora existam estudos investigando essas questões em animais anestesiados, nada existe relacionado com estudo em animais não anestesiados. E também os únicos mecanismos já investigados são o glutamatérgico e o gabaérgico. Diante disso, torna-se importante tentar compreender a interação entre os mecanismos envolvidos na regulação da osmolaridade e os mecanismos envolvidos na regulação da PA. Assim, no presente estudo foi investigado se a privação hídrica por 24 horas e o tratamento crônico com o oferecimento de solução de NaCl 0,9%, assim como aumento na atividade colinérgica ou angiotensinérgica de áreas prosencefálicas poderia influenciar as respostas pressoras produzidas pela ativação do RVL não apenas com glutamato, mas também com acetilcolina ou ANG II ou respostas hipotensoras produzidas pela injeção de GABA na região do RVL em ratos acordados.

Mecanismos adrenérgicos no controle da pressão arterial

O estudo de Guertzenstein and Silver (1974) demonstrou que manipulações (lesões ou inibições) na superfície ventral do bulbo promovia grandes alterações na PA basal. A partir de vários estudos envolvendo a região ventral do bulbo, ficou caracterizada essa região como a área específica responsável pela manutenção do tônus simpático vasomotor. Estudo de Ross e colaboradores (1984) utilizando métodos imunohistoquímicos sugeriram que os neurônios geradores da atividade simpática seriam adrenérgicos, uma vez que a região onde se encontravam

apresentava intensa imunorreatividade a feniletolamina-N-metil-transferase (PNMT), uma enzima responsável pela síntese de adrenalina. Essa região, denominada área C1, constitui parte da região RVL onde estão localizados os neurônios vasomotores simpáticos. A área C1 contém neurônios catecolaminérgicos, mas também é capaz de liberar o glutamato como neurotransmissor e outros neuropeptídeos (Schreihofner and Guyenet, 1997; Stornetta, McQuiston, and Guyenet, 2004). Diante disso, parece ser bem estabelecido que esses neurônios apresentam um papel importante no controle da pressão arterial em ratos, mas essa importância baseia-se em evidências obtidas principalmente em animais anestesiados. Porém, mais estudos envolvendo os mecanismos catecolaminérgicos da área RVL no controle da PA em ratos acordados ainda são necessários.

Importantes drogas de ação anti-hipertensiva utilizadas na clínica médica são agonistas adrenérgicos α_2 /imidazólicos (Buccafusco e cols, 1995; Ernsberger e cols, 1993; Lappe and Brody, 1984). As drogas anti-hipertensivas de ação central mais usadas e estudadas são a clonidina e a moxonidina (agonistas adrenérgicos α_2 e imidazólicos). Várias evidências sugerem que o efeito anti-hipertensivo desses fármacos é mediado, pelo menos em parte, pela ativação de receptores imidazólicos do tipo I₁ presentes na região do RVL, que ativados diminuiriam a atividade neuronal desse núcleo, reduzindo a atividade eferente simpática, e conseqüentemente, reduzindo a resistência vascular periférica e a pressão arterial (Buccafusco e cols, 1995; Chan and Head, 1996; Ernsberger e cols, 1994; Ernsberger e cols, 1993; Ernsberger e cols, 1987; Haxhiu e cols, 1994; Lappe and Brody, 1984). Embora uma ação anti-hipertensiva de agonistas adrenérgicos α_2 /imidazólicos atuando na área RVL seja um mecanismo que parece bem estabelecido pelos dados da literatura, resultados recentes de nosso laboratório mostraram que a hipotensão produzida

pela injeção de moxonidina no 4º ventrículo (4º V) é abolida após a lesão do NTS comissural de ratos acordados (dados ainda não publicados). Além disso, os principais estudos que tentam estabelecer a área RVL como o local de ação de agonistas adrenérgicos α_2 /imidazólicos foram realizados em animais anestesiados. Assim, é importante verificar os efeitos de injeções bilaterais de agonistas adrenérgicos α_2 /imidazólicos na área RVL sobre a pressão arterial e também verificar se esses tratamentos modificariam respostas pressoras como aquelas produzidas pela estimulação colinérgica central.

Objetivos

Os objetivos deste estudo foram estudar em ratos não anestesiados:

- 1) os efeitos da privação hídrica ou da ingestão diariamente de solução de NaCl 0,9% nas respostas cardiovasculares produzidas pela injeção de glutamato, acetilcolina, ANG II ou GABA na região RVL;
- 2) os efeitos do aumento da atividade angiotensinérgica ou colinérgica em áreas prosencefálicas sobre a resposta pressora do glutamato injetado na área RVL;
- 3) os efeitos da ativação de receptores adrenérgicos α_2 /imidazólicos na região RVL sobre a resposta pressora produzida pela estimulação glutamatérgica na mesma área ou colinérgica central.

Material e Métodos

1) Animais

Foram utilizados ratos Holtzman com pesos em torno de 300 gramas, fornecidos pelo biotério da Faculdade de Odontologia de Araraquara, UNESP. Os ratos foram mantidos com ração Guabi com conteúdo regular de sódio e água. Alguns grupos de ratos, ao invés de água, tiveram solução de NaCl 0,9% à vontade durante 14 dias antes dos testes das respostas cardiovasculares.

2) Implante das cânulas cerebrais

Os animais foram anestesiados com quetamina (80 mg/kg de peso corporal) + xilazina (7 mg/kg de peso corporal) e adaptados a um aparelho estereotáxico (modelo Kopf 900) com dois braços. Utilizando-se o bregma e o lambda foram determinados os pontos de introdução das cânulas de aço inoxidável nos crânios dos ratos. Nesses pontos foram feitas trepanações do osso do crânio com uma broca esférica. Para a área RVL, as cânulas foram posicionadas 3,6 mm caudal ao lambda, 1,8 mm lateral à linha média e 7,1 mm abaixo da dura-máter. Para o VL, as cânulas foram posicionadas 0,4 mm caudal ao bregma, 1,5 mm lateral à linha média e 3,5 mm abaixo da dura-máter. Para fixação das cânulas no crânio dos ratos foi utilizada resina acrílica aderida a dois parafusos presos na calota craniana. Ao final da cirurgia cerebral, os ratos receberam injeção intramuscular (0,2 ml/rato) de Pentabiótico Veterinário Pequeno Porte (Fort Dodge Saúde Animal Ltda.) e do analgésico/anti-inflamatório Ketoflex (cetoprofeno 1%, 0,03 ml/rato).

Depois da cirurgia, os ratos passaram por um período de recuperação de uma semana antes dos registros de pressão arterial.

3) Injeções cerebrais

As drogas foram dissolvidas em solução salina fisiológica estéril ou veículo (propilenoglicol/água 2:1) e injetadas no cérebro dos ratos utilizando-se uma seringa Hamilton (5 µl), conectada por um tubo de polietileno PE – 10 a uma agulha injetora introduzida no cérebro pela cânula guia previamente fixada no cérebro. As agulhas injetoras utilizadas para a área RVL e para o VL foram 2 mm mais longas do que a cânula fixada no cérebro. O volume injetado foi de 100 nl na área RVL e 1 µl no VL.

4) Drogas utilizadas

Na região RVL foram injetados glutamato monossódico (0,1; 1; 3 e 5 nmol/100 nl), acetilcolina (10 nmol/100 nl), GABA (1 nmol/100 nl), ANG II (200 nmol/100 nl) e moxonidina (5 nmol/100 nl), enquanto no VL foram injetados carbacol (4 nmol/1 µl) e angiotensina II (50 ng/1 µl). Foi feita também injeção de veículo nas áreas centrais como controle. Para dissolver as drogas foi utilizada salina estéril ou propilenoglicol/água 2:1. Foram injetadas também drogas iv como o antagonista de receptores vasopressinérgicos V₁ ([β-mercapto- β β –ciclopentametileno propionil1, O-metil-tyr2, arg8] – vasopressina), Composto de Mannig (10 µg/kg de peso corporal) e vasopressina (12,5 ng/rato) para testar o bloqueio dos receptores. O cloridrato de fenilefrina (5 µg/kg de peso corporal), nitroprussiato de sódio (30 µg/kg de peso corporal), cianeto de potássio (KCN, 40 µg/0,1 ml/rato) e fenilbiguanida (40 µg/kg de peso corporal) foram injetados iv para testar os reflexos cardiovasculares.

5) Medida da pressão arterial e frequência cardíaca

A pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) foram registradas em ratos acordados submetidos à canulação prévia (24 horas antes do registro) da

artéria femoral com um tubo de polietileno PE 10, o qual estava conectado com um tubo de polietileno PE 50 que, conduzido subcutaneamente, foi exteriorizado no dorso do animal. Também foi implantada na veia femoral e exteriorizada pelo dorso do animal uma cânula de polietileno PE 10 conectada a PE 50 para administração iv de drogas. A cânula implantada na artéria foi conectada a um transdutor de pressão (Stathan P 23 Db) conectado a um amplificador (ETH-200, CB Sciences) acoplado a um sistema computadorizado de registro (Mac Lab/Power Lab).

6) *Histologia cerebral*

Após a realização dos experimentos, os ratos foram profundamente anestesiados com tiopental sódico (70 mg/kg de peso corporal) e 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 (60 μ m de espessura) nos pontos de injeção foram feitos com auxílio de um micrótomo de congelamento (Leica). Os cortes histológicos foram montados em lâminas, corados pelo método de Giemsa e analisados para se localizar os pontos das injeções no VL e na área RVL.

Os animais com injeções no RVL ou fora do RVL (grupo controle com injeções negativas) foram analisados separadamente, para se confirmar que os efeitos obtidos com injeções no RVL são devidos exclusivamente à ação das drogas no RVL.

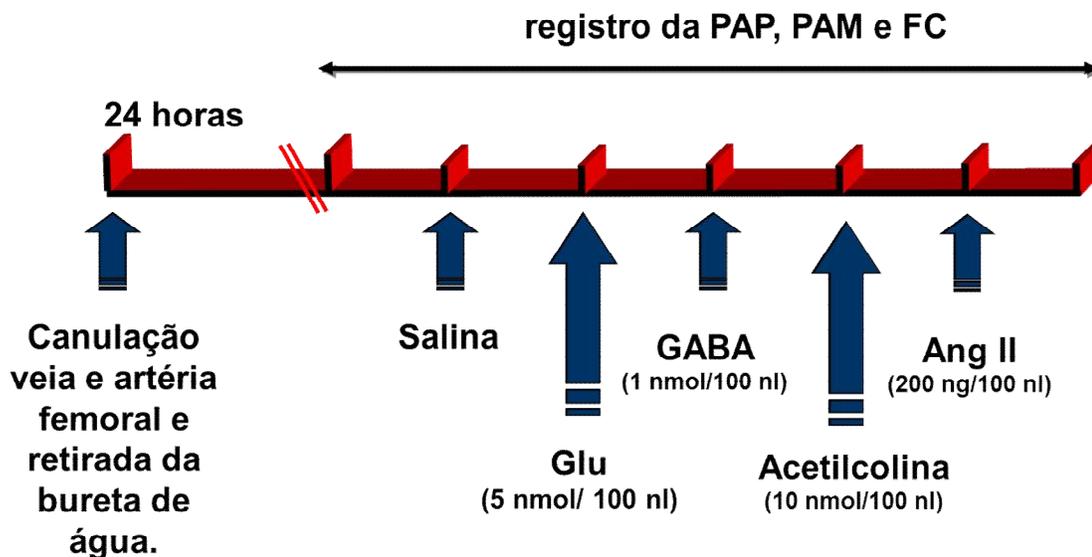
7) Análise dos resultados

Os dados foram tabelados e representados em gráficos como média \pm erro padrão da média. A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa Sigma Stat 3.5 (Jandel Corporation, Point Richmond, CA). Teste de t-Student foi utilizado para comparação entre as médias (experimentos 1, 2, 3, 4, 5 e 6) ou ANOVA de uma via (efeito da moxonidina na pressão arterial basal) ou duas vias (experimentos 7 e 8) para comparação inter e intragrupos. O índice de significância foi fixado em $p < 0,05$.

Experimentos realizados

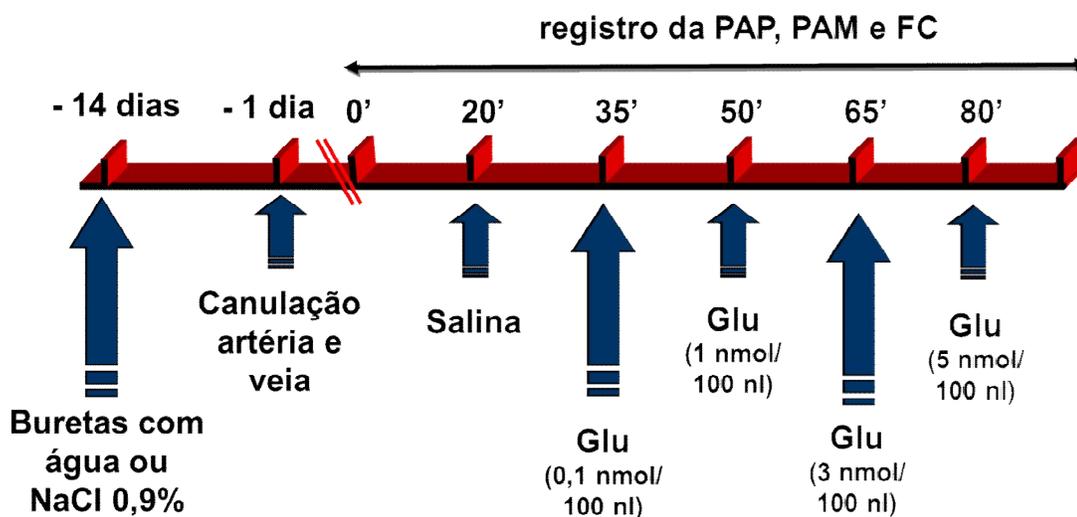
1) Respostas cardiovasculares produzidas por injeções de glutamato, acetilcolina, ANG II ou GABA na área RVL em ratos com 24 h de privação hídrica.

A PAM e FC foram registradas em ratos com cânulas implantadas na área RVL mantidos em condição controle ou 24 h de privação hídrica. Após 20 minutos de registro da PAM e FC basais, os ratos receberam injeções de salina (100 nl), glutamato (5 nmol/100 nl), GABA (1 nmol/100 nl), acetilcolina (10 nmol) e ANGII (200 ng/100 nl) na região RVL com um intervalo de 15 min entre cada injeção. Após 20 min da última injeção na área RVL, foram avaliados barorreflexo, quimiorreflexo e reflexo cardiopulmonar injetando-se iv fenilefrina (5 µg/kg), nitroprussiato de sódio (30 µg/kg), cianeto de potássio (KCN, 40 µg/rato) e fenilbiguanida (50 µg/kg).



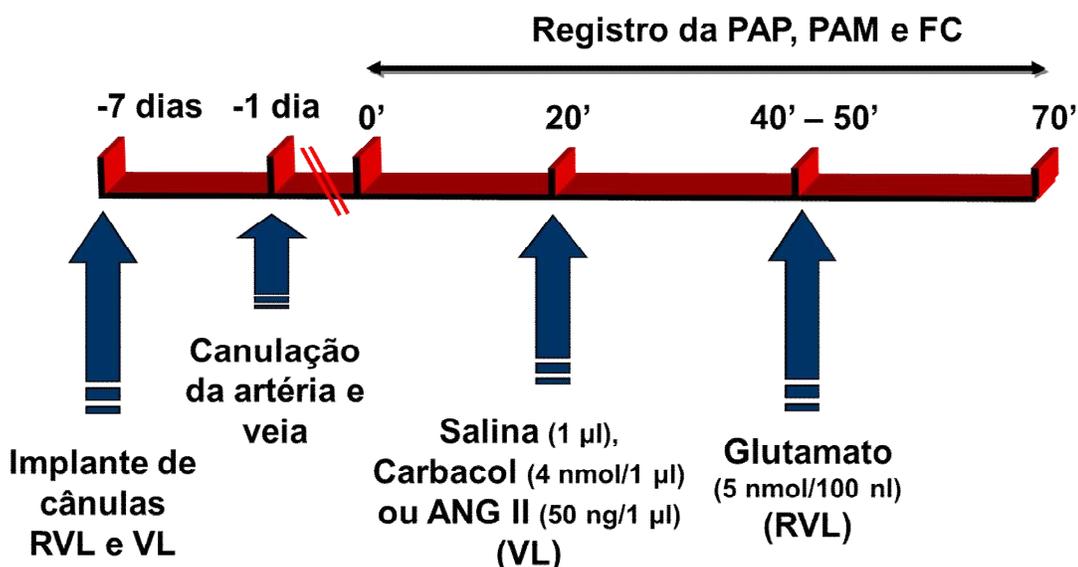
3) Respostas cardiovasculares produzidas por injeções de glutamato em diferentes concentrações na área RVL em ratos tratados com salina 0,9% durante 14 dias

A PAM e FC foram registradas em ratos com cânulas implantadas na área RVL mantidos em condição controle ou com NaCl 0,9% disponível para ingestão ao invés de água por 14 dias. Após 20 minutos de registro da PAM e FC basais, os ratos receberam injeções de salina (100 nl) e glutamato em diferentes concentrações (0,1; 1; 3 e 5 nmol/100 nl) na região RVL com um intervalo de 15 min entre cada injeção. Após 20 min da última injeção na área RVL, foram avaliados barorreflexo, quimiorreflexo e reflexo cardiopulmonar injetando-se iv fenilefrina (5 µg/kg), nitroprussiato de sódio (30 µg/kg), KCN (40 µg/rato) e fenilbiguanida (40 µg/kg).



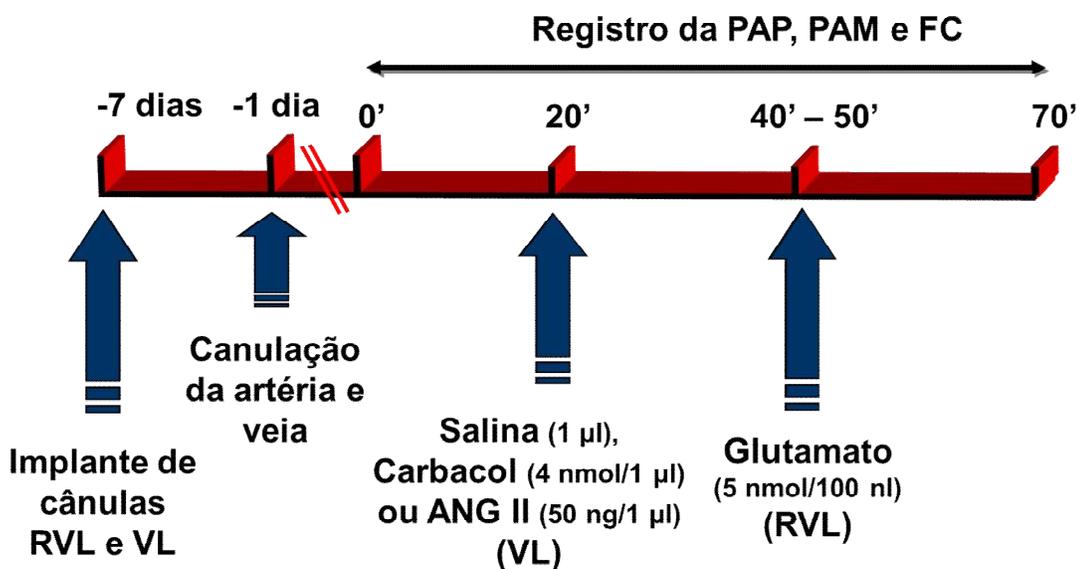
4) Respostas cardiovasculares produzidas por injeções de glutamato na área RVL combinadas com salina ou carbacol injetados intracerebroventricularmente.

A PAM e FC foram registradas em ratos com cânulas implantadas na área RVL e VL mantidos em condição controle. Após 20 minutos de registro da PAM e FC basais, os ratos receberam injeção de salina (1 µl) ou carbacol (4 nmol/1 µl) no VL. Após 20 da injeção no VL, glutamato (5 nmol/100 nl) foi injetado na região RVL. Após 20 min da injeção na área RVL, foram avaliados barorreflexo, quimiorreflexo e reflexo cardiopulmonar injetando-se iv fenilefrina (5 µg/kg), nitroprussiato de sódio (30 µg/kg), KCN (40 µg/rato) e fenilbiguanida (40 µg/kg). Os mesmos animais foram testados com injeção de salina e glutamato na área RVL com um intervalo de 24 h entre os testes, feitos de forma contrabalanceada.



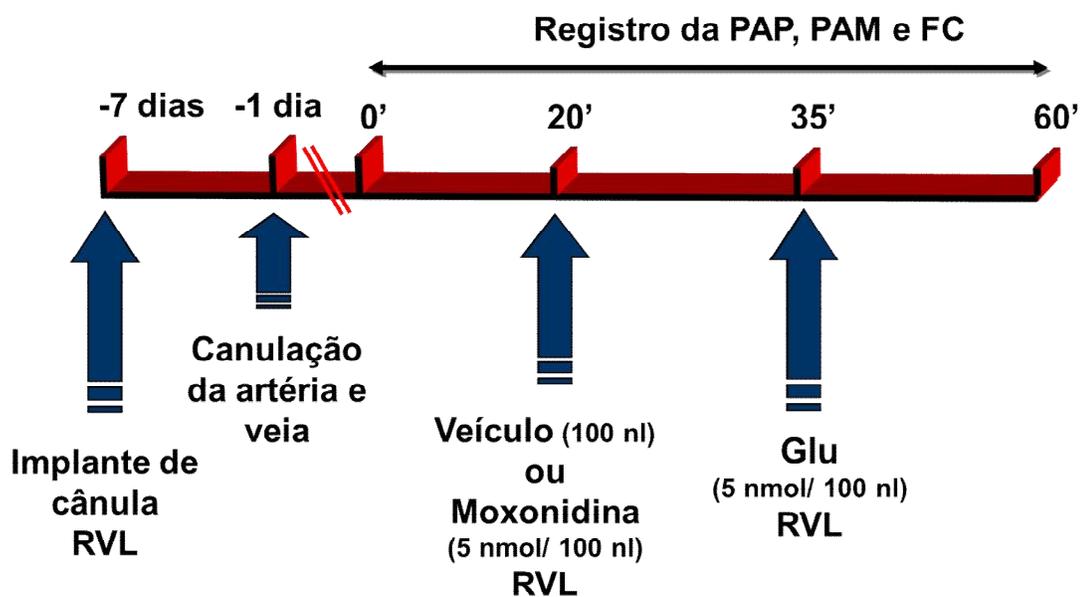
5) Respostas cardiovasculares produzidas por injeções de glutamato na área RVL combinados com salina ou ANG II injetados intracerebroventricularmente.

A PAM e FC foram registradas em ratos com cânulas implantadas na área RVL e VL mantidos em condição controle. Após 20 minutos de registro da PAM e FC basais, os ratos receberam injeções de salina (1µl) ou ANG II (50 ng/1 µl) no VL. Após 20 da injeção no VL, glutamato (5 nmol/100 nl) foi injetado na região RVL. Após 20 min da injeção na área RVL, foram avaliados barorreflexo, quimiorreflexo e reflexo cardiopulmonar injetando-se iv fenilefrina (5 µg/kg), nitroprussiato de sódio (30 µg/kg), KCN (40 µg/rato) e fenilbiguanida (40 µg/kg). Os mesmos animais foram testados com injeção de salina e glutamato na área RVL com um intervalo de 24 h entre os testes, feitos de forma contrabalanceada.



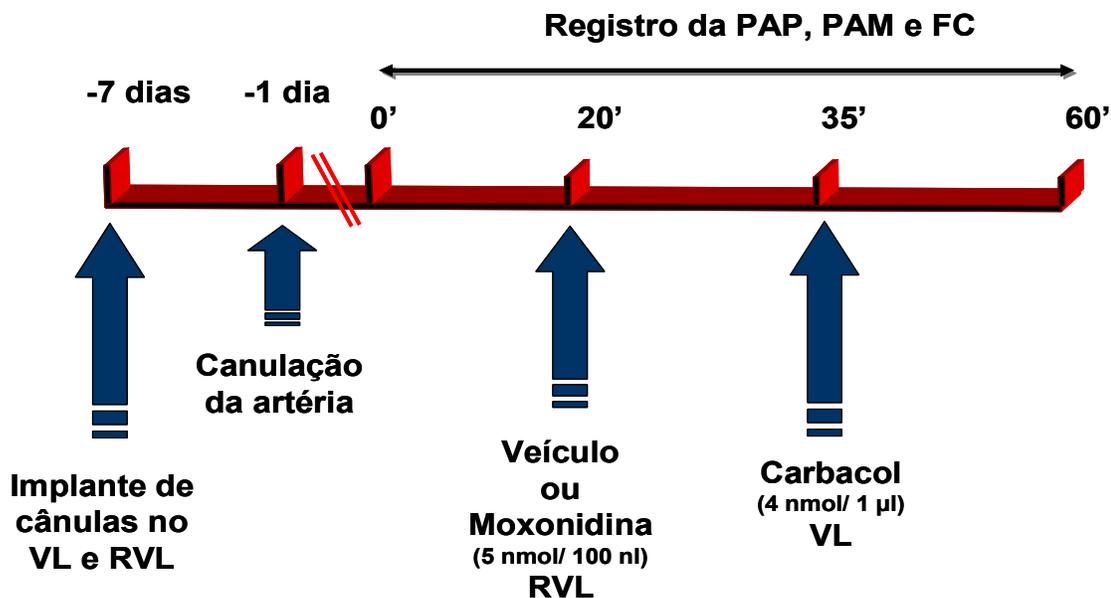
6) Efeitos de injeções de moxonidina na área RVL sobre a resposta pressora produzida pela injeção de glutamato na mesma área.

Em ratos com cânulas implantadas bilateralmente na área RVL, após um período de 20 minutos de registro da PAP e FC basais foram injetados veículo (100 nl) ou moxonidina (5 nmol/100 nl) bilateralmente na área RVL. Após 15 minutos foi injetado glutamato (5 nmol/100 nl) na mesma área. Os mesmos animais foram testados com injeção de veículo e moxonidina na área RVL com um intervalo de 24 h entre os testes, feitos de forma contrabalanceada.



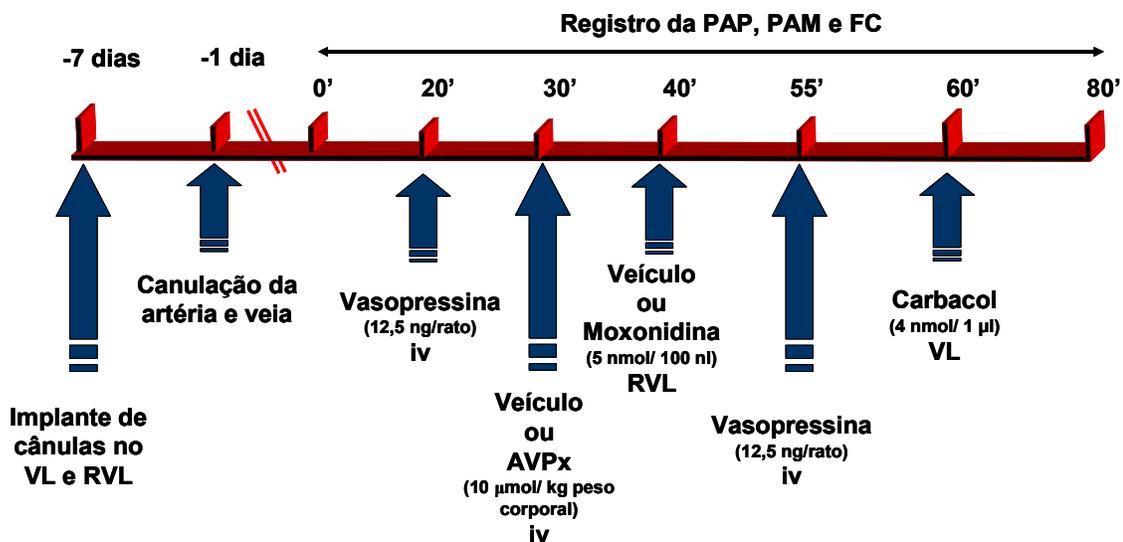
7) Efeitos de injeções bilaterais de moxonidina na área RVL sobre a resposta pressora produzida pela injeção de carbacol no VL.

Em ratos com cânulas implantadas simultaneamente no VL e bilateralmente na área RVL, após um período de 20 minutos de registro da PAM e FC basais foram injetadas veículo (100 nl) ou moxonidina (5 nmol/100 nl) bilateralmente na área RVL. Após 15 minutos foi injetado carbacol (4 nmol/1 µl) no VL. Vinte minutos após a injeção de carbacol, barorreflexo, quimiorreflexo e reflexo cardiopulmonar foram testados injetando-se iv fenilefrina (5 µg/kg), nitroprussiato de sódio (30 µg/kg), KCN (40 µg/rato) e fenilbiguanida (40 µg/kg). Os mesmos animais foram testados com injeção de veículo e moxonidina na área RVL com um intervalo de 24 h entre os testes, feitos de forma contrabalanceada.



8) Efeitos de injeções bilaterais de moxonidina na área RVL sobre a resposta pressora produzida pela injeção de carbacol no VL após injeção iv de antagonista de vasopressina.

Em ratos com cânulas implantadas simultaneamente no VL e bilateralmente na área RVL, após um período de 20 minutos de registro da PAP e FC basais foi injetada vasopressina (12,5 ng/rato) iv. Após 10 minutos foi injetado antagonista de receptores vasopressinérgicos V_1 (10 $\mu\text{g/kg}$ de peso corporal) ou salina iv e após mais 10 min foi injetado veículo (100 nl) ou moxonidina (5 nmol/100 nl) bilateralmente na área RVL. Vinte minutos depois foi feita nova injeção de vasopressina para testar a eficiência do bloqueio dos receptores vasopressinérgicos e 10 min depois foi injetado carbacol (4 nmol/1 μl) no VL. Vinte minutos após a injeção de carbacol, barorreflexo, quimiorreflexo e reflexo cardiopulmonar foram testados injetando-se iv fenilefrina (5 $\mu\text{g/kg}$), nitroprussiato de sódio (30 $\mu\text{g/kg}$), KCN (40 $\mu\text{g/rato}$) e fenilbiguanida (40 $\mu\text{g/kg}$). Para os testes foram usados 2 grupos de animais, um que recebeu salina iv e outro que recebeu antagonista de vasopressina iv. Injeção de veículo e moxonidina na área RVL foi feita nos mesmos animais com um intervalo de 24 h entre os testes, feitos de forma contrabalanceada.



RESULTADOS

1) Respostas cardiovasculares produzidas por injeções de glutamato, acetilcolina, ANG II ou GABA na área RVL em ratos com 24 h de privação hídrica.

1.1) Alterações da PAM e FC produzidas pelas injeções na área RVL

Os valores basais da PAM e FC dos animais com 24 h de privação hídrica (108 ± 2 mmHg e 354 ± 17 bpm, respectivamente) não foram diferentes dos observados nos animais controles (108 ± 3 mmHg e 374 ± 7 bpm, respectivamente).

As variações da PAM (Figura 1A) dos animais com 24 h de privação hídrica não foram diferentes das observadas nos animais controles após as injeções na região RVL de glutamato (5 nmol/100 nl) (51 ± 3 mmHg, vs. controles: 55 ± 4 mmHg), GABA (1 nmol/100 nl) (-19 ± 3 mmHg, vs. controles: -19 ± 3 mmHg), acetilcolina (10 nmol/100 nl) (22 ± 9 mmHg, vs. controles: 27 ± 4 mmHg) ou ANG II (200 ng/100 nl) (41 ± 5 mmHg, vs. controles: 50 ± 6 mmHg).

As variações na FC (Figura 1B) dos animais com 24 h de privação hídrica também não foram diferentes das observadas nos animais controles após as injeções na área RVL de glutamato (-49 ± 27 mmHg, vs. controles: -72 ± 28 mmHg), GABA (20 ± 9 mmHg, vs. controles: 26 ± 9 mmHg), acetilcolina (18 ± 15 mmHg, vs. controles: 14 ± 23 mmHg) ou ANG II (8 ± 9 mmHg, vs. controles: -20 ± 9 mmHg).

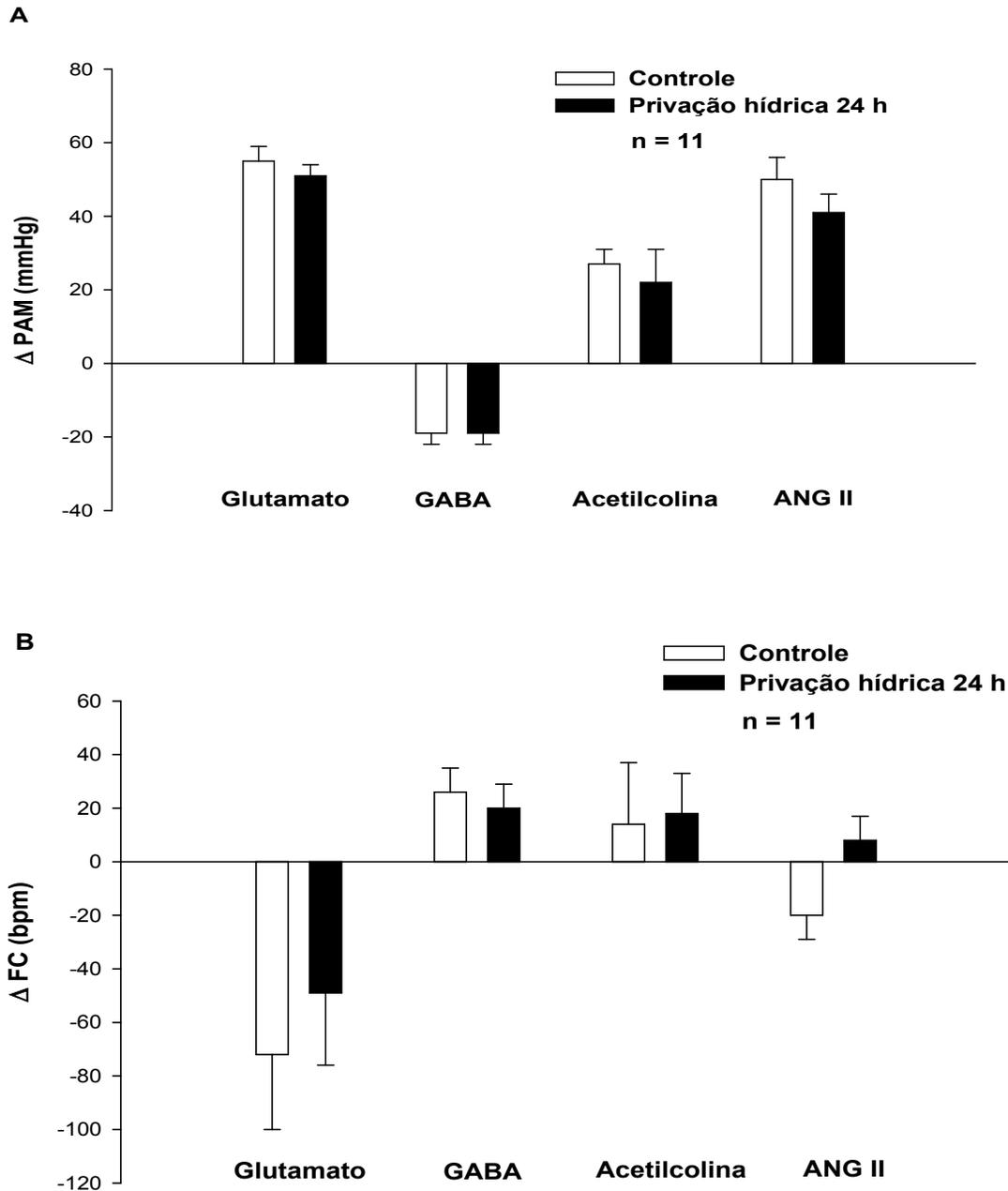


Figura 1: Alterações (A) da pressão arterial média (Δ PAM) e (B) da frequência cardíaca (Δ FC) produzidas pelas injeções de glutamato (5 nmol/100 nl), GABA (1 nmol/100 nl), acetilcolina (10 nmol/100 nl) e ANG II (200 ng/100 nl) na área RVL em ratos acordados controles ou com 24 h de privação hídrica. Os resultados estão expressos como médias \pm EPM. n = número de animais.

1.2) Respostas reflexas cardiovasculares dos ratos com 24 h de privação hídrica que receberam injeções na área RVL

Nos testes reflexos as variações da PAM (Tabela 1) dos animais com 24 h de privação hídrica não foram diferentes das observadas nos animais controles após a administração iv de fenilefrina (5 µg/kg de peso corporal) (51 ± 4 mmHg, vs. controles: 43 ± 3 mmHg), nitroprussiato de sódio (30 µg/kg de peso corporal) (-42 ± 2 mmHg, vs. controles: -36 ± 3 mmHg), fenilbiguanida (40 µg/kg de peso corporal) (-69 ± 7 mmHg, vs. controles: -68 ± 7 mmHg) ou KCN (40 µg/rato) (50 ± 12 mmHg, vs. controles: 37 ± 7 mmHg).

As variações na FC (Tabela 1) dos animais com 24 h de privação hídrica também não foram diferentes das observadas nos animais controles após a administração iv de fenilefrina (-78 ± 23 mmHg, vs. controles: -54 ± 9 mmHg), nitroprussiato de sódio (102 ± 16 mmHg, vs. controles: 106 ± 9 mmHg), fenilbiguanida (-309 ± 14 mmHg, vs. controles: -312 ± 10 mmHg) ou KCN (-166 ± 56 mmHg, vs. controles: -122 ± 54 mmHg).

Tabela 1: Alterações da PAM e FC produzidas pelas injeções iv de fenilefrina, nitroprussiato de sódio, fenilbiguanida ou KCN em ratos controles e com 24 h de privação hídrica.

	<u>Alterações da PAM (mmHg)</u>				<u>Alterações da FC (bpm)</u>			
	Fenil	NPS	PBG	KCN	Fenil	NPS	PBG	KCN
Controle	43 ± 3	-36 ± 3	-68 ± 7	37 ± 7	-64 ± 9	106 ± 9	-312 ± 10	-122 ± 54
Privado	51 ± 4	-42 ± 2	-69 ± 7	50 ± 12	-78 ± 23	102 ± 16	-309 ± 14	-166 ± 56

Os resultados estão apresentados como média ± EPM. Fenilefrina (fenil, 5 µg/kg de peso corporal), nitroprussiato de sódio (NPS, 30 µg/kg de peso corporal), fenilbiguanida (PBG, 40 µg/kg de peso corporal), cianeto de potássio (KCN, 40 µg/rato). n = 11 animais por grupo

2) Respostas cardiovasculares produzidas por injeções de glutamato, acetilcolina, ANG II ou GABA na área RVL de ratos não anestesiados mantidos com ração normal e água ou NaCl 0,9% por 14 dias.

2.1) Alterações da PAM e FC produzidas pelas injeções na área RVL e ingestão diária

Os valores basais da PAM e FC dos animais que tiveram acesso a NaCl 0,9% (115 ± 2 mmHg e 359 ± 15 bpm, respectivamente) não foram diferentes dos observados nos animais controles que tiveram acesso a água (113 ± 2 mmHg e 383 ± 16 bpm, respectivamente).

As variações da PAM dos animais que foram mantidos ração normal e NaCl 0,9% por 14 dias não foram diferentes das observadas nos animais mantidos com

ração normal e água (controles) após a injeção na região RVL de glutamato (5 nmol/100 nl) (46 ± 16 mmHg, vs. controles: 41 ± 7 mmHg), GABA (1 nmol/100 nl) (-17 ± 4 mmHg, vs. controles: -22 ± 5 mmHg), acetilcolina (10 nmol/100 nl) (26 ± 2 mmHg, vs. controles: 31 ± 3 mmHg) ou ANG II (200 ng/100 nl) (46 ± 8 mmHg, vs. controles: 53 ± 4 mmHg) (Figura 2A).

As variações na FC também não foram diferentes entre os dois grupos após injeções na área RVL de glutamato (-24 ± 35 bpm, vs. controles: -37 ± 23 bpm), GABA (11 ± 15 bpm, vs. controles: 10 ± 6 bpm), acetilcolina (12 ± 7 bpm, vs. controles: 5 ± 27 bpm) ou ANG II (-22 ± 13 bpm, vs. controles: -6 ± 9 bpm) (Figura 2B).

A ingestão diária de NaCl 0,9% (56 ± 2 ml/dia) dos animais mantidos com ração normal e NaCl 0,9% foi maior do que a ingestão de água (32 ± 1 ml/dia) dos animais mantidos com ração normal e água (controles) ($t = 105$; $p < 0,001$) (Figura 2C).

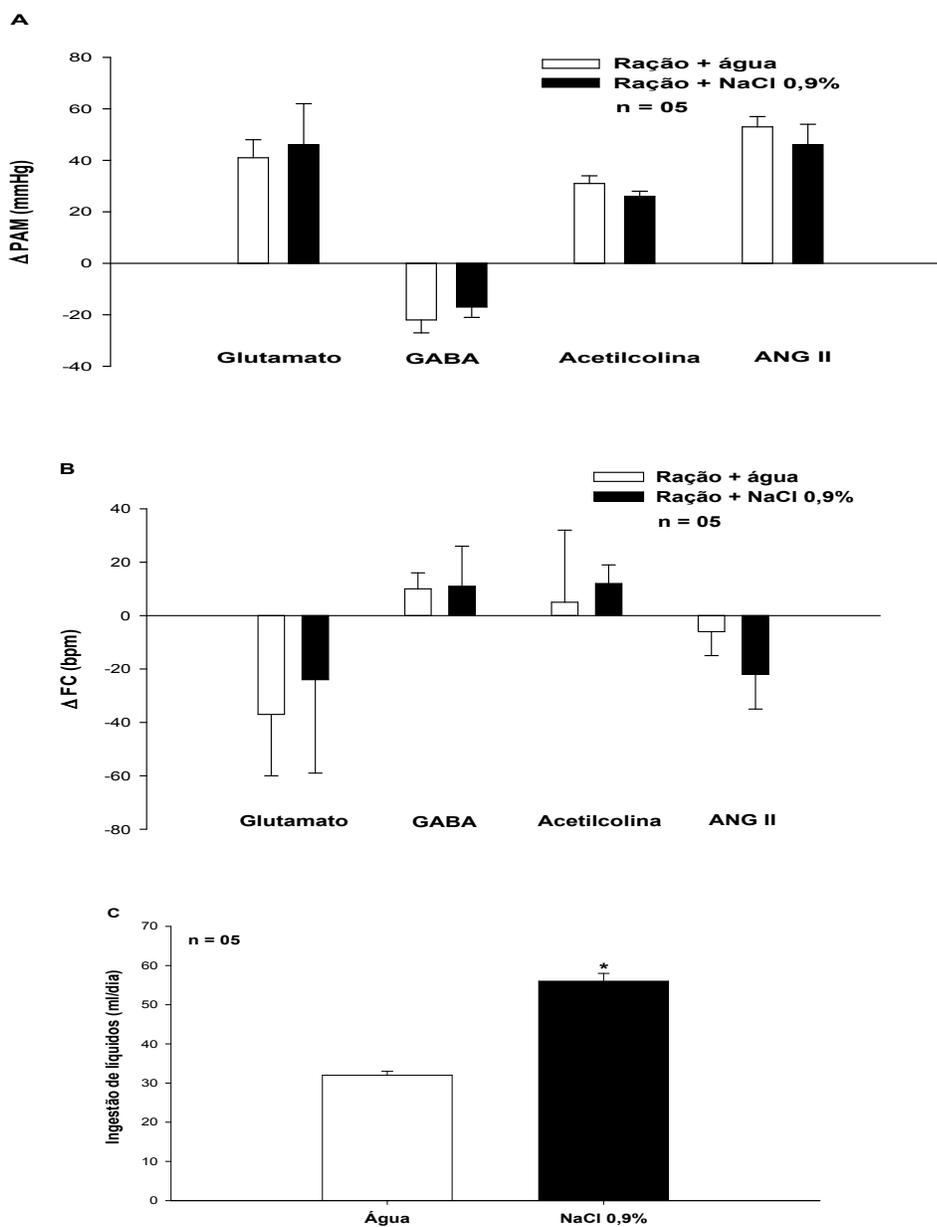


Figura 2: Alterações (A) da PAM (Δ PAM) e (B) da FC (Δ FC) produzidas pela injeção de glutamato (5 nmol/100 nl), GABA (1 nmol/100 nl), acetilcolina (10 nmol/100 nl) ou ANG II (200 ng/100 nl) na área RVL em ratos acordados que foram mantidos com ração normal e água ou NaCl 0,9% durante 14 dias. (C) Ingestão diária de líquidos dos ratos que tiveram acesso a ração normal e água ou NaCl 0,9% durante 14 dias. Os resultados estão expressos como médias \pm EPM. n = número de animais.

2.2) Respostas reflexas cardiovasculares dos ratos mantidos com ração e NaCl 0,9%

As variações da PAM dos animais mantidos com ração e NaCl 0,9% não foram diferentes das observadas nos animais mantidos com ração e água (controles) após a administração iv de fenilefrina (5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal) (37 ± 6 mmHg, vs. controles: 41 ± 6 mmHg), nitroprussiato de sódio (30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal) (-47 ± 3 mmHg, vs. controles: -35 ± 4 mmHg), fenilbiguanida (40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal) (-69 ± 4 mmHg, vs. controles: -69 ± 11 mmHg) ou KCN (40 $\mu\text{g}/\text{rato}$) (15 ± 2 mmHg, vs. controles: 16 ± 1 mmHg) (Tabela 2). Também não houve diferenças nas variações da FC entre os animais mantidos com ração e NaCl 0,9% e os animais mantidos com ração e água (controles) após a administração iv de fenilefrina (-41 ± 14 bpm, vs. controles: -126 ± 67 bpm), nitroprussiato de sódio (79 ± 51 bpm, vs. controles: 84 ± 15 bpm), fenilbiguanida (-332 ± 18 bpm, vs. controles: -355 ± 8 bpm) ou KCN (-31 ± 4 bpm, vs. controles: -33 ± 6 bpm) (Tabela 2).

Tabela 2: Alterações da PAM e FC produzidas pelas injeções iv de fenilefrina, nitroprussiato de sódio, fenilbiguanida ou cianeto de potássio em ratos mantidos com ração normal e água ou NaCl 0,9% por 14 dias.

	<u>Alterações da PAM (mmHg)</u>				<u>Alterações da FC (bpm)</u>			
	Fenil	NPS	PBG	KCN	Fenil	NPS	PBG	KCN
Ração + água	41 ± 6	-35 ± 4	-69 ± 11	16 ± 1	-126 ± 67	84 ± 15	-355 ± 8	-33 ± 6
Ração + NaCl 0,9%	37 ± 6	-47 ± 3	-69 ± 4	15 ± 2	-41 ± 14	79 ± 51	-332 ± 18	-31 ± 4

Os resultados estão expressos como média ± EPM. Fenil (fenilefrina, 5 µg/kg de peso corporal), NPS (nitroprussiato de sódio, 30 µg/kg de peso corporal), PBG (fenilbiguanida, 40 µg/kg de peso corporal), KCN (cianeto de potássio, 40 µg/rato). n = 5 animais/grupo.

3) Respostas cardiovasculares produzidas por injeções de diferentes doses de glutamato na área RVL em ratos mantidos com ração normal e água ou NaCl 0,9% por 14 dias

3.1) Alterações da PAM e FC produzidas pelas injeções na área RVL e ingestão diária

Os valores basais da PAM e FC dos animais mantidos com ração e NaCl 0,9% (109 ± 4 mmHg e 370 ± 11 bpm, respectivamente) não foram diferentes dos observados nos animais mantidos com ração e água (controles) (111 ± 3 mmHg e 370 ± 15 bpm, respectivamente).

As variações da PAM dos animais mantidos com ração normal e NaCl 0,9% por 14 dias não foram diferentes das observadas nos animais mantidos com ração normal e água após a injeção na região RVL de glutamato (0,1 nmol/100 nl) (11 ± 1

mmHg, vs. controles: 10 ± 4 mmHg), glutamato (1 nmol/100 nl) (17 ± 6 mmHg, vs. controles: 14 ± 4 mmHg), glutamato (3 nmol/100 nl) (24 ± 9 mmHg, vs. controles: 43 ± 11 mmHg) e glutamato (5 nmol/100 nl) (43 ± 6 mmHg, vs. controles: 56 ± 6 mmHg) (Figura 3A).

As variações na FC também não foram diferentes entre os animais mantidos com ração normal e NaCl 0,9% e os animais mantidos com ração normal e água após as injeções de glutamato (0,1 nmol/100 nl) (10 ± 7 bpm, vs. controles: -14 ± 11 bpm), glutamato (1 nmol/100 nl) (8 ± 9 bpm, vs. controles: -6 ± 19 bpm), glutamato (3 nmol/100 nl) (23 ± 10 bpm, vs. controles: -10 ± 22 bpm) e glutamato (5 nmol/100 nl) (5 ± 19 bpm, vs. controles: -38 ± 14 bpm) (Figura 3B).

A ingestão diária de NaCl 0,9% (47 ± 2 ml/dia) dos animais mantidos com ração normal e NaCl 0,9% foi maior do que a ingestão de água (31 ± 1 ml/dia) dos animais mantidos com ração normal e água (controles) ($t = 118$; $p < 0,001$) (Figura 3C).

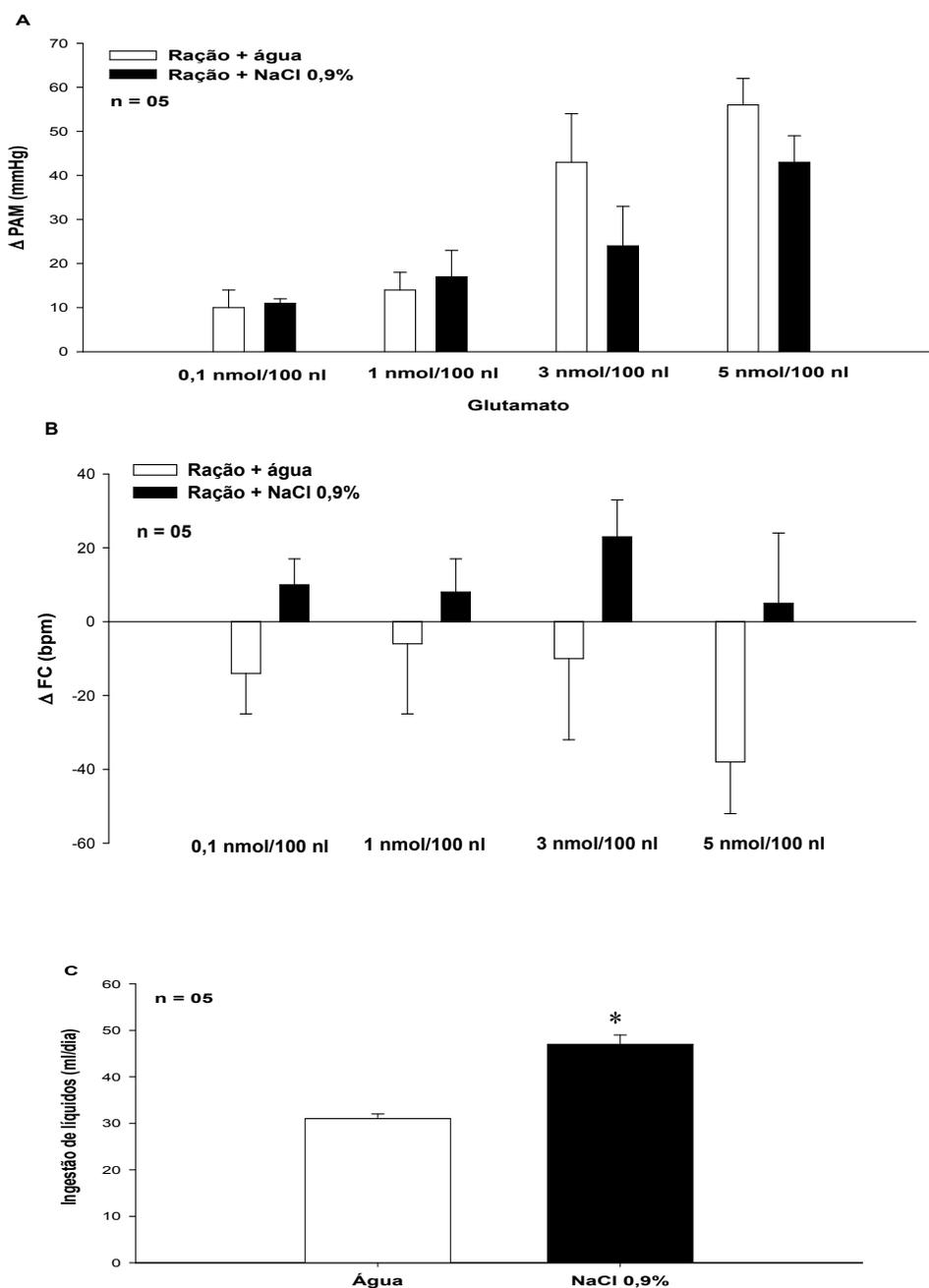


Figura 3: Alterações (A) da PAM (Δ PAM) e (B) da FC (Δ FC) produzidas pelas injeções de glutamato (0,1; 1; 3 e 5 nmol/100 nl) na área RVL em ratos acordados que foram mantidos com ração normal e água ou NaCl 0,9% durante 14 dias. (C) Ingestão diária de líquidos dos ratos que tiveram acesso a ração normal e água ou NaCl 0,9% durante 14 dias. Os resultados estão expressos como médias \pm EPM. n = número de animais.

3.2) Repostas reflexas cardiovasculares dos ratos mantidos com ração e NaCl 0,9% que receberam diferentes doses de glutamato na área RVL

Também neste caso, as variações da PAM dos animais mantidos com ração e NaCl 0,9% não foram diferentes das observadas nos animais mantidos com ração e água (controles) após a administração iv de fenilefrina (5 µg/kg de peso corporal) (44 ± 6 mmHg, vs. controles: 36 ± 6 mmHg), nitroprussiato de sódio (30 µg/kg de peso corporal) (-32 ± 2 mmHg, vs. controles: -30 ± 5 mmHg), fenilbiguanida (40 µg/kg de peso corporal) (-76 ± 11 mmHg, vs. controles: -105 ± 3 mmHg) ou KCN (40 µg/rato) (49 ± 9 mmHg, vs. controles: 54 ± 6 mmHg) (Tabela 4). As variações na FC também não foram diferentes após a administração de fenilefrina (-46 ± 14 bpm, vs. controles: -39 ± 30 bpm), nitroprussiato de sódio (91 ± 8 bpm, vs. controles: 107 ± 8 bpm), fenilbiguanida (-329 ± 14 bpm, vs. controles: -273 ± 9 bpm) ou cianeto de potássio (-53 ± 57 bpm, vs. controles: -70 ± 21 bpm) (Tabela 3).

Tabela 3: Alterações da PAM e FC produzidas pelas injeções iv de fenilefrina, nitroprussiato de sódio, fenilbiguanida ou cianeto de potássio em ratos mantidos com ração normal e água ou NaCl 0,9% por 14 dias

	<u>Alterações da PAM (mmHg)</u>				<u>Alterações da FC (bpm)</u>			
	Fenil	NPS	PBG	KCN	Fenil	NPS	PBG	KCN
Ração + água	36 ± 6	-30 ± 5	-105 ± 3	54 ± 6	-39 ± 30	107 ± 8	-273 ± 9	-70 ± 21
Ração + NaCl 0,9%	44 ± 6	-32 ± 2	-76 ± 11	49 ± 9	-46 ± 14	91 ± 8	-329 ± 14	-53 ± 57

Os resultados estão expressos como média ± EPM. Fenil (fenilefrina, 5 µg/kg de peso corporal), NPS (nitroprussiato de sódio, 30 µg/kg de peso corporal), PBG (fenilbiguanida, 40 µg/kg de peso corporal), KCN (cianeto de potássio, 40 µg/0,1 ml/rato). n = 5 animais/grupo.

4) Alterações na PAM e FC em animais que receberam injeções de glutamato na área RVL combinadas com salina ou carbacol injetados intracerebroventricularmente

4.1) Alterações da PAM e FC produzidas pelas injeções centrais

A PAM e a FC basais dos animais foram 117 ± 4 mmHg e 400 ± 17 bpm, respectivamente.

A resposta pressora produzida pela injeção unilateral de glutamato (5 nmol/100 nl) na área RVL aumentou após a injeção intracerebroventricular de carbacol (4 nmol/ 1 µl) (59 ± 3 mmHg, vs. controle: 37 ± 3 mmHg) (t = -5; p < 0,001) (Figura 4A), sem modificações significantes na frequência cardíaca (6 ± 12 bpm, vs. controle antes do carbacol: -26 ± 11 bpm) (Figura 4B). O carbacol (4 nmol/ 1 µl)

injetado intracerebroventricular produziu resposta pressora de 56 ± 3 mmHg 10 minutos após a injeção no VL. Quando glutamato injetado na área RVL foi combinado com carbacol intracerebroventricularmente, a PAM e FC dos animais imediatamente antes da injeção de glutamato foram 133 ± 3 mmHg e 358 ± 20 bpm, respectivamente.

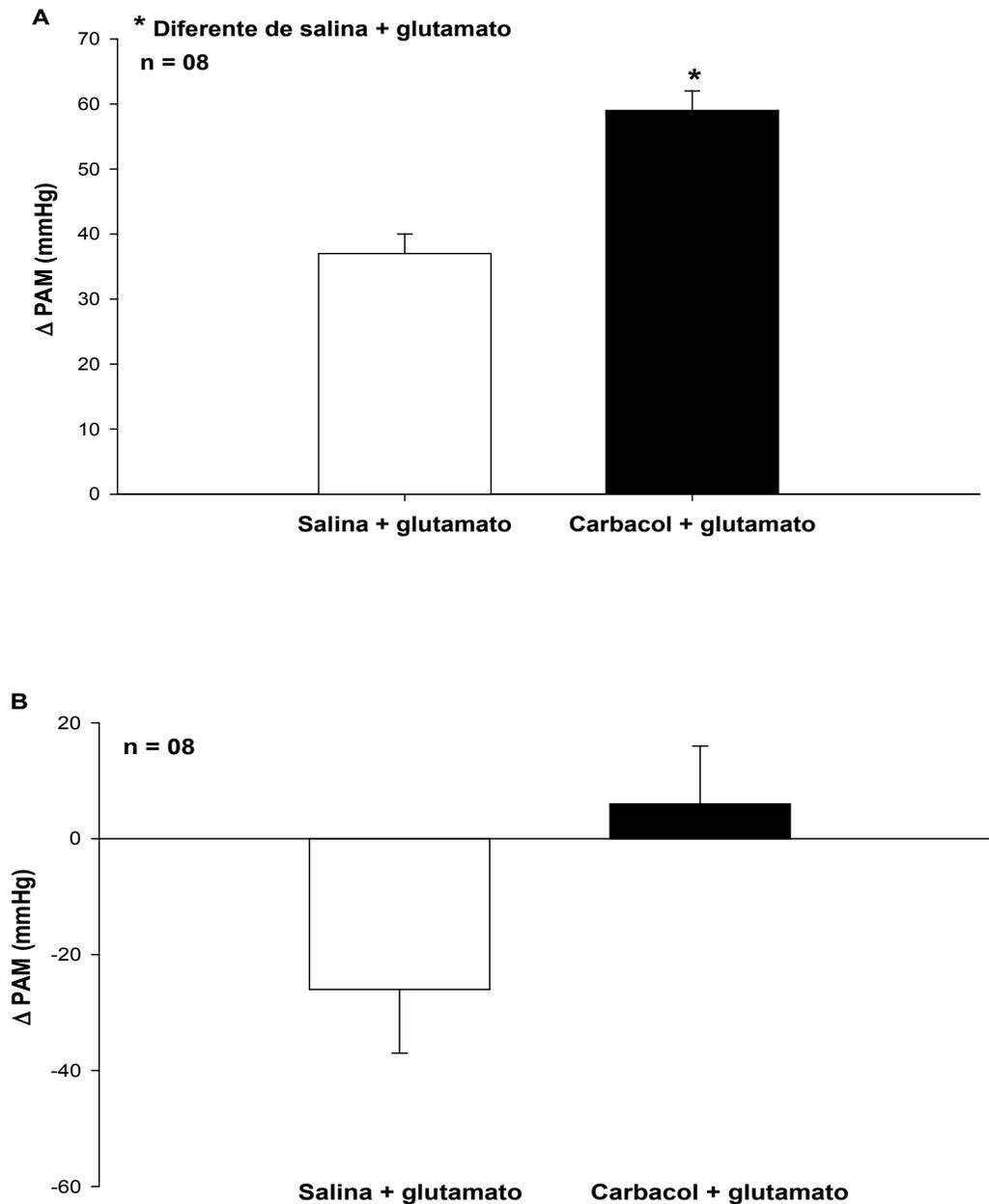


Figura 4: Alterações (A) da pressão arterial média (Δ PAM) e (B) da frequência cardíaca (Δ FC) produzidas pela injeção glutamato (5 nmol/100 nl) na área RVL combinado com injeções de salina ou carbacol (4 nmol/1 μ l) injetados intracerebroventricularmente em ratos acordados. Os resultados estão expressos como médias \pm EPM. n = número de animais.

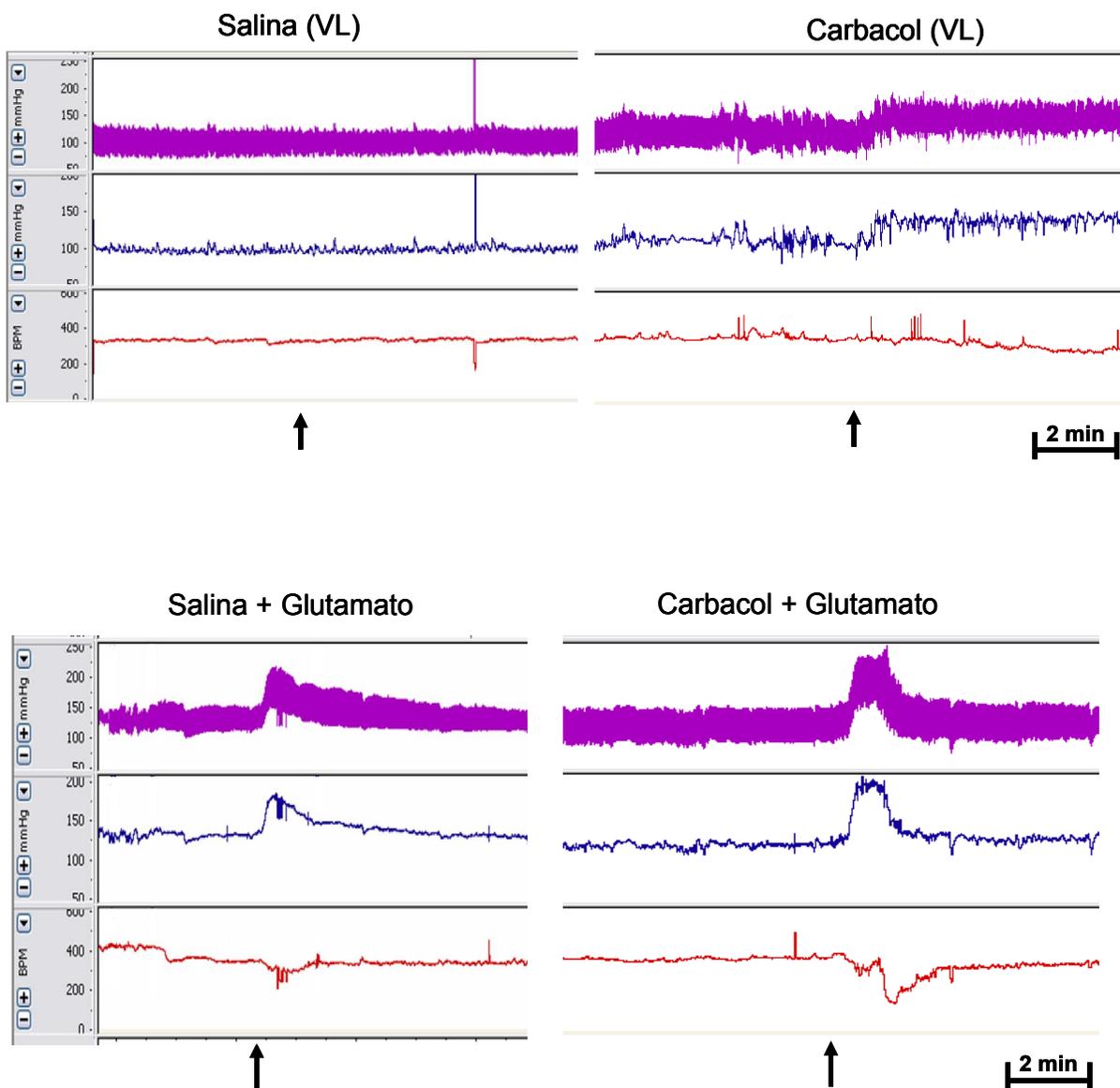


Figura 5: Registros representativos típicos da pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) antes e após a injeção de glutamato (5 nmol/100 nl) na área RVL em ratos acordados que receberam injeção intracerebroventricular de salina ou carbacol (4 nmol/ 1 µl) no VL.

4.2) Respostas reflexas cardiovasculares dos animais que receberam injeções de glutamato na área RVL combinadas com carbacol intracerebroventricularmente

As variações da PAM dos animais que receberam injeção de carbacol intracerebroventricular não foram diferentes das observadas nos animais que receberam salina na mesma região (controles) após a administração iv de fenilefrina (5 µg/kg de peso corporal) (40 ± 4 mmHg, vs. controles: 50 ± 5 mmHg), nitroprussiato de sódio (30 µg/kg de peso corporal) (-56 ± 2 mmHg, vs. controles: -50 ± 5 mmHg), fenilbiguanida (40 µg/kg de peso corporal) (-81 ± 9 mmHg, vs. controles: -71 ± 6 mmHg) ou KCN (40 µg/rato) (34 ± 5 mmHg, vs. controles: 44 ± 6 mmHg) (Tabela 6). Também não houve diferenças nas variações na FC entre os animais que receberam injeções intracerebroventriculares de carbacol ou salina (controles) após a administração iv de fenilefrina (-60 ± 11 bpm, vs. controles: -81 ± 13 bpm), nitroprussiato de sódio (110 ± 8 bpm, vs. controles: 92 ± 8 bpm), fenilbiguanida (-301 ± 13 bpm, vs. controles: -328 ± 22 bpm) ou cianeto de potássio (-98 ± 14 bpm, vs. controles: -116 ± 26 bpm) (Tabela 4).

Tabela 4: Alterações da PAM e FC induzidas pelas injeções iv de fenilefrina, nitroprussiato de sódio, fenilbiguanida ou cianeto de potássio após injeções intracerebroventriculares de salina ou carbacol combinado com injeção de glutamato na área RVL.

	<u>Alterações da PAM (mmHg)</u>				<u>Alterações da FC (bpm)</u>			
	Fenil	NPS	PBG	KCN	Fenil	NPS	PBG	KCN
Salina + Glutamato	50 ± 5	-50 ± 5	-71 ± 6	44 ± 6	-81 ± 13	92 ± 8	-328 ± 22	-116 ± 26
Carbacol + Glutamato	40 ± 4	-56 ± 2	-81 ± 9	34 ± 5	-60 ± 11	110 ± 8	-301 ± 13	-98 ± 14

Os resultados estão expressos como média ± EPM. Fenil (fenilefrina, 5 µg/kg de peso corporal), NPS (nitroprussiato de sódio, 30 µg/kg de peso corporal), PBG (fenilbiguanida, 40 µg/kg de peso corporal), KCN (cianeto de potássio, 40 µg/rato). n = 8 animais/grupo.

4.3) Alterações da PAM e FC produzidas pelas injeções de glutamato fora da área RVL combinado com injeções de salina ou carbacol no VL

Não houve diferença na resposta pressora produzida pela injeção de glutamato (5 nmol/100 nl) fora da área RVL após injeção prévia de carbacol (4 nmol/1 µl) no VL (5 ± 0,5 mmHg) comparado com a resposta de glutamato injetado fora da área RVL após injeções de salina no VL (4 ± 1 mmHg). Também não houve diferença nas variações da FC em resposta a injeções de glutamato fora da área RVL após injeções de carbacol ou salina no VL (-4 ± 12 bpm, vs. após veículo: -30 ± 15 bpm) (Tabela 5). Em nenhum dos animais que receberam injeções na área RVL ocorreu injeção fora do VL.

Tabela 5: Alterações da PAM e FC produzidas pelas injeções de glutamato fora da área RVL após injeções prévias de carbacol ou salina no VL.

	<u>Alterações da PAM (mmHg)</u>	<u>Alterações da FC (bpm)</u>
Salina	4 ± 1	-30 ± 15
Carbacol	5 ± 1	-4 ± 12

Os resultados estão apresentados como média ± EPM. n = 9. Carbacol (4 nmol/1 µl), glutamato (5 nmol/100 nl).

5) Alterações da PAM e FC em animais que receberam injeções de glutamato na área RVL combinadas com salina ou ANG II injetadas intracerebroventricularmente

5.1) Alterações da PAM e FC produzidas pelas injeções centrais

A PAM e a FC basais dos animais foram 117 ± 4 mmHg e 400 ± 17 bpm, respectivamente.

A resposta pressora produzida pela injeção unilateral de glutamato (5 nmol/100 nl) na área RVL aumentou após a injeção intracerebroventricular de ANG II (50 ng/1 µl) (68 ± 5 mmHg, vs. controle antes da ANG II: 37 ± 3 mmHg) (t = -6; p < 0,001) (Figura 6A), sem modificações significantes na frequência cardíaca (-13 ± 17 bpm, vs. controle antes da ANG II: -26 ± 11 bpm) (Figura 6B). A ANG II (50 ng/1 µl) injetada intracerebroventricularmente produziu resposta pressora de 44 ± 3 mmHg 10 minutos após a injeção no VL. Quando glutamato injetado na área RVL foi combinado com ANG II intracerebroventricularmente, a PAM e FC dos animais imediatamente

antes da injeção de glutamato foram 120 ± 2 mmHg e 367 ± 10 bpm, respectivamente.

A Figura 7 mostra registros representativos típicos de animais que receberam injeção de glutamato (5 nmol/100 nl) na área RVL após injeção intracerebroventricular de salina, carbacol (4 nmol/1 μ l) ou ANG II (50 ng/1 μ l).

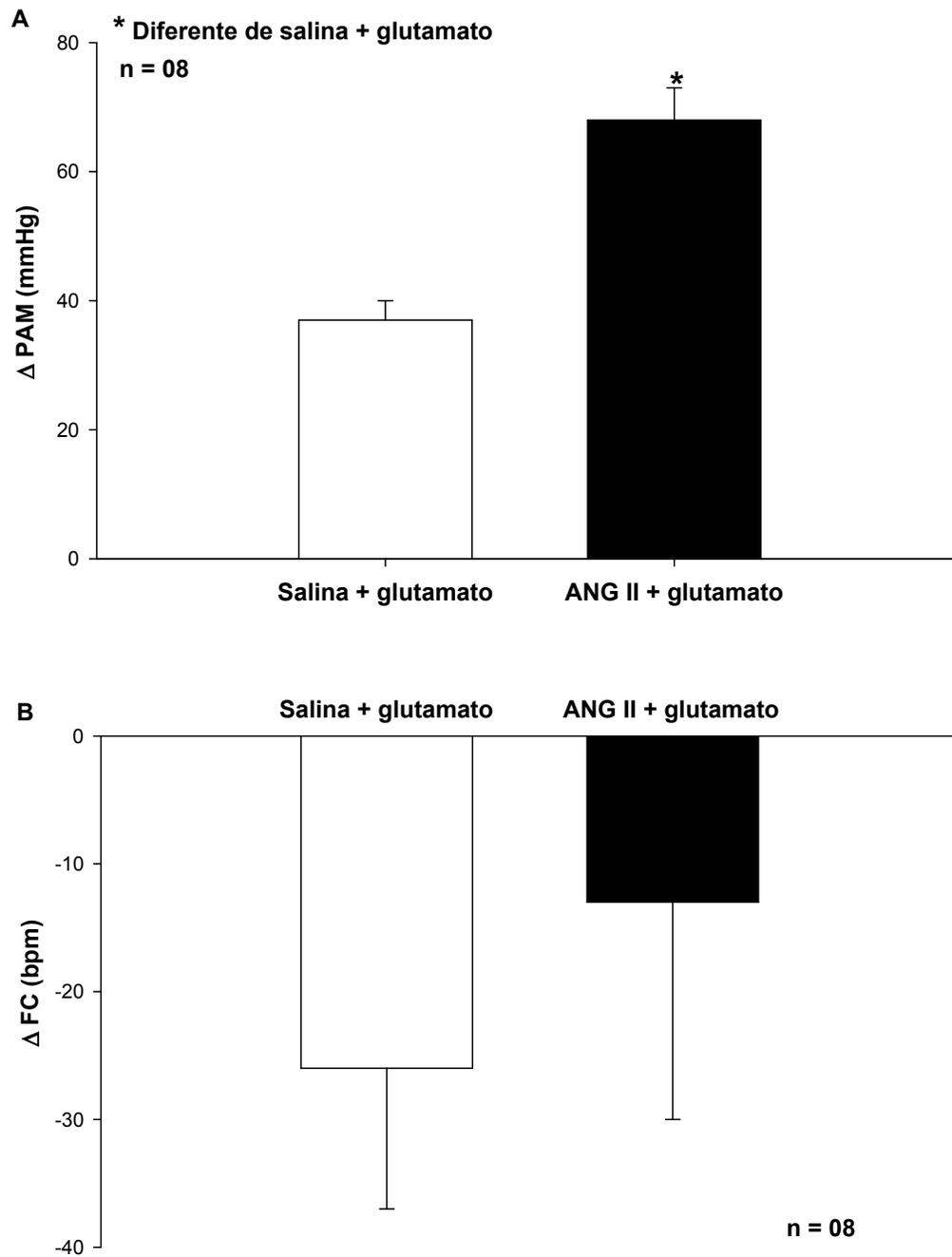


Figura 6: Alterações (A) da pressão arterial média (Δ PAM) e (B) da frequência cardíaca (Δ FC) produzidas pela injeção glutamato (5 nmol/100 nl) na área RVL combinada com injeções de salina ou ANG II (50 ng/1 μ l)

intracerebroventricularmente em ratos acordados. Os resultados estão expressos como médias \pm EPM. n = número de animais.

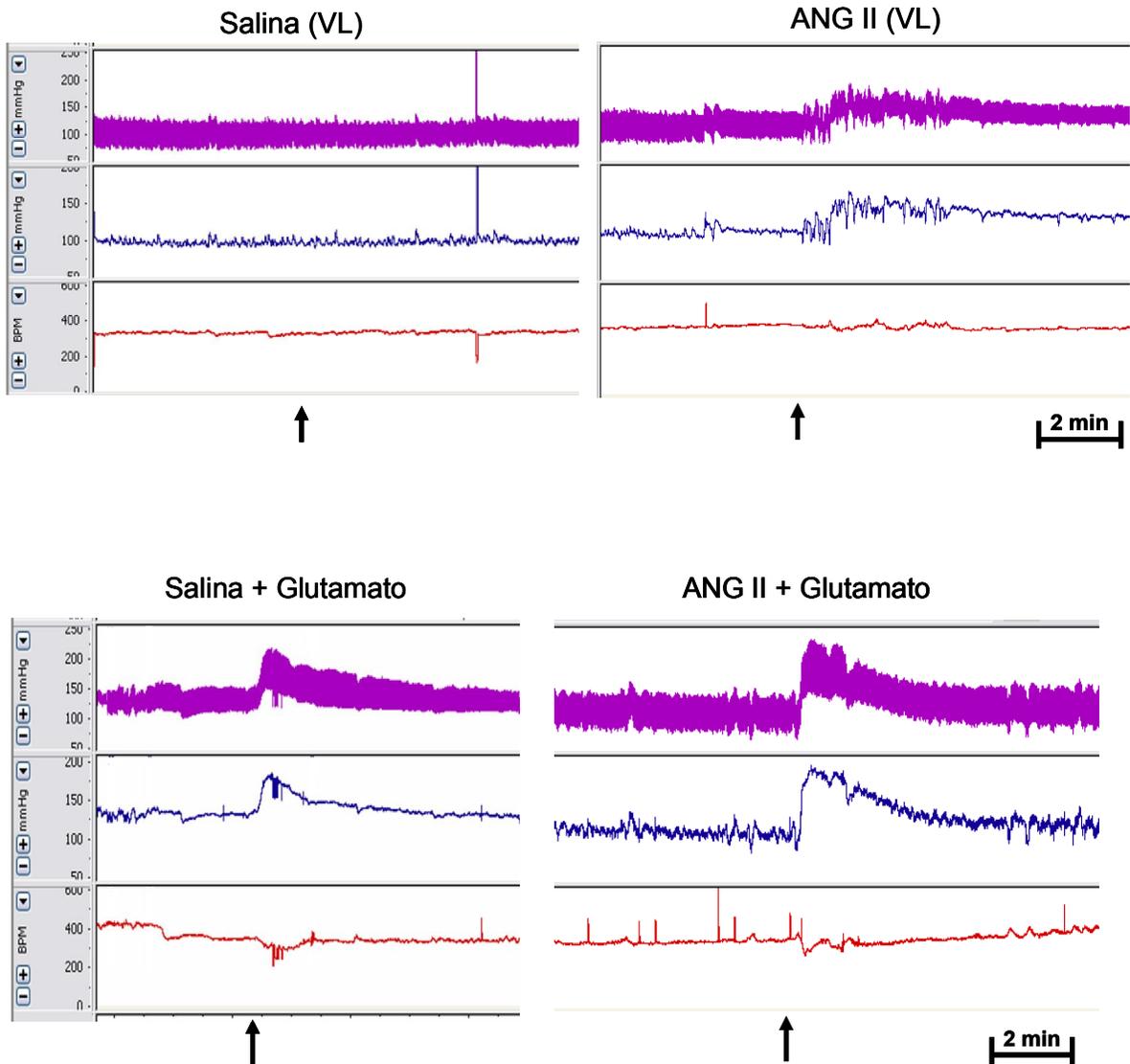


Figura 7: Registros representativos típicos da pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) antes e após a injeção de glutamato (5 nmol/100 nl) na área RVL em ratos acordados que receberam injeção intracerebroventricular de salina ou ANG II (50 ng/ 1 μ l) no VL.

5.2) Respostas reflexas cardiovasculares dos animais que receberam injeções de glutamato na área RVL combinadas ANG II intracerebroventricularmente

As variações da PAM dos animais que receberam injeção de ANG II intracerebroventricularmente não foram diferentes das observadas nos animais que receberam salina na mesma região (controles) após a administração iv de fenilefrina (5 µg/kg de peso corporal) (52 ± 2 mmHg, vs. controles: 50 ± 5 mmHg), nitroprussiato de sódio (30 µg/kg de peso corporal) (-50 ± 6 mmHg, vs. controles: -50 ± 5 mmHg), fenilbiguanida (40 µg/kg de peso corporal) (-81 ± 8 mmHg, vs. controles: -71 ± 6 mmHg) ou KCN (40 µg/rato) (48 ± 3 mmHg, vs. controles: 44 ± 6 mmHg) (Tabela 6). Também não houve diferenças nas variações na FC entre os animais que receberam injeções intracerebroventriculares de ANG II ou salina (controles) após a administração iv de fenilefrina (-83 ± 17 bpm, vs. controles: -81 ± 13 bpm), nitroprussiato de sódio (114 ± 12 bpm, vs. controles: 92 ± 8 bpm), fenilbiguanida (-327 ± 33 bpm, vs. controles: -328 ± 22 bpm) ou cianeto de potássio (-103 ± 8 bpm, vs. controles: -116 ± 26 bpm) (Tabela 6).

Tabela 6: Alterações da PAM e FC induzidas pelas injeções iv de fenilefrina, nitroprussiato de sódio, fenilbiguanida ou cianeto de potássio após injeções intracerebroventriculares de salina ou ANG II combinado com injeção de glutamato na área RVL.

	<u>Alterações da PAM (mmHg)</u>				<u>Alterações da FC (bpm)</u>			
	Fenil	NPS	PBG	KCN	Fenil	NPS	PBG	KCN
Salina + Glutamato	50 ± 5	-50 ± 5	-71 ± 6	44 ± 6	-81 ± 14	92 ± 8	-328 ± 22	-116 ± 26
ANG II + Glutamato	52 ± 2	-50 ± 6	-81 ± 8	48 ± 3	-83 ± 17	114 ± 12	-327 ± 33	-103 ± 8

Os resultados estão expressos como média ± EPM. Fenil (fenilefrina, 5 µg/kg de peso corporal), NPS (nitroprussiato de sódio, 30 µg/kg de peso corporal), PBG (fenilbiguanida, 40 µg/kg de peso corporal), KCN (cianeto de potássio, 40 µg/rato). n = 8 animais/grupo.

5.3) *Alterações da PAM e FC produzidas pelas injeções de glutamato fora da área RVL combinadas com injeções de salina ou ANG II no VL*

Não houve diferença na resposta pressora produzida pela injeção de glutamato (5 nmol/100 nl) fora da área RVL após injeção prévia de ANG II (50 ng/1 µl) no VL (4 ± 0,5 mmHg) comparado com a resposta de glutamato injetado fora da área RVL após injeções de salina no VL (4 ± 1 mmHg) (Tabela 7). Também não houve diferença nas variações da FC em resposta a injeções de glutamato fora da área RVL após injeções de ANG II ou salina no VL (-21 ± 12 bpm, vs. após veículo: -30 ± 15 bpm) (Tabela 7).

Tabela 7: Alterações da PAM e FC produzidas pelas injeções de glutamato fora da área RVL após injeções prévias de ANG II ou salina no VL.

	<u>Alterações da PAM (mmHg)</u>	<u>Alterações da FC (bpm)</u>
Salina	4 ± 1	-30 ± 15
ANG II	4 ± 0,5	-21 ± 12

Os resultados estão apresentados como média ± EPM. n = 9. ANG II (50 ng/1 µl), glutamato (5 nmol/100 nl).

6) Respostas cardiovasculares produzidas pela combinação de moxonidina e glutamato na área RVL

6.1) Alterações da PAM e FC produzidas pelas injeções na área RVL

A PAM e a FC basais dos animais foram 112 ± 4 mmHg e 393 ± 30 bpm, respectivamente.

A injeção unilateral de moxonidina (5 nmol/100 nl) na área RVL reduziu a resposta pressora produzida pela injeção de glutamato (5 nmol/100 nl) na mesma área (23 ± 3 mmHg, vs. controle antes da moxonidina: 45 ± 6 mmHg) (t = 4; p < 0,001) (Figura 8A), sem diferenças significantes nas variações da FC (-7 ± 18 bpm, vs. controle antes da moxonidina: -28 ± 15 bpm) (Figura 8B).

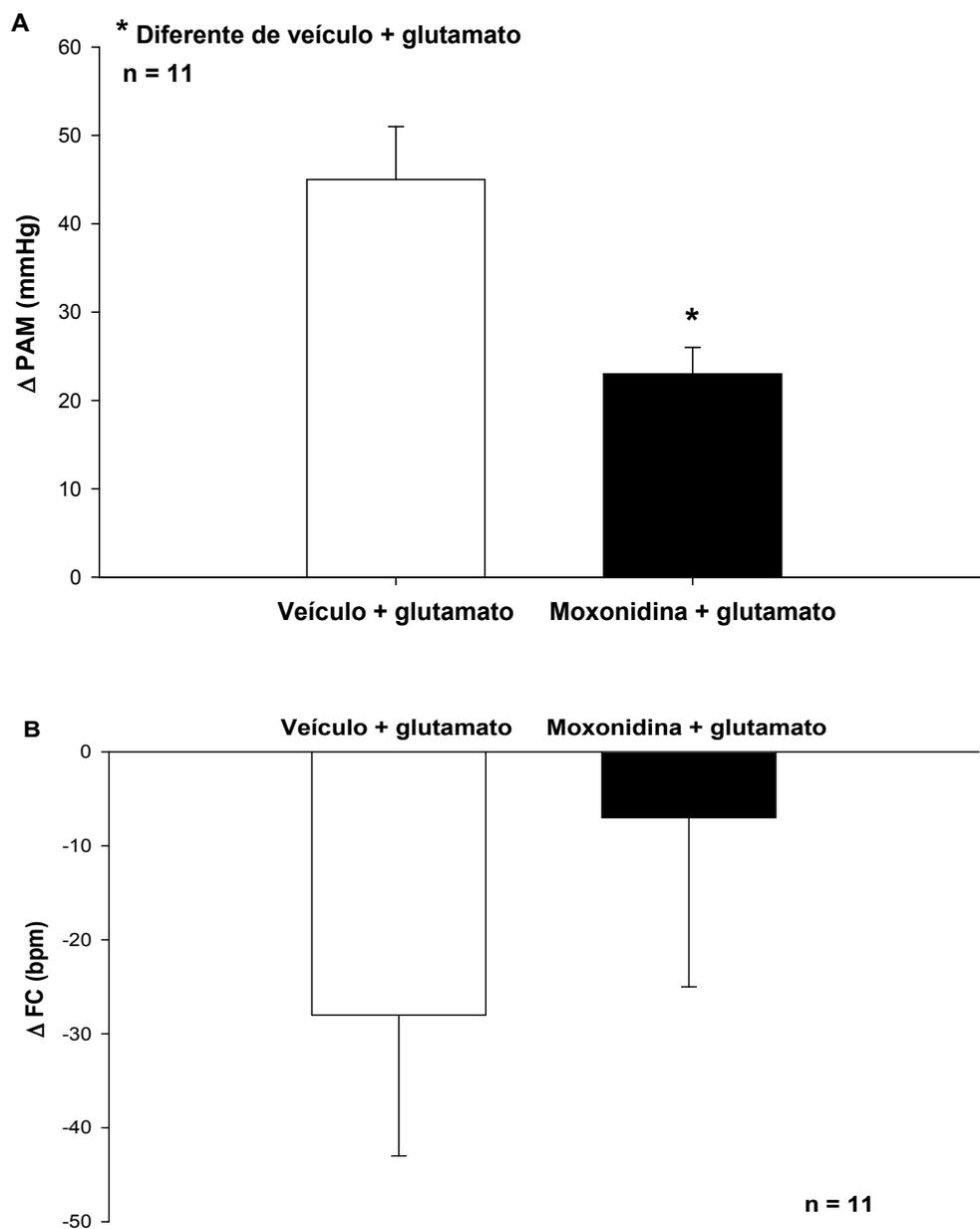


Figura 8: Alterações (A) da pressão arterial média (Δ PAM) e (B) da frequência cardíaca (Δ FC) produzidas pela injeção glutamato (5 nmol/100 nl) na área RVL combinada com injeções de veículo ou moxonidina (5 nmol/100 nl) na mesma área de ratos acordados. Os resultados estão expressos como médias \pm EPM. n = número de animais.

6.2) Alterações da PAM e FC produzidas por injeções de glutamato combinado com injeções de veículo ou moxonidina fora da área RVL

Nesses animais, a resposta pressora ou as alterações de FC produzidas pela injeção de glutamato (5 nmol/100 nl) fora da área RVL também foram muito pequenas tanto após a injeção prévia de moxonidina (5 nmol/100 nl) na mesma área (5 ± 1 mmHg e -10 ± 8 bpm, respectivamente) como após veículo (6 ± 1 mmHg e -7 ± 8 bpm, respectivamente) (Tabela 8).

Tabela 8: Alterações da PAM e FC produzidas pelas injeções de glutamato combinado com injeções prévias de moxonidina ou veículo fora da área RVL

	<u>Alterações da PAM (mmHg)</u>	<u>Alterações da FC (bpm)</u>
Veículo	6 ± 1	-7 ± 8
Moxonidina	5 ± 1	-10 ± 8

Os resultados estão apresentados como média \pm EPM. n = 11. Glutamato (5 nmol/100 nl)

7– Respostas cardiovasculares produzidas pela combinação de carbacol no VL e moxonidina bilateralmente na área RVL

7.1) Alterações da PAM e FC produzidas pelas injeções centrais

A PAM e a FC basais dos animais foram 121 ± 4 mmHg e 408 ± 16 bpm, respectivamente.

Cinco, 10 e 15 min após as injeções bilaterais de moxonidina (5 nmol/100 nl) na área RVL ocorreu redução da PAM (95 ± 5 , 87 ± 5 e 82 ± 4 mmHg, respectivamente) em comparação com a PAM dos controles tratados com veículo na

área RVL nos mesmos tempos (118 ± 6 , 116 ± 6 e 117 ± 6 mmHg, respectivamente) ou com valor imediatamente antes da injeção de moxonidina (tempo 0: 122 ± 4 mmHg) (Figura 9A). Nos mesmos tempos, as injeções de moxonidina da área RVL também reduziram a FC (334 ± 15 , 323 ± 15 e 313 ± 14 bpm, respectivamente) em comparação com os controles tratados com veículo na área RVL (375 ± 16 , 374 ± 19 e 381 ± 18 bpm, respectivamente) (Figura 9B).

Inicialmente (2 minutos após a injeção de carbacol), as injeções prévias de moxonidina (5 nmol/100 nl) na área RVL reduziram a resposta pressora produzida pela injeção de carbacol (4 nmol/1 μ l) no VL (17 ± 3 mmHg, vs. veículo: 35 ± 2 mmHg) [F (1, 10) = 15,36; p < 0,005] (Figura 10). Entretanto, mais tardiamente (de 8 a 18 min após a injeção de carbacol), as injeções prévias de moxonidina na área RVL aumentaram a resposta pressora produzida pela injeção de carbacol no VL (8': 47 ± 4 mmHg; 10': 53 ± 4 mmHg; 12': 59 ± 4 mmHg; 14': 49 ± 3 mmHg; 16': 33 ± 4 mmHg; 18': 18 ± 3 mmHg) em comparação com o aumento de pressão produzido pelo carbacol no VL após injeção de veículo na área RVL (8': 30 ± 2 mmHg; 10': 33 ± 3 mmHg; 12': 29 ± 3 mmHg; 14': 21 ± 3 mmHg; 16': 13 ± 3 mmHg; 18': 9 ± 2 mmHg) (Figura 10A). Além disso, após o tratamento com moxonidina na área RVL, o pico da resposta pressora do carbacol injetado no VL ocorreu mais tardiamente (12 min após a injeção) e foi maior (61 ± 3 mmHg) comparado ao pico da resposta pressora após veículo na área RVL (4 min e 42 ± 2 mmHg) (t = -3,775; p < 0,001).

Não houve modificações significantes da FC em ratos tratados com a injeção de carbacol no VL combinada com moxonidina injetada na área RVL (Tempo 2': 11 ± 7 bpm; 4': 17 ± 8 bpm; 6': 10 ± 8 bpm; 8': 4 ± 10 bpm; 10': -2 ± 11 bpm; 12': -3 ± 10 bpm; 14': -10 ± 9 bpm; 16': -19 ± 9 bpm; 18': -14 ± 12 bpm e 20': -10 ± 10 bpm) em

comparação com carbacol no VL combinado com a injeção de veículo na área RVL (Tempo 2': -17 ± 18 bpm; 4': -8 ± 23 bpm; 6': -17 ± 24 bpm; 8': -22 ± 21 bpm; 10': 1 ± 28 bpm 12': -20 ± 25 bpm; 14': -9 ± 23 bpm; 16': -14 ± 19 bpm; 18': 20 ± 15 bpm e 20': 30 ± 20 bpm) [(F (1, 10) = 0,41; p > 0,05)] (Figura 10B).

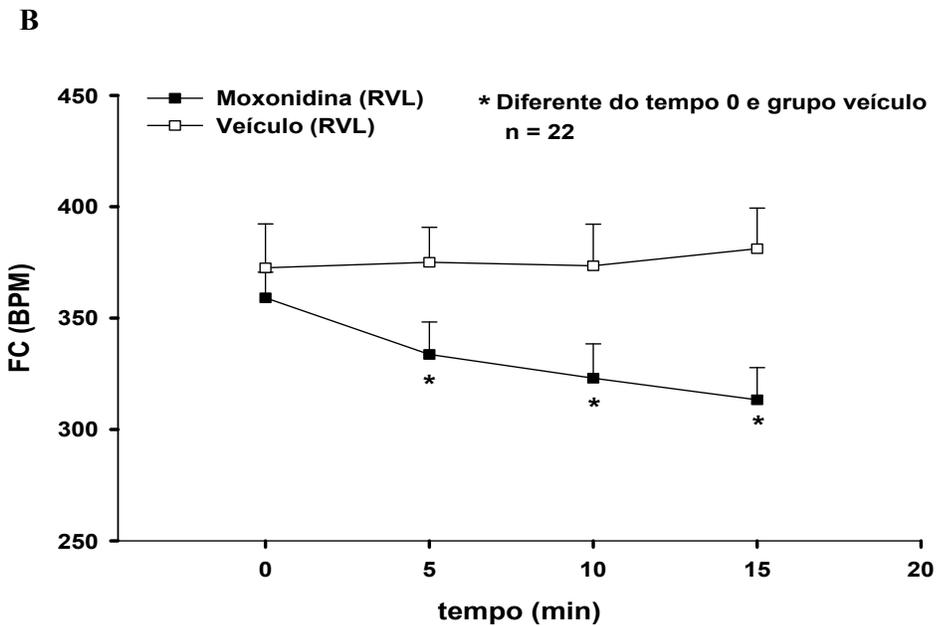
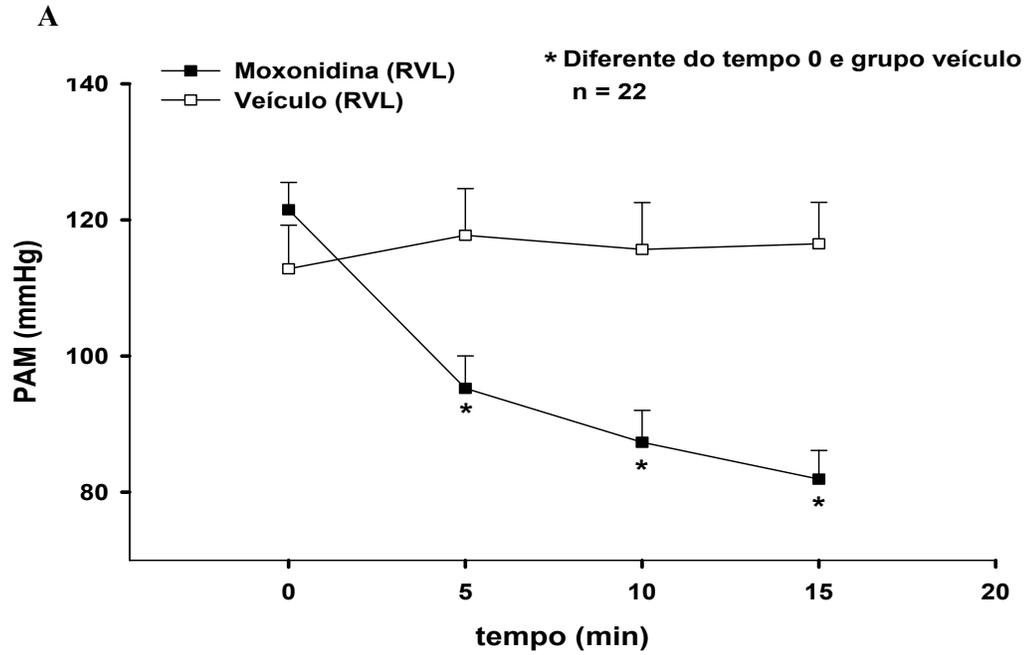


Figura 9: Alterações da PAM (A) e (B) da FC após as injeções bilaterais de veículo ou moxonidina (5 nmol/100 nl) na área RVL. Os resultados estão expressos como médias \pm EPM. n = número de animais.

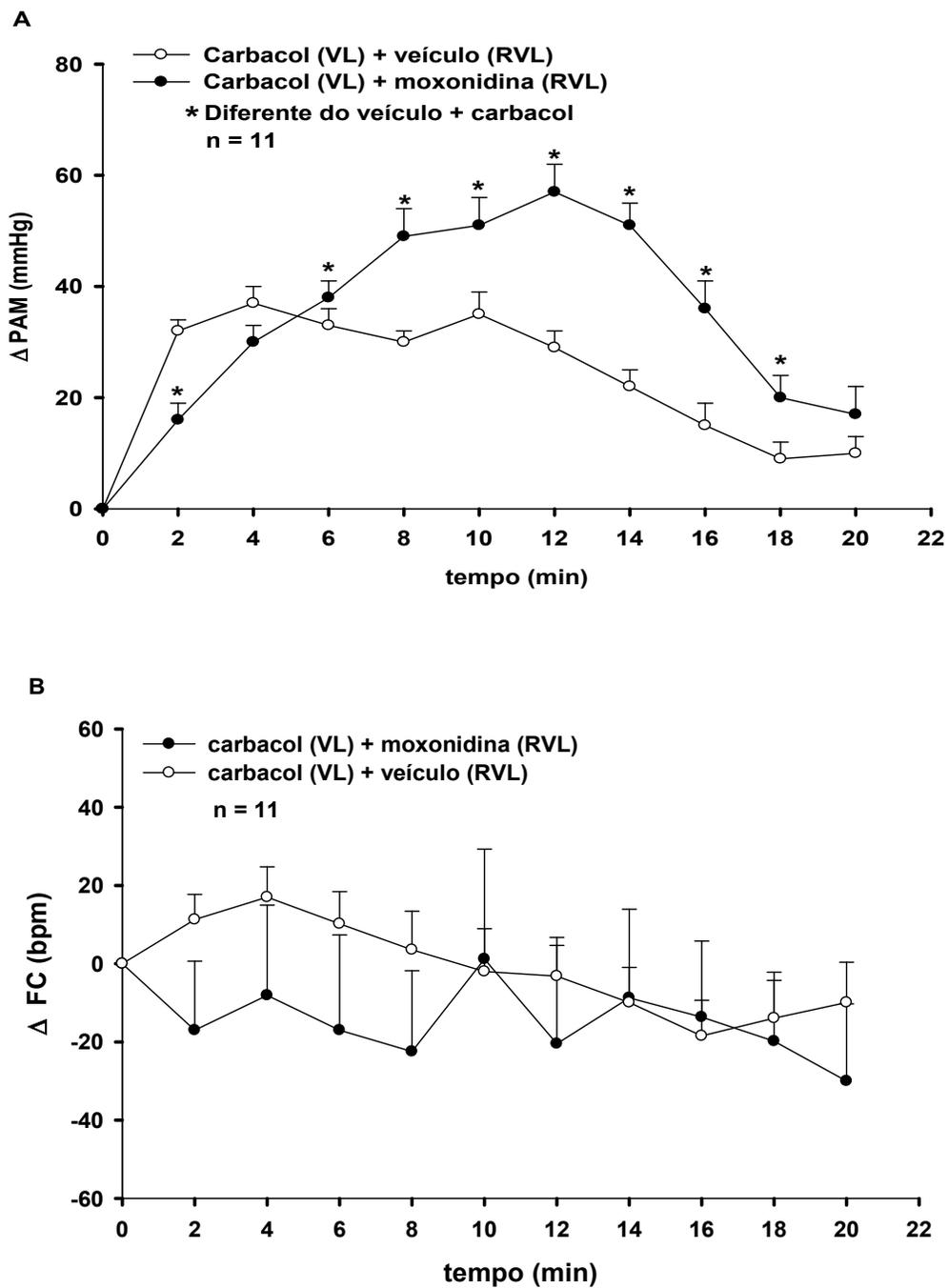


Figura 10: Alterações temporais (A) da pressão arterial média (Δ PAM) e (B) da frequência cardíaca (Δ FC) produzidas pela injeção de carbaccol (4 nmol/1 μ l) no VL em ratos com injeções bilaterais de veículo ou moxonidina (5 nmol/100 nl) na área RVL. Os resultados estão expressos como médias \pm EPM. n = número de animais.

7.2) Respostas reflexas cardiovasculares dos ratos tratados com moxonidina na área RVL combinada com carbacol no VL

As variações da PAM (Figura 11A) em ratos tratados com injeções bilaterais de veículo ou moxonidina na área RVL foram semelhantes após a administração iv de fenilefrina (5 µg/kg de peso corporal) (48 ± 4 mmHg, vs. veículo: 43 ± 2 mmHg), nitroprussiato de sódio (30 µg/kg de peso corporal) (-57 ± 4 mmHg vs. veículo: -53 ± 4 mmHg) ou fenilbiguanida (PBG, 40 µg/kg de peso corporal) (-90 ± 8 mmHg, vs. veículo: -95 ± 6 mmHg). Porém, a resposta pressora produzida pelo cianeto de potássio (40 µg/rato) iv após as injeções de moxonidina na área RVL (19 ± 4 mmHg) apresentou uma redução ($t = 2,931$; $P = 0,010$, para $n = 11$) comparada com a produzida após as injeções de veículo na mesma área (34 ± 4 mmHg) (Figura 11A).

As variações na FC (Figura 11B) após os mesmos tratamentos na área RVL não foram diferentes após a administração iv das mesmas drogas: fenilefrina (-58 ± 9 bpm, vs. veículo: -75 ± 11 bpm), nitroprussiato de sódio (112 ± 12 bpm, vs. veículo: 115 ± 10 bpm), ou cianeto de potássio (-76 ± 11 bpm, vs. veículo: -94 ± 13 bpm). Porém, a resposta bradicárdica produzida pela fenilbiguanida após as injeções de moxonidina na área RVL (-272 ± 17 bpm) apresentou uma redução ($t = 2,406$; $P = 0,028$, para $n = 11$) comparada com a produzida após as injeções de veículo na mesma área (-347 ± 25 bpm).

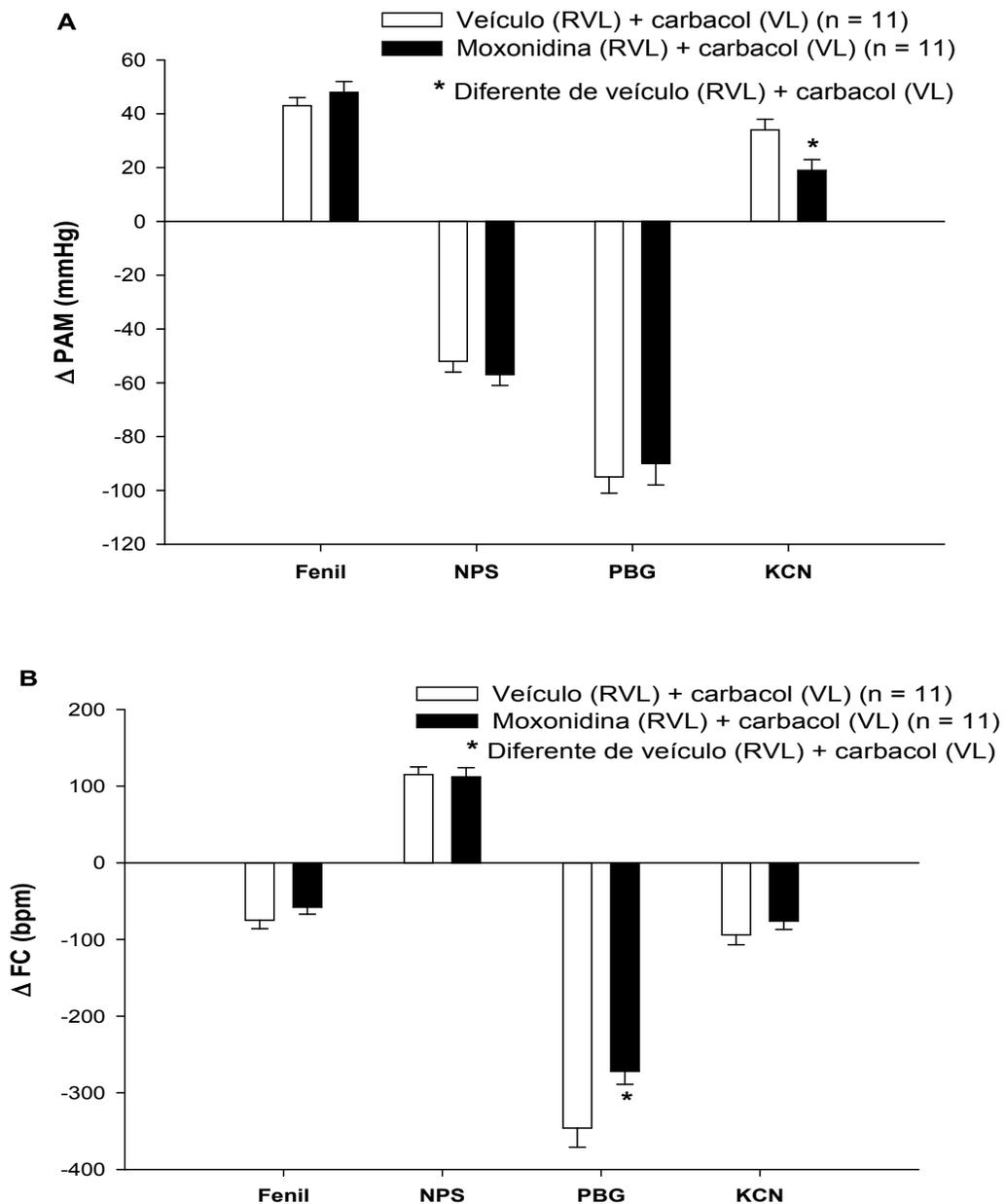


Figura 11: Alterações da PAM e FC induzidas pelas injeções iv de fenilefrina (fenil, 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal), nitroprussiato de sódio (NPS, 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal), fenilbiguanida (PBG, 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal), cianeto de potássio (KCN, 40 $\mu\text{g}/\text{rato}$) em ratos tratados com injeções bilaterais de veículo ou moxonidina na área RVL combinadas com carbacol injetado no VL. Os resultados estão representados como média \pm EPM.

7.3) Alterações da PAM e FC produzidas pelas injeções de carbacol no VL combinadas com injeções de veículo ou moxonidina fora da área RVL

Não houve diferença na resposta pressora produzida pela injeção de carbacol (4 nmol/1 µl) no VL após injeção prévia de moxonidina (5 nmol/100 nl) fora da área RVL (45 ± 3 mmHg) comparado com a resposta do carbacol injetado no VL após injeções de veículo fora da área RVL (41 ± 2 mmHg). Também não houve diferença nas variações da FC em resposta a injeções de carbacol no VL após injeções de moxonidina e veículo fora da área RVL (22 ± 10 bpm, vs. após veículo: 19 ± 8 bpm) (Tabela 9).

Tabela 9: Alterações da PAM e FC produzidas pelas injeções de carbacol no VL após injeções prévias de moxonidina ou veículo fora da área RVL.

	<u>Alterações da PAM (mmHg)</u>	<u>Alterações da FC (bpm)</u>
Veículo	41 ± 2	19 ± 8
Moxonidina	45 ± 3	22 ± 10

Os resultados estão apresentados como média ± EPM. n = 10. Carbacol (4 nmol/1 µl), moxonidina (5 nmol/100 nl).

8) Respostas cardiovasculares produzidas pela injeção de carbacol no VL em ratos tratados com moxonidina injetada bilateralmente na área RVL combinada com antagonista vasopressinérgico injetado iv.

8.1) Alterações da PAM e FC produzidas pelo carbacol no VL em ratos tratados com antagonista de AVP iv + moxonidina na área RVL

A PAM e a FC basais dos animais que foram tratados com carbacol no VL combinado com o antagonista de AVP iv + moxonidina na área RVL foram 118 ± 3 mmHg e 404 ± 12 bpm, respectivamente.

As injeções bilaterais de moxonidina (5 nmol/100 nl) na área RVL também nestes ratos causaram redução da PAM quando comparado com o valor pré-injeção ou aos valores controles. Em relação à frequência cardíaca foram observadas alterações após as injeções de moxonidina da área RVL apenas quando comparados ao controle.

Novamente observou-se que as injeções prévias de moxonidina (5 nmol/100 nl) na área RVL reduziram a resposta pressora inicial (2 minutos) produzida pela injeção de carbacol (4 nmol/1 μ l) no VL (21 ± 4 mmHg, vs. veículo: 40 ± 2 mmHg), enquanto que mais tardiamente (de 8 a 18 min após a injeção de carbacol) levou a uma potenciação da resposta pressora do carbacol (63 ± 4 mmHg, vs. veículo: 44 ± 2 mmHg) [F (3, 260) = 51,69; p < 0,001] (Figura 12A).

A injeção iv prévia do antagonista de receptores V_1 de vasopressina (10 μ g/kg de peso corporal) reduziu a resposta pressora tardia (de 8 a 18 min) produzida pela injeção de carbacol (4 nmol/1 μ l) no VL em ratos tratados com injeções de moxonidina (5 nmol/100 nl) na área RVL (8': 22 ± 3 mmHg; 10': 19 ± 3 mmHg; 12': 18 ± 3 mmHg; 14': 18 ± 3 mmHg; 16': 14 ± 3 mmHg; 18': 12 ± 3 mmHg) ou tratados com

veículo na área RVL (8': 20 ± 3 mmHg; 10': 16 ± 3 mmHg; 12': 14 ± 3 mmHg; 14': 13 ± 3 mmHg; 16': 12 ± 3 mmHg; 18': 12 ± 3 mmHg). Nos ratos tratados com antagonista de AVP também ocorreu redução da resposta pressora inicial (2 minutos) em ratos tratados com moxonidina na área RVL (17 ± 3 mmHg) (Figura 12A). Não houve diferença na resposta tardia do carbacol entre ratos que receberam injeção de veículo ou moxonidina na área RVL combinada com antagonista de vasopressina iv (Figura 12A).

As modificações de frequência cardíaca que ocorreram após a injeção de carbacol no VL combinada com moxonidina ou veículo injetado na área RVL em ratos que receberam ou não antagonista de vasopressina iv foram semelhantes [F (3, 260) = 1,33; $p > 0,05$] (Figura 12B).

O pico da resposta pressora do carbacol injetado no VL em ratos tratados com moxonidina na área RVL que foi maior (63 ± 4 mmHg) do que aquele dos ratos tratados com veículo na área RVL (43 ± 2 mmHg), foi reduzido para valores semelhantes em ratos com bloqueio dos receptores V_1 de vasopressina tratados com moxonidina (26 ± 2 mmHg) ou veículo na área RVL (32 ± 2 mmHg) [F (1,4) = 22,47; $p < 0,001$] (Figura 13).

A Figura 14 mostra a evolução temporal da PAM dos ratos antes e após os diferentes tratamentos, ou seja, salina ou antagonista de vasopressina iv + veículo ou moxonidina no RVL + carbacol no VL. Assim, antes da injeção de salina ou antagonista de vasopressina a pressão arterial não é diferente entre os grupos (137 ± 3 mmHg; 120 ± 2 mmHg; 129 ± 3 mmHg e 125 ± 3 mmHg). No momento da injeção de veículo ou moxonidina na área RVL, o grupo que recebeu antagonista de vasopressina iv combinada com veículo na área RVL apresentou PAM (113 ± 6 mmHg) menor do que o grupo tratado com salina iv + veículo na área RVL, porém a

PAM não foi diferente daquela do mesmo grupo antes da injeção de antagonista de vasopressina iv. No momento da injeção de carbacol no VL os grupos que receberam moxonidina na área RVL apresentaram PAM menor (116 ± 3 mmHg e 99 ± 4 mmHg) do que o grupo que recebeu veículo nesta mesma área combinada com salina iv (137 ± 5 mmHg) [F (3, 104) = 19,71; $p < 0,001$]. O pico da PAM após a injeção de carbacol foi menor nos grupos que receberam antagonista de vasopressina iv (150 ± 3 mmHg e 125 ± 4 mmHg) dos que receberam salina iv (181 ± 3 mmHg e 179 ± 2 mmHg).

O tratamento com antagonista de vasopressina iv aboliu a resposta pressora da vasopressina (12,5 ng/rato) injetada iv (1 ± 1 mmHg, vs. controle: 51 ± 4 mmHg).

A Figura 15A mostra registros representativos típicos de um animal do grupo que recebeu injeções de carbacol no VL combinado com veículo ou moxonidina (5 nmol/100 nl) injetados na área RVL. A Figura 15B mostra registros representativos típicos de um animal do grupo que recebeu injeções de carbacol no VL após o tratamento com veículo ou moxonidina (5 nmol/100 nl) injetados na área RVL combinado com antagonista de receptores vasopressinérgico V_1 (10 μ g/kg de peso corporal) iv.

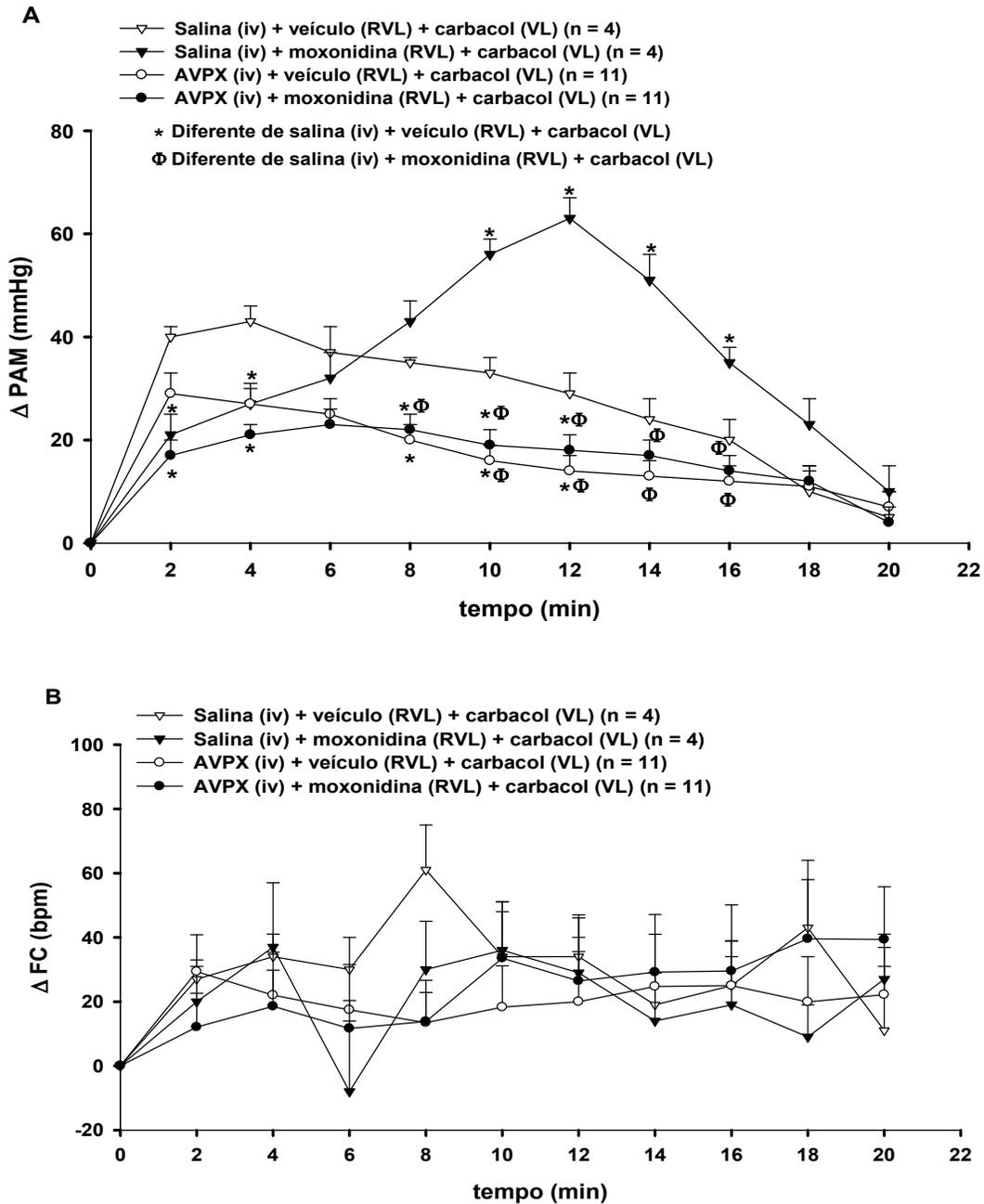


Figura 12: Alterações temporais (A) da pressão arterial média (Δ PAM) e (B) da frequência cardíaca (Δ FC) produzidas pela injeção de carbacol (4 nmol/1 μ l) no VL em ratos que receberam tratamento prévio com antagonista vasopressinérgico (10 μ g/kg de peso corporal) ou salina iv combinado com injeções bilaterais de veículo ou moxonidina (5 nmol/100 nl) na área RVL. Os resultados estão expressos como médias \pm EPM. n = número de animais.

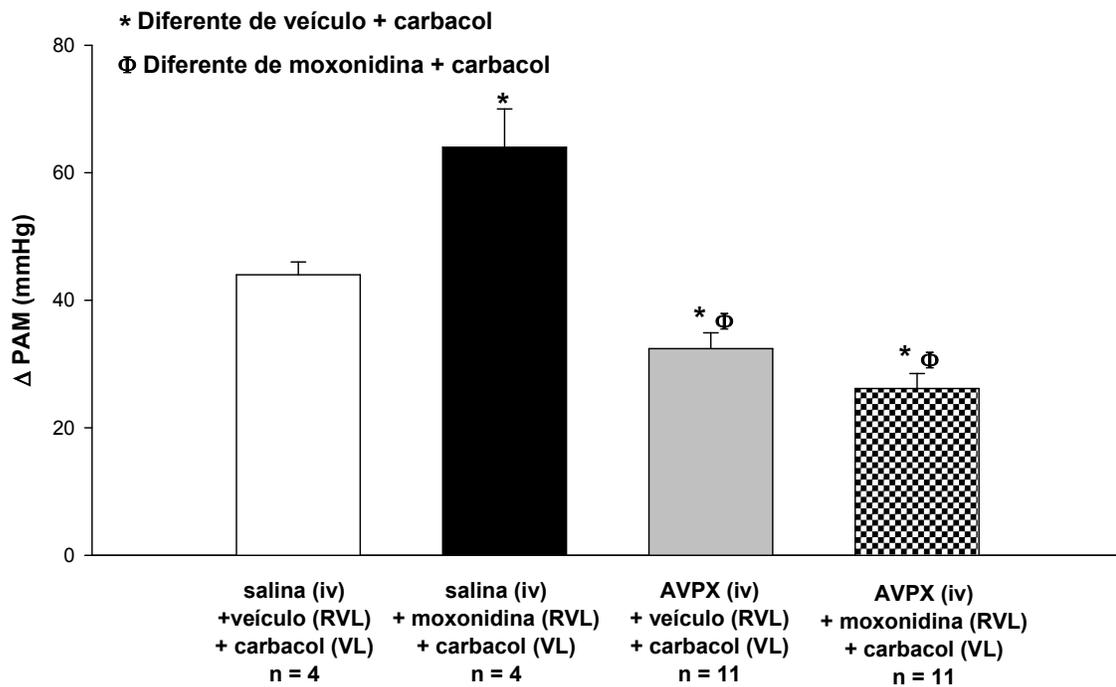


Figura 13: Aumento máximo da pressão arterial média (Δ PAM) produzido pela injeção carbacol (4 nmol/1 μ l) no VL em ratos que receberam tratamento prévio com salina ou antagonista de receptores vasopressinérgico V_1 (10 μ g/kg de peso corporal) iv combinado com injeções bilaterais de veículo ou moxonidina (5 nmol/100 nl) na área RVL. Os resultados estão representados como média \pm EPM. n = número de animais.

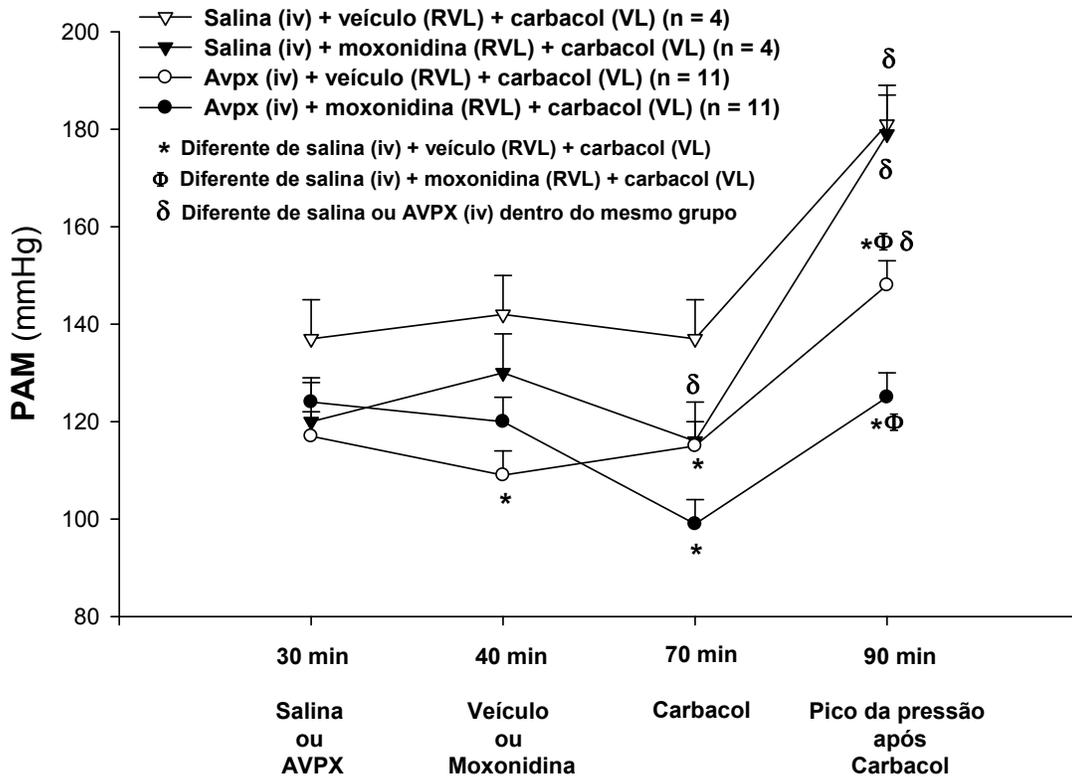


Figura 14: Valores basais da pressão arterial média (PAM) em ratos tratados com injeções de salina ou antagonista de receptores vasopressinérgicos V_1 (10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal) iv combinadas com veículo ou moxonidina (5 nmol/100 nl) injetados na área RVL e carbacol (4 nmol/1 μl) no VL. Os resultados estão representados como média \pm EPM. n = número de ratos.

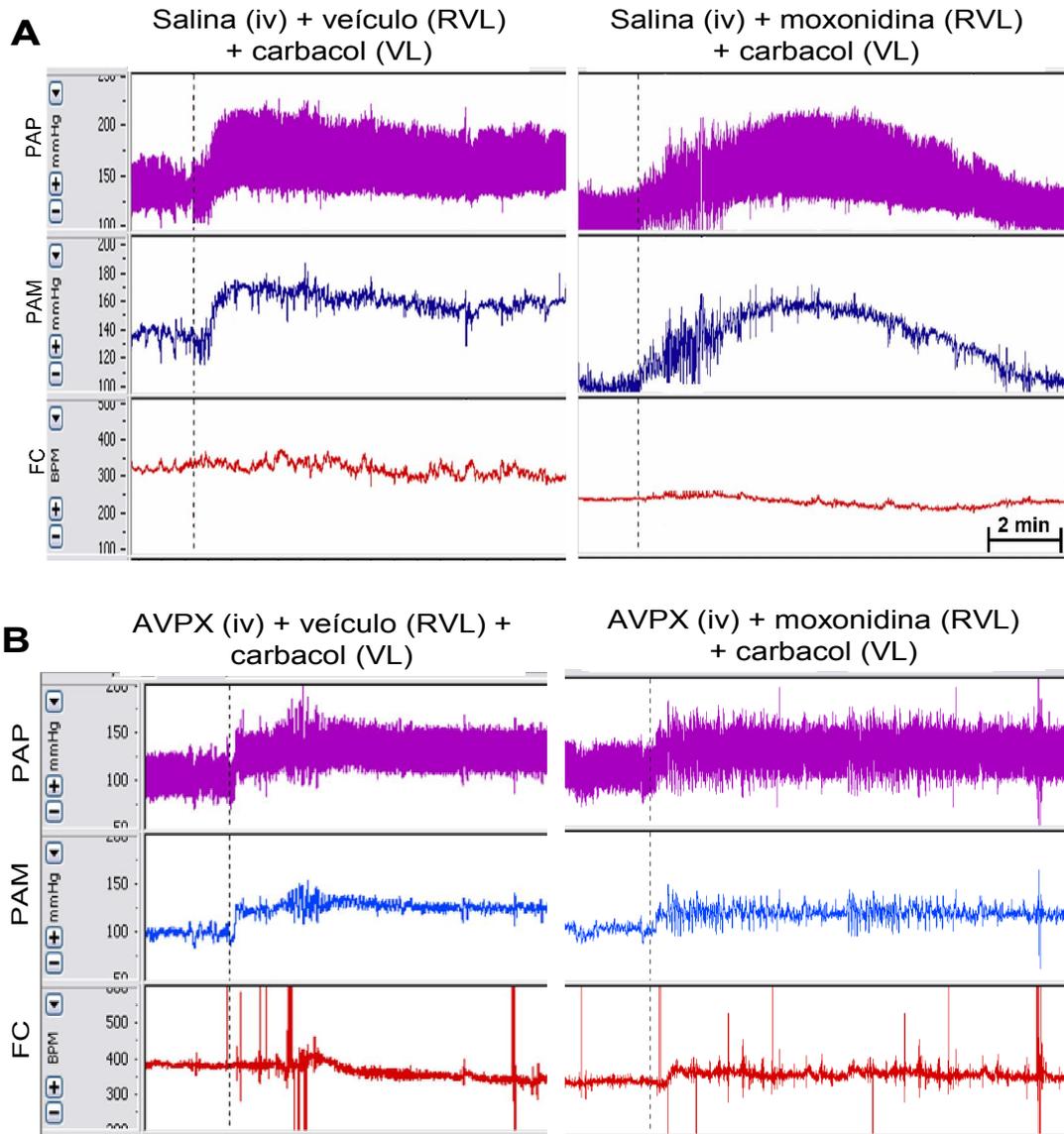


Figura 15: Registros representativos típicos mostrando as variações de pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) antes e após a injeção de carbacol (4 nmol/1 μ l) no VL em ratos tratados previamente com injeções bilaterais de veículo ou moxonidina (5 nmol/100 nl) na área RVL (A) ou injeções de veículo ou moxonidina na área RVL combinadas com antagonista vasopressinérgico V_1 (10 μ g/kg de peso corporal) iv (B).

7.2) Respostas reflexas cardiovasculares em ratos que receberam carbacol no VL após injeções de moxonidina ou veículo na área RVL combinadas com antagonista da vasopressina iv

As variações da PAM (Tabela 10) em ratos tratados com carbacol no VL após injeções bilaterais de veículo ou moxonidina na área RVL combinadas com antagonista de AVP iv foram semelhantes após a administração iv de fenilefrina (5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal) (47 ± 3 mmHg, vs. veículo: 38 ± 4 mmHg), nitroprussiato de sódio (30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal) (-34 ± 4 mmHg vs. veículo: -35 ± 3 mmHg) ou fenilbiguanida (PBG, 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal) (-75 ± 6 mmHg, vs. veículo: -73 ± 5 mmHg). Porém, a resposta pressora produzida pelo cianeto de potássio (40 $\mu\text{g}/\text{rato}$) iv após as injeções de moxonidina na área RVL (21 ± 2 mmHg) apresentou uma redução ($t = 2,931$; $P = 0,010$, para $n = 11$) comparada com a resposta produzida após as injeções de veículo na mesma área (33 ± 5 mmHg) (Tabela 13).

As variações na FC (Tabela 10) após os mesmos tratamentos na área RVL não foram diferentes após a administração iv das mesmas drogas: fenilefrina (-71 ± 8 bpm, vs. veículo: -114 ± 21 bpm), nitroprussiato de sódio (57 ± 7 bpm, vs. veículo: 73 ± 9 bpm), fenilbiguanida (-341 ± 13 bpm, vs. veículo: -385 ± 15 bpm) ou cianeto de potássio (-105 ± 21 bpm, vs. veículo: -141 ± 10 bpm).

Tabela 10: Alterações da PAM e FC induzidas pelas injeções iv de fenilefrina, nitroprussiato de sódio, fenilbiguanida ou cianeto de potássio em ratos tratados com carbacol no VL após injeções bilaterais de veículo ou moxonidina na área RVL combinadas com antagonista de AVP iv.

	<u>Alterações da PAM (mmHg)</u>				<u>Alterações da FC (bpm)</u>			
	Fenil	NPS	PBG	KCN	Fenil	NPS	PBG	KCN
Veículo	38 ± 4	-35 ± 3	-73 ± 5	33 ± 5	-114 ± 21	73 ± 9	-385 ± 15	-141 ± 10
Moxonidina	47 ± 3	-34 ± 4	-75 ± 6	21 ± 2*	-71 ± 8	57 ± 7	-341 ± 13	-105 ± 21

Os resultados estão representados como média ± EPM. Fenilefrina (fenil, 5 µg/kg de peso corporal), nitroprussiato de sódio (NPS, 30 µg/kg de peso corporal), fenilbiguanida (PBG, 40 µg/kg de peso corporal), KCN (40 µg/rato). * diferente de injeção de veículo na RVL. n = 11 animais.

8.3) Alterações da PAM e FC produzidas pelas injeções de carbacol no VL após administração de antagonista vasopressinérgico V₁ iv combinada com injeções de veículo ou moxonidina fora da área RVL.

Não houve diferença na resposta pressora produzida pela injeção de carbacol (4 nmol/1 µl) no VL após injeção prévia de moxonidina (5 nmol/100 nl) fora da área RVL (29 ± 1 mmHg) comparado com a resposta do carbacol injetado no VL após injeções de veículo fora da área RVL (31 ± 1 mmHg). Também não houve diferença nas variações da FC em resposta a injeções de carbacol no VL após injeções de moxonidina e veículo fora da área RVL (60 ± 10 bpm, vs. após veículo: 65 ± 8 bpm) (Tabela 11).

Tabela 11: Alterações da PAM e FC produzidas pelas injeções de carbacol no VL após injeções prévias de moxonidina ou veículo fora da área RVL combinadas com antagonista de AVP iv.

	<u>Alterações da PAM (mmHg)</u>	<u>Alterações da FC (bpm)</u>
Veículo	31 ± 1	65 ± 8
Moxonidina	29 ± 1	60 ± 10

Os resultados estão apresentados como média ± EPM. n = 9. Carbacol (4 nmol/1 µl), moxonidina (5 nmol/100 nl).

9) Análise histológica

A Figura 16 ilustra de forma esquemática a localização da área RVL. As injeções na área RVL localizaram-se ventralmente ao núcleo ambíguo (NA) e entre 200 e 500 μm caudal ao núcleo facial. Nas figuras 17 e 18 estão apresentados cortes transversais do cérebro de ratos mostrando o local das injeções unilaterais e bilaterais posicionadas na área RVL. Nas figuras 19 e 20 estão apresentados cortes transversais do cérebro de ratos mostrando o local das injeções posicionadas no ventrículo lateral (VL). Nas figuras 21 a 24 estão apresentados cortes transversais do cérebro de ratos mostrando injeções unilaterais e bilaterais fora da área RVL.

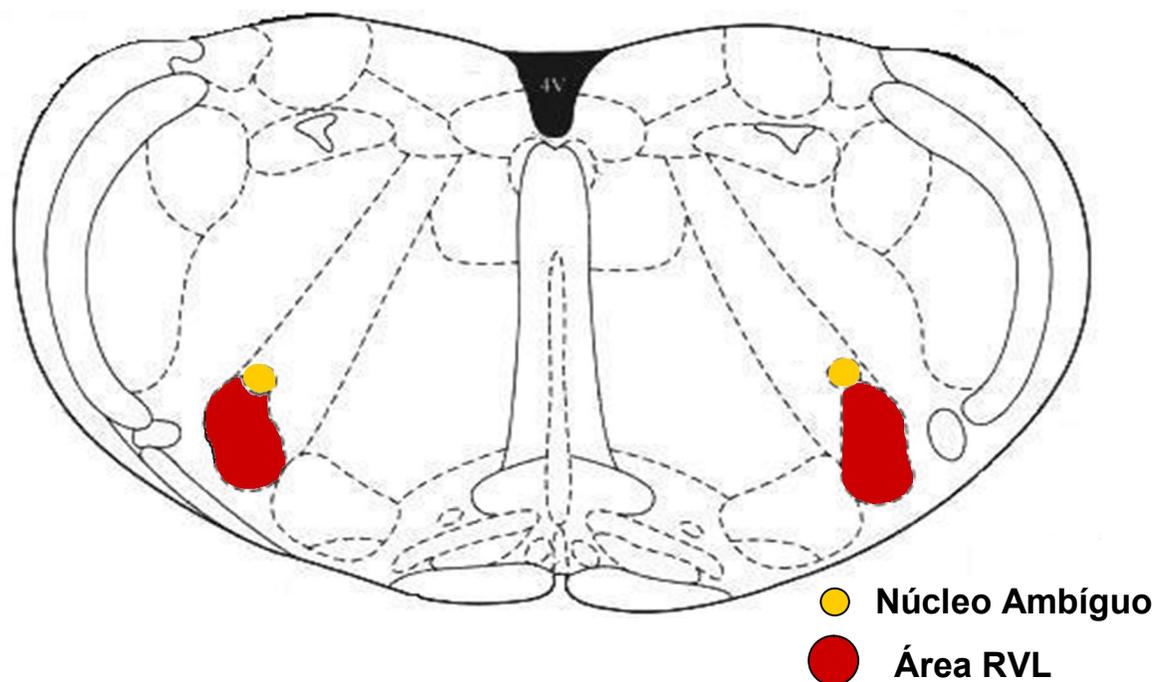


Figura 16: Figura esquemática do cérebro de um rato mostrando a localização da área RVL (em vermelho).

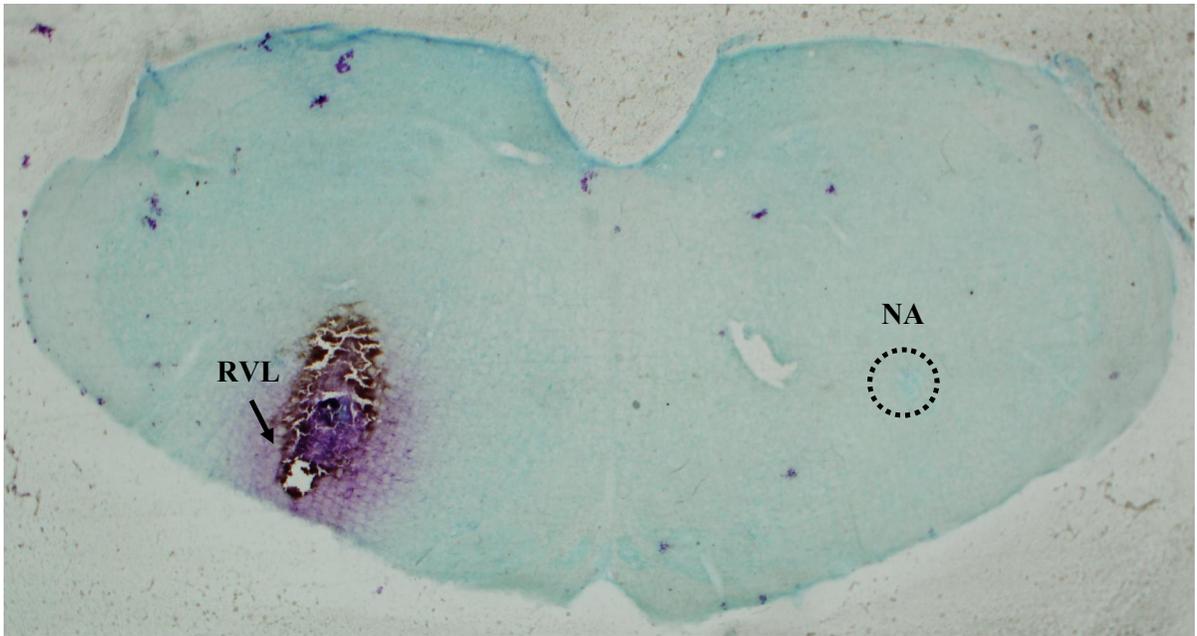


Figura 17: Corte transversal do cérebro de um rato mostrando o local da injeção unilateral na área RVL (seta).

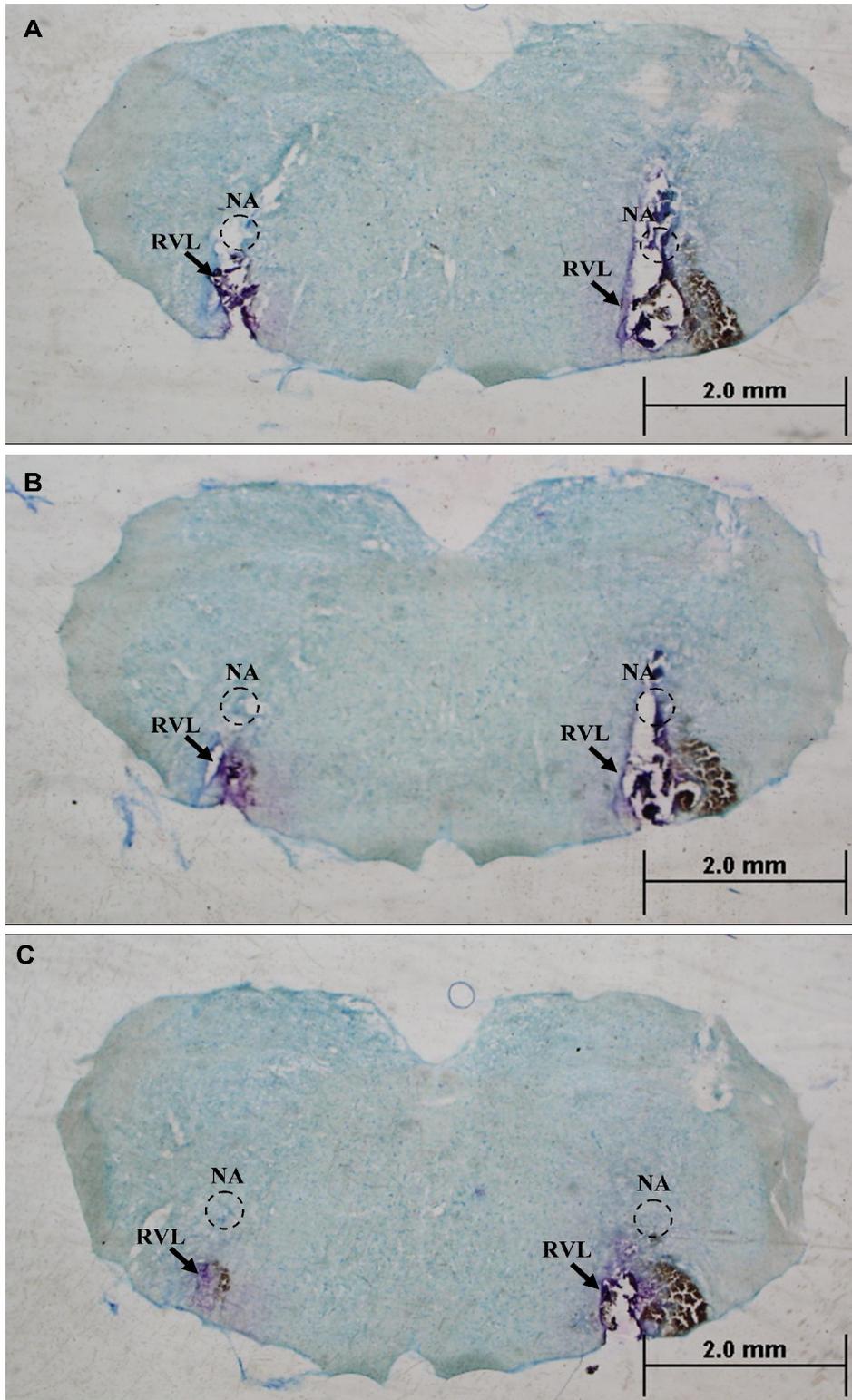


Figura 18: Cortes transversais do cérebro de um rato mostrando os locais das injeções bilaterais na área RVL (setas) (A; B e C - sequência de cortes no sentido rostro-caudal).

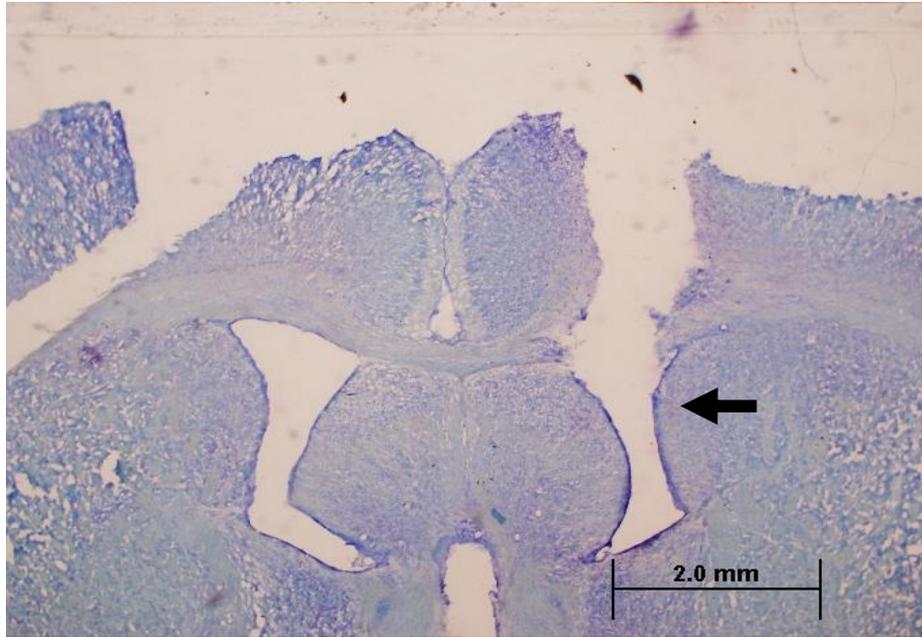


Figura 19: Corte transversal do cérebro de um rato mostrando o trajeto da cânula em direção ao VL (seta).

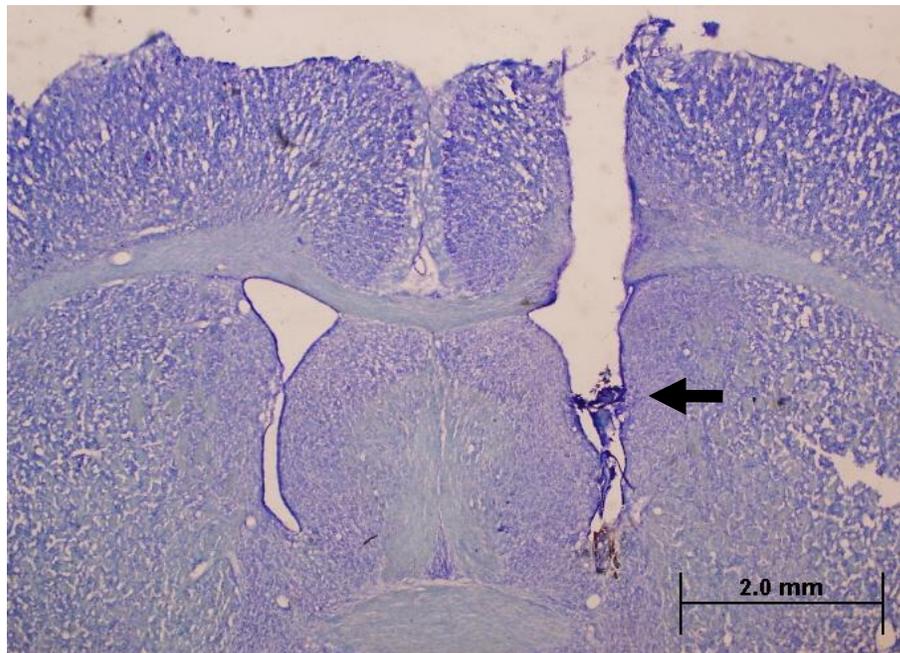


Figura 20: Corte transversal do cérebro de um rato mostrando o local das injeção no VL (seta).

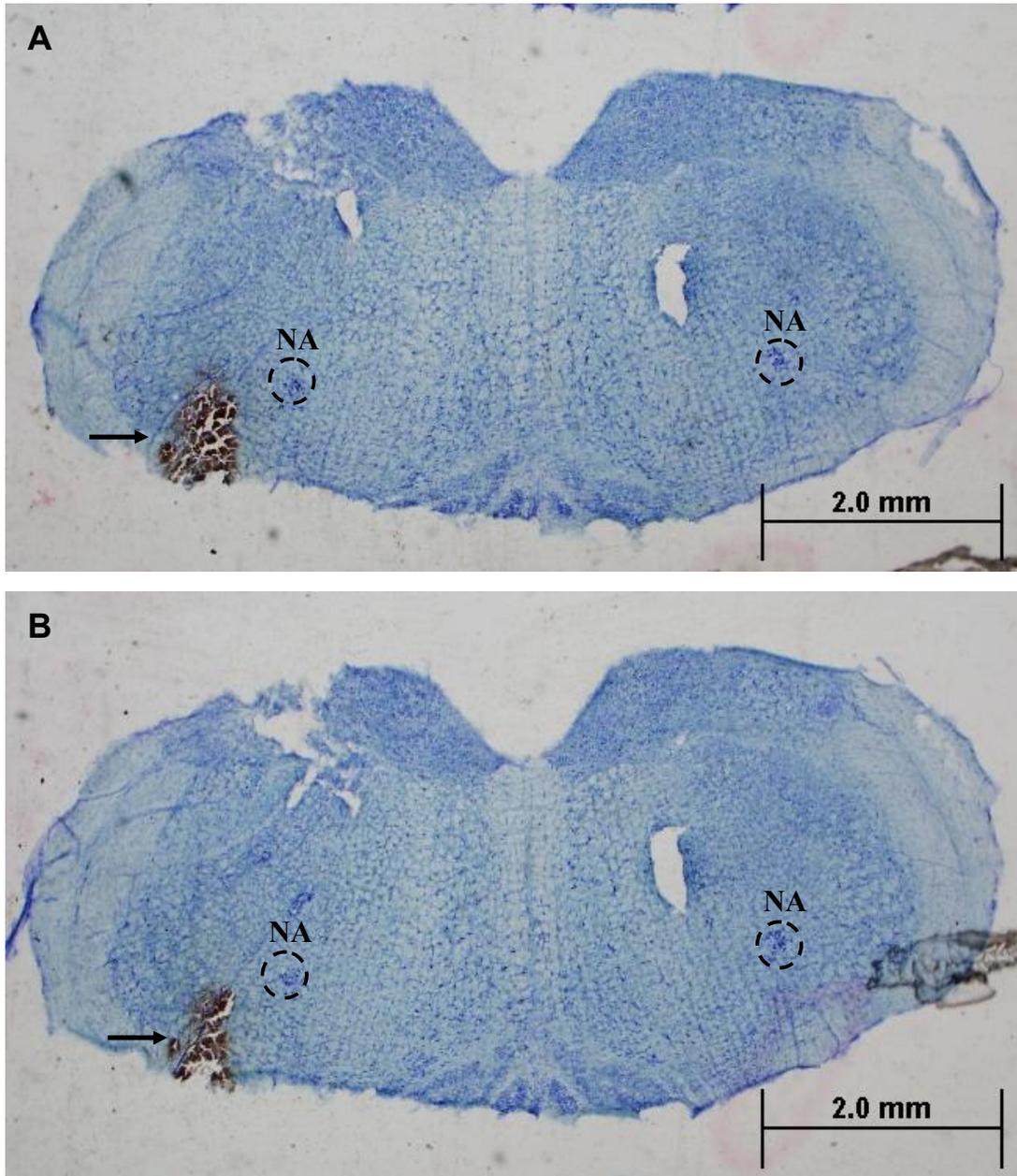


Figura 21: Cortes transversais do cérebro de um rato mostrando o local da injeção unilateral fora da área RVL (setas) (injeção lateralmente à área RVL).

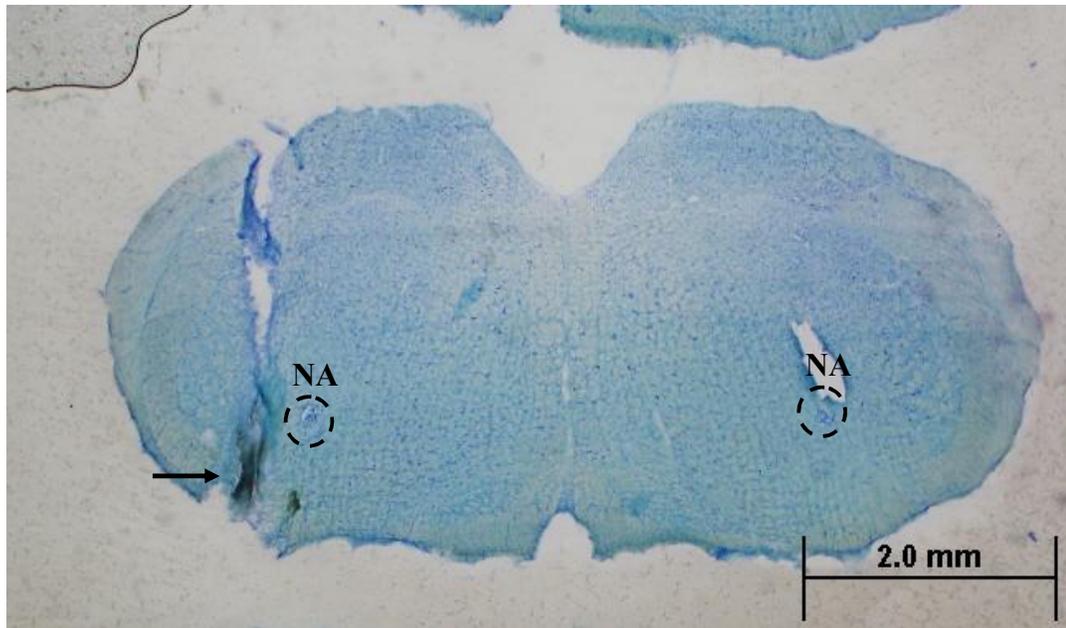


Figura 22: Corte transversal do cérebro de um rato mostrando o local da injeção unilateral fora da área RVL (seta) (lateralmente à RVL).

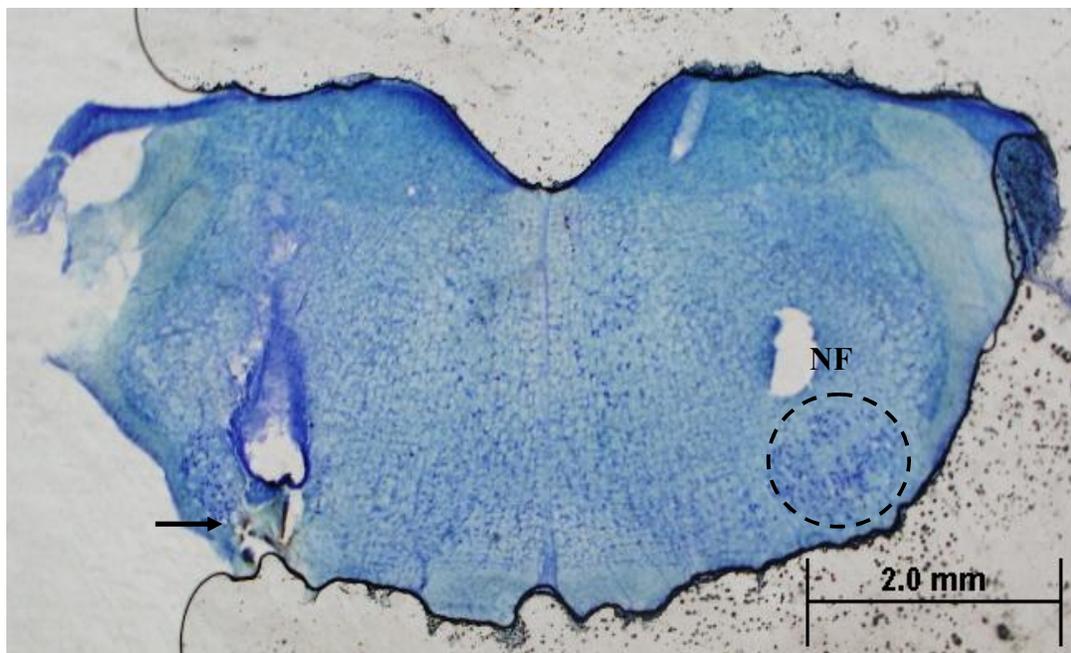


Figura 23: Corte transversal do cérebro de um rato mostrando o local da injeção unilateral fora da área RVL (seta) (injeção rostralmente à RVL, no núcleo facial - NF).

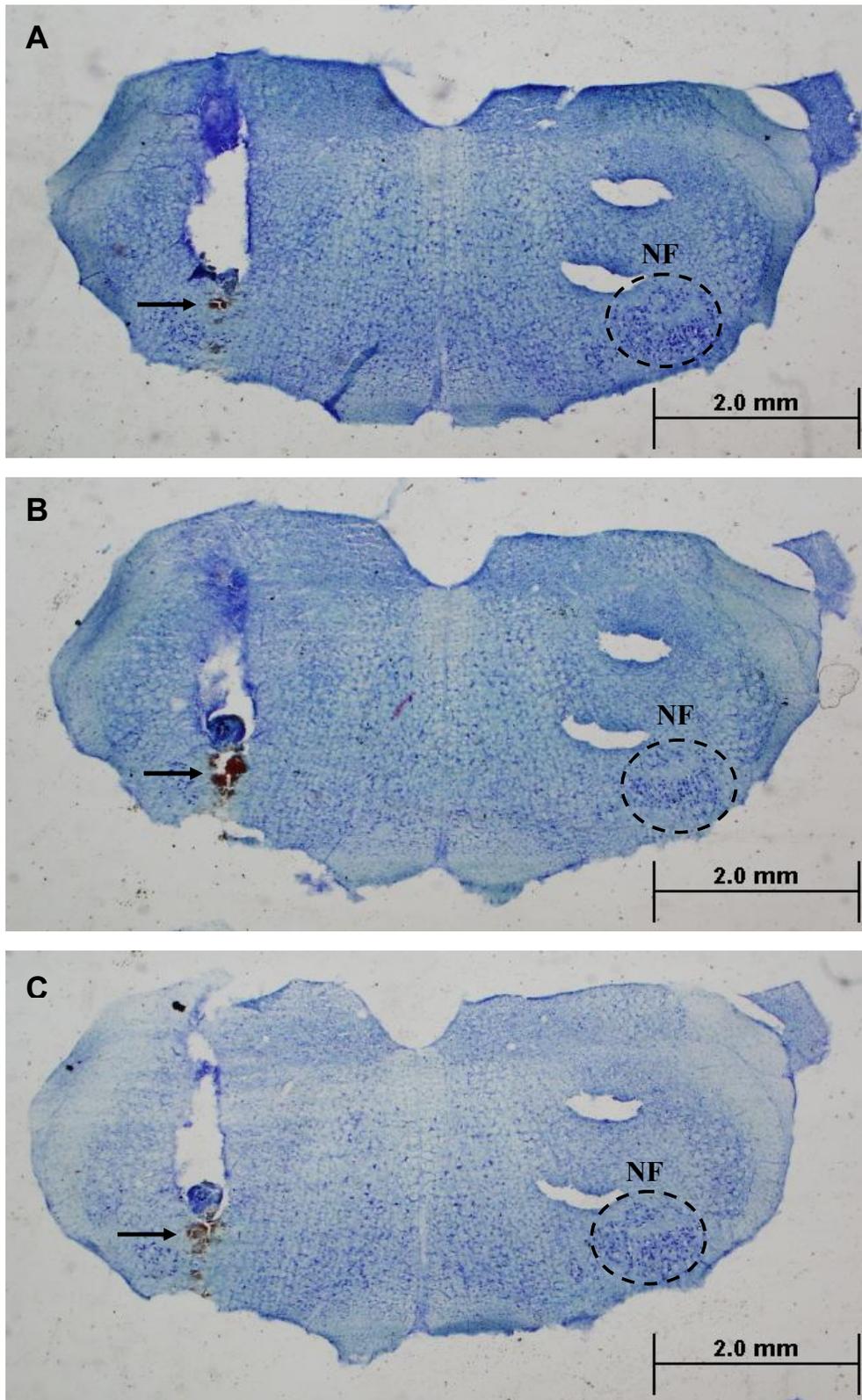


Figura 24: Cortes transversais do cérebro de um rato mostrando local da injeção unilateral fora da área RVL (setas) (injeção rostralmente à RVL – no núcleo facial - NF).

Discussão

Os resultados apresentados demonstram que:

- 1) Privação de água por 24 horas não alterou as respostas pressoras produzidas pelas injeções de L-glutamato, acetilcolina ou ANG II na região RVL ou a resposta hipotensora produzida pela injeção de GABA na área RVL em ratos acordados.
- 2) Em testes realizados em ratos acordados que tiveram NaCl 0,9% e ração para ingerirem durante 14 dias, as respostas pressoras produzidas pelas injeções de L-glutamato, acetilcolina ou ANG II na região RVL ou a resposta hipotensora produzida pela injeção de GABA na mesma área foram similares àquelas dos ratos que tinham à disposição água e ração para ingerirem. As respostas pressoras produzidas por injeções de diferentes doses de glutamato na área RVL em animais que tiveram NaCl 0,9% e ração para ingerirem também foram semelhantes às dos animais que ingeriram água e ração.
- 3) A resposta pressora produzida pela injeção unilateral de glutamato na área RVL foi potencializada após a injeção de carbacol ou ANG II intracerebroventricularmente.
- 4) A injeção bilateral de moxonidina na área RVL reduz a PAM e a FC.
- 5) A injeção prévia de moxonidina bilateralmente na área RVL reduziu em aproximadamente 50% a resposta pressora produzida pela injeção de glutamato na mesma área.
- 6) Injeções bilaterais de moxonidina na área RVL em ratos acordados reduzem a PAM e também parecem reduzir as respostas pressoras produzidas pela

ativação do quimiorreflexo com injeções iv de KCN. Ou seja, injeções bilaterais de moxonidina parecem prejudicar também respostas reflexas que dependem da ativação simpática como a resposta pressora produzida pela ativação do quimiorreflexo.

- 7) Após injeções bilaterais de moxonidina na área RVL, a resposta pressora produzida pela injeção de carbacol no VL foi reduzida nos primeiros 2 minutos após a injeção no VL, porém aumentou de 8 a 18 minutos após a injeção no VL. Além disso, após o tratamento com moxonidina na área RVL, o pico da resposta pressora do carbacol injetado no VL ocorreu mais tardiamente e foi maior do que aquele dos ratos que receberam injeção prévia de veículo na área RVL. Considerando-se que a resposta pressora do carbacol se deve a uma ativação simpática e liberação de vasopressina (Hoffman, Walter, and Bulat, 1977; Imai e cols, 1989; Vieira e cols, 2007), pode-se sugerir que a redução inicial da resposta pressora do carbacol injetado no VL pela moxonidina na área RVL poderia ser devido a um prejuízo da ativação simpática causada pela moxonidina injetada na área RVL, enquanto a maior e mais tardia resposta pressora do carbacol injetado no VL após as injeções de moxonidina na área RVL poderia ser devido a uma maior liberação de vasopressina. Portanto, o mesmo tratamento que prejudica a ativação simpática pelo glutamato injetado na área RVL também reduz a resposta do carbacol no VL na sua fase inicial mais dependente de ativação simpática. Assim, os resultados sugerem que a ativação simpática produzida pela injeção de carbacol no VL parece depender de mecanismos da área RVL, talvez glutamatérgicos.

- 8) O tratamento com o antagonista de receptores vasopressinérgico V_1 reduziu a resposta pressora tardia produzida pela injeção de carbacol no VL combinado ou não com moxonidina na área RVL, sugerindo que a maior e mais tardia resposta pressora do carbacol injetado no VL após as injeções de moxonidina na área RVL deve-se a uma maior liberação de vasopressina.
- 9) Quando as drogas foram injetadas fora da área RVL as alterações de pressão arterial foram muito menores do que aquelas produzidas pelas injeções corretamente posicionadas na área RVL ou mesmo inexistentes, o que confirma a especificidade da área RVL como o local de ação das drogas que produziram os efeitos descritos. Embora as alterações da PAM produzidas pelas injeções fora da área RVL sejam muito menores do que aquelas das injeções corretamente posicionadas na área RVL, em alguns casos houve alterações significantes mesmo com injeções fora da área RVL porque atuando em áreas fora da área RVL algumas drogas podem produzir alguma resposta ou porque algum resíduo da injeção pode ter atingido a área RVL. No caso das injeções de moxonidina fora da área RVL, pode-se observar que estas, diferentemente das injeções na área RVL, não modificaram as respostas pressoras produzidas pelo carbacol injetado no ventrículo lateral, mais uma vez mostrando a importância das injeções corretamente posicionadas na área RVL para os efeitos observados.

É bem definido que a osmolaridade dos líquidos corporais é um importante sinal para o controle da secreção de vasopressina e da sede (Antunes e cols, 2006; Brooks, Qi, and O'Donoghuy, 2005; Imai e cols, 1989; Toney e cols, 2003). Adicionalmente, estudos sugerem que a osmolaridade dos líquidos corporais também

pode ter um papel na modulação da atividade simpática e na regulação da pressão arterial (Brooks, Qi, and O'Donoghay, 2005; Toney e cols, 2003). Áreas prosencefálicas livres de barreira hematoencefálica, como o órgão subfornical (OSF) e o órgão vasculoso da lâmina terminal (OVLT), poderiam detectar as alterações osmóticas que ocorrem no plasma levando a um aumento na atividade simpática e nas concentrações plasmáticas de vasopressina resultando em elevação da PAM (Hoffman, Walter, and Bulat, 1977; Imai e cols, 1989; Richard and Bourque, 1992).

Estudos têm procurado resolver esta questão utilizando-se de abordagens experimentais como privação hídrica, aumento de sal na dieta ofertada ou a injeção endovenosa de soluções hiperosmóticas que podem levar a aumento da osmolalidade dos fluidos corporais, aumento dos níveis plasmáticos de vasopressina, da atividade simpática e da PAM tanto agudamente (Bealer, 2000; Brooks, Freeman, and Clow, 2004; Brooks, Freeman, and O'Donoghay, 2004; Haibara e cols, 1995; Scrogin, McKeogh, and Brooks, 2002; Stocker, Stricker, and Sved, 2001; Toney e cols, 2003) como cronicamente (Adams, Bardgett, and Stocker, 2009).

Em experimentos realizados em animais anestesiados, a ativação neurohumoral durante o aumento da osmolalidade parece produzir alterações na atividade simpática para vários órgãos (Stocker, Stricker, and Sved, 2001). Sugere-se que o aumento agudo da osmolaridade ativaria neurônios que se originam no núcleo paraventricular (NPV) que se projetam para a região RVL, ocorrendo maior liberação de aminoácidos excitatórios (AAE) nesta região, aumentando assim o tônus simpático (Toney e cols, 2003). O bloqueio não seletivo de receptores ionotrópicos dos AAE na região RVL reduziu a PAM de ratos anestesiados com privação hídrica, mas não alterou a PAM de animais hidratados (Brooks, Freeman, and Clow, 2004). A resposta pressora após injeção unilateral de doses crescentes de glutamato são maiores em

animais desidratados do que nos animais hidratados (Brooks, Freeman, and Clow, 2004; Brooks, Freeman, and O'Donaughy, 2004; Freeman and Brooks, 2007) e também nos animais que ingeriram cronicamente solução de NaCl 0,9% do que nos animais que receberam água por igual período (Adams, Bardgett, and Stocker, 2009). Alterações crônicas na ingestão de sal por pelo menos 14 dias promovem modificações na osmolaridade dos fluidos corporais levando a alterações nas respostas cardiovasculares produzidas pela excitação e/ou inibição da região RVL e essas alterações não são observadas com o mesmo tratamento agudamente por 1 ou 7 dias (Adams, Bardgett, and Stocker, 2009; Brooks, Qi, and O'Donaughy, 2005; Ito, Gordon, and Sved, 1999).

No presente estudo foi investigado se a privação hídrica por 24 horas influenciaria as respostas pressoras produzidas pela ativação do RVL não apenas com glutamato, mas também com acetilcolina ou ANG II ou respostas hipotensoras produzidas pela injeção de GABA na região do RVL em ratos acordados, mas não foram encontradas diferenças nas modificações da PAM e FC produzidas por estes tratamentos comparando-se os grupos privado e controle de animais acordados. Investigou-se também se haveria alterações nas respostas pressoras produzidas pela ativação da área RVL não apenas com doses crescentes de glutamato, mas também com injeções de acetilcolina ou ANG II ou nas respostas hipotensoras produzidas pela injeção de GABA na região RVL em ratos acordados que tinham solução de NaCl 0,9% ao invés de água para ingerirem por 14 dias. Em animais anestesiados, Adams e cols (2009) observaram aumento nas respostas pressoras produzidas pela injeção de diferentes doses de glutamato na área RVL e na resposta hipotensora de diferentes doses de GABA injetados na mesma área em ratos mantidos com ração e NaCl 0,9%. Em ratos acordados os resultados encontrados foram diferentes dos

apresentados na literatura para ratos anestesiados, ou seja, não foram encontradas diferenças nas alterações de PAM e FC produzidas pela estimulação ou inibição da área RVL em ratos acordados que receberam ração normal e NaCl 0,9% para ingerir comparando-se com aquelas dos ratos que receberam ração normal e água. Portanto, tanto tratamentos mais agudos (24 h de privação hídrica) como mais crônicos (14 dias de ingestão de NaCl 0,9%) não modificaram as respostas cardiovasculares produzidas pela estimulação ou inibição da área RVL em ratos acordados.

A análise da ingestão diária de líquidos dos animais durante 14 dias mostrou que os animais que tinham à disposição ração normal + NaCl 0,9% tiveram uma ingestão de líquidos maior do que aquela dos animais com acesso a ração normal + água o que é semelhante ao observado por Adams e cols (2009) para os animais usados em seus experimentos. Visto que a diferença na ingestão de líquidos entre grupos foi semelhante nos dois estudos, mas a influência da ingestão de NaCl 0,9% nas respostas cardiovasculares foi diferente, fica difícil explicar os motivos das diferenças nas respostas cardiovasculares entre os dois estudos, exceto o fato de que em um estudo os testes terem sido feitos em ratos anestesiados e no outro estudo em ratos acordados. Certamente a anestesia pode influenciar muitos mecanismos centrais envolvidos na regulação cardiovascular, algumas vezes dificultando o aparecimento de respostas, principalmente aquelas que resultam da ativação de mecanismos prosencefálicos ou de reflexos como o quimiorreflexo (Sun and Reis, 1995a; Sun and Reis, 1995b). Portanto, esperávamos que a facilitação das respostas cardiovasculares à ativação ou inibição da área RVL produzidas pelo aumento da osmolaridade, fosse mais evidente quando testada em ratos acordados. Porém, os resultados não foram os esperados. Já está bem estabelecido que o

aumento de osmolaridade gera sinais que tendem a facilitar a atividade simpática e, portanto, causar aumentos de pressão arterial. Áreas como NPV e RVL, importantes centros reguladores da atividade simpática para o sistema cardiovascular, certamente têm um importante papel nestes efeitos da osmolaridade. Mas em ratos acordados, talvez sejam necessárias alterações um pouco maiores da osmolaridade, com geração de sinais facilitatórios um pouco mais intensos do que aqueles produzidos pela ingestão de NaCl 0,9%, para vencer eventuais mecanismos contrários ou compensatórios que normalmente atuam para evitar alterações da pressão arterial como a ação dos barorreceptores.

Alguns estudos que testaram possíveis efeitos do aumento da osmolaridade em ratos anestesiados (Adams e cols, 2007; Adams, Bardgett, and Stocker, 2009; Brooks, Freeman, and Clow, 2004; Brooks, Freeman, and O'Donoghuy, 2004) sugerem que aumento da atividade em áreas e mecanismos prosencefálicos capazes de estimular a atividade simpática sejam capazes de facilitar a ativação simpática e as respostas pressoras produzidas pela injeção de glutamato na área RVL, porém, não temos conhecimento de nenhum estudo que tenha demonstrado de maneira definitiva e conclusiva que ativação de áreas e mecanismos prosencefálicos leve a um aumento da resposta pressora produzida pela injeção de glutamato na área RVL em ratos acordados. No caso do aumento da osmolaridade não se pode excluir uma ação direta da hiperosmolaridade em qualquer nível do sistema nervoso central onde existam mecanismos que controlam atividade simpática, inclusive a nível medular.

Estudos anteriores de Vieira et. al. (Vieira e cols, 2007; Vieira e cols, 2010) já haviam mostrado que o bloqueio colinérgico ou angiotensinérgico central com injeções de atropina ou losartan no VL ou a lesão da região periventricular anteroventral do terceiro ventrículo (região AV3V) de ratos acordados reduzia a

resposta pressora do glutamato injetado na área RVL em ratos acordados. Se bloqueios dos mecanismos prosencefálicos prejudicam as respostas pressoras produzidas pelo glutamato injetado na área RVL de ratos acordados que não receberam nenhum outro tratamento adicional, espera-se que aumento da atividade em áreas e mecanismos prosencefálicos capazes de estimular a atividade simpática sejam capazes de facilitar a ativação simpática e as respostas pressoras produzidas pela injeção de glutamato na área RVL.

Os presentes resultados demonstraram que tratamentos que ativam áreas prosencefálicas capazes de aumentar a atividade simpática como as injeções de ANG II ou carbacol no VL podem facilitar a resposta pressora produzida pela injeção de glutamato na área RVL, o que sugere que o aumento da atividade em áreas e mecanismos prosencefálicos, capazes de estimular a atividade simpática, possuem ações facilitatórias para a ativação simpática e as respostas pressoras produzidas pela injeção de glutamato na área RVL (Figura 25).

Resultados de Vieira et. al (Vieira e cols, 2007; Vieira e cols, 2010) já sugeriam que a resposta pressora produzida pela injeção de glutamato na área RVL em ratos acordados sem nenhum tratamento adicional é facilitada pela ativação de mecanismos angiotensinérgicos e colinérgicos prosencefálicos, possivelmente integrados na região AV3V. Ou seja, em condições fisiológicas normais, o aumento da atividade simpática produzida pela injeção de glutamato na área RVL depende de um circuito central mais complexo que envolve áreas e mecanismos prosencefálicos. Complementando os resultados anteriores obtidos com as injeções dos antagonistas colinérgico ou angiotensinérgico no VL, os presentes resultados mostram que as injeções dos agonistas carbacol e ANG II no VL facilitaram a resposta pressora do glutamato injetado na área RVL. Assim, parece que a excitabilidade dos neurônios da

área RVL que controlam a atividade simpática, em especial daqueles sensíveis ao glutamato, é influenciada por sinais facilitatórios originados em áreas prosencefálicas sensíveis a mecanismos colinérgicos e angiotensinérgicos (Figura 25). Além disso, é preciso lembrar que os bloqueios colinérgico e angiotensinérgico centrais que interferem na resposta à injeção de glutamato na área RVL contraditoriamente não afetam as respostas à ativação de baro e quimiorreceptores, ou seja, a resposta pressora à ativação de quimiorreceptores periféricos com KCN que se atribui a uma ativação simpática decorrente de uma liberação de glutamato na área RVL a partir de sinais originários no NTS, não é afetada pelo mesmo bloqueio prosencefálico que prejudica a resposta pressora produzida pela injeção direta de glutamato na área RVL. Ainda serão necessários mais estudos para entendermos porque a resposta reflexa está protegida, mas o efeito direto do glutamato injetado na área RVL está comprometido após os bloqueios colinérgico e angiotensinérgico centrais. Mas pode ser que o que consideramos contradições seja apenas consequência do desconhecimento que ainda temos dos mecanismos centrais de regulação cardiovascular e de seus ajustes em diferentes condições.

A caracterização da área RVL como a região responsável pela manutenção do tônus simpático vasomotor iniciou-se com estudos pioneiros de Guertzenstein e Silver (1974) que demonstraram que manipulações (lesões ou inibições) na superfície ventral do bulbo promoviam grandes alterações na PAM basal. Estudos de Ross e cols (1984) utilizando métodos imunohistoquímicos sugeriram que os neurônios geradores da atividade simpática seriam adrenérgicos, uma vez que a região onde se encontravam apresentava intensa imunorreatividade a feniletolamina-N-metil-transferase (PNMT), uma enzima responsável pela síntese de adrenalina. Essa região onde estão localizados os neurônios vasomotores

simpáticos, denominada área C1, constitui parte da região RVL e contém neurônios catecolaminérgicos, mas também é capaz de liberar o glutamato como neurotransmissor e outros neuropeptídeos (Schreihöfer and Guyenet, 1997; Stornetta, McQuiston, and Guyenet, 2004). Importantes drogas de ação anti-hipertensiva utilizadas na clínica médica são agonistas adrenérgicos α_2 /imidazólicos (Buccafusco e cols, 1995; Ernsberger e cols, 1993; Lappe and Brody, 1984). As drogas anti-hipertensivas de ação central mais usadas e estudadas são a clonidina e a moxonidina (agonistas adrenérgicos α_2 e imidazólicos). Alguns trabalhos sugerem que o efeito anti-hipertensivo desses fármacos é mediado pela ativação de receptores imidazólicos do tipo I_1 (Buccafusco e cols, 1995; Chan and Head, 1996; Ernsberger e cols, 1994; Ernsberger e cols, 1993; Ernsberger e cols, 1987; Haxhiu e cols, 1994; Lappe and Brody, 1984), outros sugerem que esse efeito é por ação em receptores α_2 adrenérgico centrais (Allen and Guyenet, 1993; Armah, 1988; Guyenet, 1997; Hayar and Guyenet, 2000; Moreira e cols, 2007; Schlicker, Armah, and Gothert, 1990; Urban, Szabo, and Starke, 1995) que ativados diminuiriam a atividade neuronal da área RVL, reduzindo a atividade eferente simpática, e conseqüentemente, reduzindo a resistência vascular periférica e a pressão arterial. Os presentes resultados demonstraram que injeções de moxonidina na área RVL causaram redução da pressão arterial como observado em outros trabalhos (Buccafusco e cols, 1995; Ernsberger e cols, 1994; Ernsberger e cols, 1993; Guyenet, 1997; Moreira e cols, 2007; Tolentino-Silva e cols, 2000; Urban, Szabo, and Starke, 1995). Além disso, observamos que a injeção prévia de moxonidina na área RVL reduziu a resposta pressora produzida pelo glutamato injetado na mesma área em animais acordados quando comparada a resposta pressora produzida pela injeção de glutamato após a injeção de veículo na área RVL. Estes resultados

sugerem que a ativação de receptores α_2 adrenérgicos/imidazólicos prejudica os efeitos da ativação glutamatérgica na área RVL. O glutamato é um dos principais mecanismos na área RVL responsáveis pela ativação simpática e a injeção de glutamato na área RVL produz uma resposta pressora típica dependente de ativação simpática (Dampney e cols, 1982; Dampney e cols, 2000; Guyenet, 2006; Guyenet, Darnall, and Riley, 1990; Ito, Gordon, and Sved, 1999; Willette e cols, 1983). Além disso, a resposta pressora à ativação de quimiorreceptores periféricos com KCN, que se atribui a uma ativação simpática decorrente de uma liberação de glutamato na área RVL a partir de sinais originários no NTS, também é afetada pelo mesmo bloqueio que prejudica a resposta pressora produzida pela injeção direta de glutamato na área RVL, uma vez que esta redução da resposta pressora à ativação do quimiorreflexo, ocorrida após as injeções de moxonidina na área RVL, pode ser decorrência da ação da moxonidina na área RVL reduzindo as ações do glutamato liberado e em consequência reduzindo o aumento da atividade simpática causado pela ativação do quimiorreflexo, demonstrando mais uma vez os efeitos da moxonidina injetada na área RVL reduzindo a ativação simpática em especial aquela dependente de uma ação do glutamato. É interessante notar que a moxonidina afeta os mecanismos glutamatérgicos da área RVL sem produzir interferência no controle respiratório que é um efeito colateral geralmente presente quando se trata a área RVL com antagonistas glutamatérgicos como o ácido quinurênico. É possível que a moxonidina interfira exclusivamente nos mecanismos glutamatérgicos da área RVL envolvidos com o controle cardiovascular, deixando intacto aqueles relacionados com o controle respiratório.

Os presentes resultados também mostram que após injeções bilaterais de moxonidina na área RVL, a resposta pressora produzida pela injeção de carbacol no

VL foi reduzida nos primeiros 2 minutos após a injeção no VL, ou seja, as injeções de moxonidina na área RVL também reduzem a resposta do carbacol injetado no VL na sua fase inicial mais dependente de ativação simpática. Portanto, diferentes resultados até agora obtidos sugerem que a moxonidina na área RVL prejudica a ativação simpática que depende da área RVL em diferentes situações (Figura 26). Porém, tardiamente houve uma potenciação da resposta pressora produzida pela injeção de carbacol no ventrículo lateral após as injeções bilaterais de moxonidina na área RVL, que foi abolida pelo tratamento prévio com antagonista de receptores vasopressinérgico V_1 , sugerindo que esta potenciação se deve possivelmente a um aumento da secreção de vasopressina. A resposta pressora produzida por agonistas colinérgicos injetados no VL depende de ativação simpática e secreção de vasopressina (Hoffman, Walter, and Bulat, 1977; Imai e cols, 1989; Vieira e cols, 2007). A resposta pressora do carbacol injetado centralmente é altamente dependente de mecanismos integrados na região AV3V, uma das áreas mais anteriores do cérebro envolvida com a regulação cardiovascular (Colombari e cols, 1992; Menani e cols, 1990; Valladao e cols, 1992). Lesões da região AV3V afetam fortemente respostas dependentes de ativação simpática e secreção de vasopressina, como aquelas produzidas pela estimulação angiotensinérgica ou colinérgica central (Colombari e cols, 1992; Menani e cols, 1990; Valladao e cols, 1992). A região AV3V está direta ou indiretamente conectada com muitas áreas prosencefálicas e do tronco cerebral entre as quais o PVN, NTS e a área RVL (Brody e cols, 1978; Knuepfer, Johnson, and Brody, 1984; Ricardo and Koh, 1978; Yang and Coote, 1998). Uma conexão descendente importante da região AV3V é com o PVN que pode influenciar a atividade simpática e a secreção de vasopressina (Figura 26). O controle da atividade simpática pelo PVN pode ser por meio de

conexões com a área RVL, mas também por projeções diretas para a coluna intermediolateral (IML) (Badoer, 2001; Hardy, 2001; Kubo e cols, 2000; Li and Pan, 2007). Ou seja, os sinais gerados pela ativação colinérgica central provenientes da região AV3V ao chegarem ao PVN podem estimular a secreção de vasopressina e por diferentes projeções a partir do PVN promover ativação simpática por estimular a área RVL ou diretamente o IML.

O aumento tardio da resposta pressora do carbacol no VL em animais tratados com moxonidina na RVL foi bloqueado pelo antagonista da vasopressina injetado intravenosamente (iv), o que sugere participação da vasopressina nesta resposta. O antagonista de vasopressina iv não modificou o efeito pressor inicial (primeiros 2 min) do carbacol no VL sozinho ou combinado com moxonidina na área RVL confirmando que a vasopressina não participa da resposta neste momento. A pressão arterial alcançou valores semelhantes após o tratamento com carbacol em ratos tratados ou não com moxonidina na área RVL (181 ± 3 mmHg e 179 ± 2 mmHg, respectivamente). Assim, parece que na ausência do mecanismo pressor simpático da área RVL, outros mecanismos pressores como o aumento da secreção de vasopressina são recrutados ou ficam liberados mantendo a resposta pressora produzida pela estimulação colinérgica central e levando ao mesmo valor final da pressão arterial. Uma menor ativação dos pressorreceptores como resultado do menor aumento inicial da pressão arterial e também de uma pressão arterial abaixo da normal antes da injeção de carbacol poderia levar a uma menor inibição da secreção de vasopressina. Ou seja, a secreção de vasopressina estimulada pela estimulação colinérgica estaria aumentada após a injeção de moxonidina na área RVL como consequência de uma menor ação inibitória dos sinais provenientes dos pressorreceptores. A secreção aumentada de vasopressina compensaria a reduzida

ativação simpática proporcionando um aumento de pressão arterial pelo menos equivalente àquele que aparece quando tanto a ativação simpática como a secreção de vasopressina está atuando normalmente na ausência da ação da moxonidina na área RVL (Figura 26). Os resultados também indicam que a moxonidina é eficiente para reduzir a ativação de mecanismos simpáticos da área RVL, sem modificar os movimentos respiratórios como ocorre quando se injeta antagonistas de glutamato na RVL.

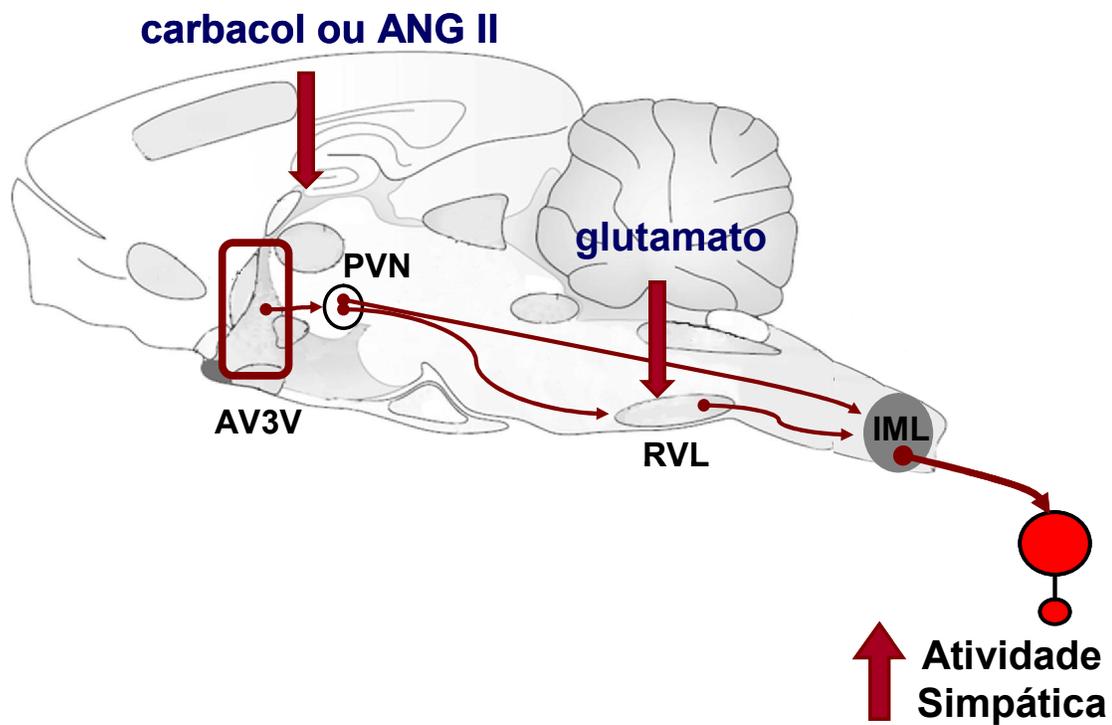


Figura 25: Esquema de possível facilitação observada na resposta pressora causada pela injeção de glutamato na área RVL combinada com injeção de carbacol ou angiotensina II no VL.

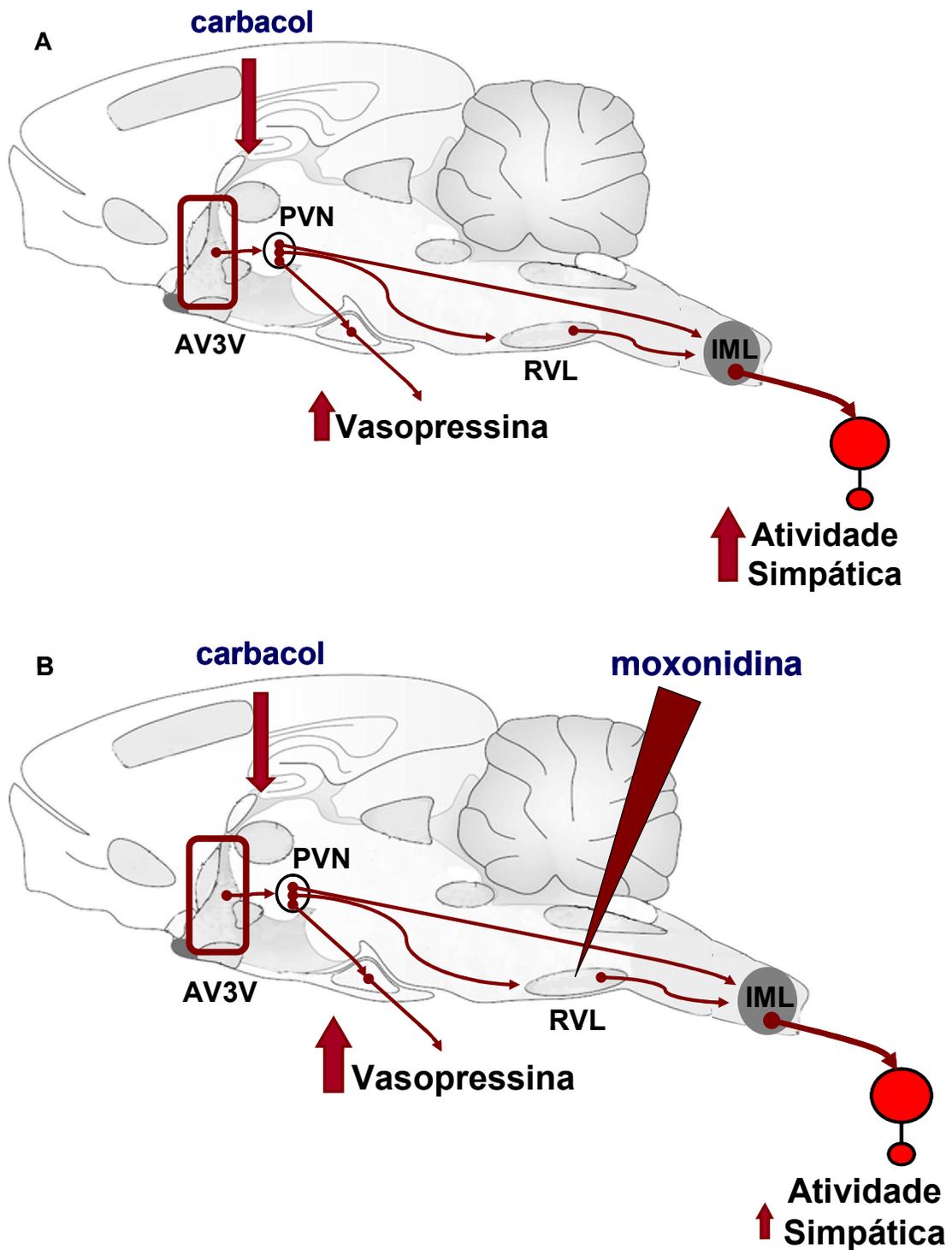


Figura 26: Esquema de possível interação observada na resposta pressora causada pela injeção de carbacol no VL (A) e combinado com injeção de moxonidina na área RVL (B).

Referência Bibliográfica

Adams, J.M.; Bardgett, M.E. and Stocker, S.D., 2009. Ventral lamina terminalis mediates enhanced cardiovascular responses of rostral ventrolateral medulla neurons during increased dietary salt. *Hypertension*, 54: 308 - 314.

Adams, J.M.; Madden, C.J.; Sved, A.F. and Stocker, S.D., 2007. Increased dietary salt enhances sympathoexcitatory and sympathoinhibitory responses from the rostral ventrolateral medulla. *Hypertension*, 50: 354 - 359.

Allen, A.M. and Guyenet, P.G., 1993. Alpha 2-adrenoceptor-mediated inhibition of bulbospinal barosensitive cells of rat rostral medulla. *Am.J.Physiol*, 265: R1065 - R1075.

Antunes, V.R.; Yao, S.T.; Pickering, A.E.; Murphy, D. and Paton, J.F., 2006. A spinal vasopressinergic mechanism mediates hyperosmolality-induced sympathoexcitation. *J.Physiol*, 576: 569 - 583.

Armah, B.I., 1988. Unique presynaptic alpha 2-receptor selectivity and specificity of the antihypertensive agent moxonidine. *Arzneimittelforschung.*, 38: 1435 - 1442.

Babic, T.; Roder, S. and Ciriello, J., 2004. Direct projections from caudal ventrolateral medullary depressor sites to the subfornical organ. *Brain Res.*, 1003: 113 - 121.

Badoer, E., 2001. Hypothalamic paraventricular nucleus and cardiovascular regulation. *Clin.Exp.Pharmacol.Physiol*, 28: 95 - 99.

Bealer, S.L., 2000. Central control of cardiac baroreflex responses during peripheral hyperosmolality. *Am.J.Physiol Regul.Integr.Comp Physiol*, 278: R1157 - R1163.

Blessing, W.W.; Goodchild, A.K.; Dampney, R.A. and Chalmers, J.P., 1981. 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: 35 - 55.

Bourque, C.W., 1998. Osmoregulation of vasopressin neurons: a synergy of intrinsic and synaptic processes. *Prog.Brain Res.*, 119: 59 - 76.

Brody, M.J.; Faber, J.E.; Mangiapane, M.L. and Porter, J.P., 1984. The central nervous system and prevention of hypertension. 474 - 494.

Brody, M.J.; Fink, G.D.; Buggy, J.; Haywood, J.R. and Gordon, F.J., 1978. The role of the anteroventral third ventricle (AV3V) region in experimental hypertension. *Circ.Res.*, 43: 1 - 13.

Brody, M.J. and Johnson, A.K., 1980. Role of the anteroventral third ventricle region in fluid and electrolyte balance, arterial pressure regulation and hypertension. *6*: 249 - 292.

Brooks, V.L., 1992. Vasopressin and angiotensin II in reflex regulation of heart rate: effect of water deprivation. *Am.J.Physiol*, 263: R756 - R761.

Brooks, V.L.; Freeman, K.L. and Clow, K.A., 2004. Excitatory amino acids in rostral ventrolateral medulla support blood pressure during water deprivation in rats. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol*, 286: H1642 - H1648.

Brooks, V.L.; Freeman, K.L. and O'Donaughy, T.L., 2004. Acute and chronic increases in osmolality increase excitatory amino acid drive of the rostral ventrolateral medulla in rats. *Am.J.Physiol Regul.Integr.Comp Physiol*, 287: R1359 - R1368.

Brooks, V.L.; Qi, Y. and O'Donaughy, T.L., 2005. Increased osmolality of conscious water-deprived rats supports arterial pressure and sympathetic activity via a brain action. *Am.J.Physiol Regul.Integr.Comp Physiol*, 288: R1248 - R1255.

Brown, D.L. and Guyenet, P.G., 1984. Cardiovascular neurons of brain stem with projections to spinal cord. *Am.J.Physiol*, 247: R1009 - R1016.

Buccafusco, J.J.; Lapp, C.A.; Westbrook, K.L. and Ernsberger, P., 1995. Role of medullary 11-imidazoline and alpha 2-adrenergic receptors in the antihypertensive responses evoked by central administration of clonidine analogs in conscious spontaneously hypertensive rats. *J.Pharmacol.Exp.Ther.*, 273: 1162 - 1171.

Chan, C.K. and Head, G.A., 1996. Relative importance of central imidazoline receptors for the antihypertensive effects of moxonidine and rilmenidine. *J.Hypertens.*, 14: 855 - 864.

Colombari, E.; Saad, W.A.; Camargo, L.A.; Renzi, A.; de Luca Junior, L.A. and Menani, J.V., 1992. AV3V lesion suppresses the pressor, dipsogenic and natriuretic responses to cholinergic activation of the septal area in rats. *Brain Res.*, 572: 172 - 175.

Dampney, R.A.; Fontes, M.A.; Hirooka, Y.; Horiuchi, J.; Potts, P.D. and Tagawa, T., 2002. Role of angiotensin II receptors in the regulation of vasomotor neurons in the ventrolateral medulla. *Clin.Exp.Pharmacol.Physiol*, 29: 467 - 472.

Dampney, R.A.; Goodchild, A.K.; Robertson, L.G. and Montgomery, W., 1982. Role of ventrolateral medulla in vasomotor regulation: a correlative anatomical and physiological study. *Brain Res.*, 249: 223 - 235.

Dampney, R.A.; Tagawa, T.; Horiuchi, J.; Potts, P.D.; Fontes, M. and Polson, J.W., 2000. What drives the tonic activity of presympathetic neurons in the rostral ventrolateral medulla? *Clin.Exp.Pharmacol.Physiol*, 27: 1049 - 1053.

de Paula, P.M. and Machado, B.H., 2000. Changes in regional vascular resistance in response to microinjection of L-glutamate into different antero-posterior coordinates of the RVLM in awake rats. *Auton.Neurosci.*, 82: 137 - 145.

Ernsberger, P.; Damon, T.H.; Graff, L.M.; Schafer, S.G. and Christen, M.O., 1993. Moxonidine, a centrally acting antihypertensive agent, is a selective ligand for I1-imidazoline sites. *J.Pharmacol.Exp.Ther.*, 264: 172 - 182.

Ernsberger, P.; Haxhiu, M.A.; Graff, L.M.; Collins, L.A.; Dreshaj, I.; Grove, D.L.; Graves, M.E.; Schafer, S.G. and Christen, M.O., 1994. A novel mechanism of action for hypertension control: moxonidine as a selective I1-imidazoline agonist. *Cardiovasc.Drugs Ther.*, 8 Suppl 1: 27 - 41.

Ernsberger, P.; Meeley, M.P.; Mann, J.J. and Reis, D.J., 1987. Clonidine binds to imidazole binding sites as well as alpha 2-adrenoceptors in the ventrolateral medulla. *Eur.J.Pharmacol.*, 134: 1 - 13.

Freeman, K.L. and Brooks, V.L., 2007. AT(1) and glutamatergic receptors in paraventricular nucleus support blood pressure during water deprivation. *Am.J.Physiol Regul.Integr.Comp Physiol*, 292: R1675 - R1682.

Gebber, G.L.; Barman, S.M. and Kocsis, B., 1990. Coherence of medullary unit activity and sympathetic nerve discharge. *Am.J.Physiol*, 259: R561 - R571.

Guertzenstein, P.G. and Silver, A., 1974. Fall in blood pressure produced from discrete regions of the ventral surface of the medulla by glycine and lesions. *J.Physiol*, 242: 489 - 503.

Guyenet, P.G., 2006. The sympathetic control of blood pressure. *Nat.Rev.Neurosci.*, 7: 335 - 346.

Guyenet, P.G., 1997. Is the hypotensive effect of clonidine and related drugs due to imidazoline binding sites? *Am.J.Physiol*, 273: R1580 - R1584.

Guyenet, P.G.; Darnall, R.A. and Riley, T.A., 1990. Rostral ventrolateral medulla and sympathorespiratory integration in rats. *Am.J.Physiol*, 259: R1063 - R1074.

Haibara, A.S.; Colombari, E.; Chianca, D.A., Jr.; Bonagamba, L.G. and Machado, B.H., 1995. NMDA receptors in NTS are involved in bradycardic but not in pressor response of chemoreflex. *Am.J.Physiol*, 269: H1421 - H1427.

Hardy, S.G., 2001. Hypothalamic projections to cardiovascular centers of the medulla. *Brain Res.*, 894: 233 - 240.

Haxhiu, M.A.; Dreshaj, I.; Schafer, S.G. and Ernsberger, P., 1994. Selective antihypertensive action of moxonidine is mediated mainly by I1-imidazoline receptors in the rostral ventrolateral medulla. *J.Cardiovasc.Pharmacol.*, 24 Suppl 1: S1 - S8.

Hayar, A. and Guyenet, P.G., 2000. Prototypical imidazoline-1 receptor ligand moxonidine activates alpha2-adrenoceptors in bulbospinal neurons of the RVL. *J.Neurophysiol.*, 83: 766 - 776.

Hoffman, P.L.; Walter, R. and Bulat, M., 1977. An enzymatically stable peptide with activity in the central nervous system: its penetration through the blood-CSF barrier. *Brain Res.*, 122: 87 - 94.

Imai, Y.; Abe, K.; Sasaki, S.; Minami, N.; Munakata, M.; Yumita, S.; Nobunaga, T.; Sekino, H. and Yoshinaga, K., 1989. Role of vasopressin in cardiovascular response to central cholinergic stimulation in rats. *Hypertension*, 13: 549 - 557.

Ito, S.; Gordon, F.J. and Sved, A.F., 1999. Dietary salt intake alters cardiovascular responses evoked from the rostral ventrolateral medulla. *Am.J.Physiol*, 276: R1600 - R1607.

Jhamandas, J.H. and Renaud, L.P., 1986. A gamma-aminobutyric-acid-mediated baroreceptor input to supraoptic vasopressin neurones in the rat. *J.Physiol*, 381: 595 - 606.

Knuepfer, M.M.; Johnson, A.K. and Brody, M.J., 1984. Identification of brainstem projections mediating hemodynamic responses to stimulation of the anteroventral third ventricle (AV3V) region. *Brain Res.*, 294: 305 - 314.

Kubo, T.; Hagiwara, Y.; Sekiya, D.; Chiba, S. and Fukumori, R., 2000. Cholinergic inputs to rostral ventrolateral medulla pressor neurons from hypothalamus. *Brain Res.Bull.*, 53: 275 - 282.

Lappe, R.W. and Brody, M.J., 1984. Mechanisms of the central pressor action of angiotensin II in conscious rats. *Am.J.Physiol*, 246: R56 - R62.

Li, D.P. and Pan, H.L., 2007. Glutamatergic inputs in the hypothalamic paraventricular nucleus maintain sympathetic vasomotor tone in hypertension. *Hypertension*, 49: 916 - 925.

Lind, R.W.; Van Hoesen, G.W. and Johnson, A.K., 1982. An HRP study of the connections of the subfornical organ of the rat. *J.Comp Neurol.*, 210: 265 - 277.

Lovick, T.A. and Li, P., 1989. Integrated function of neurones in the rostral ventrolateral medulla. *Prog.Brain Res.*, 81: 223 - 232.

Machado, B.H.; Mauad, H.; Chianca Junior, D.A.; Haibara, A.S. and Colombari, E., 1997. Autonomic processing of the cardiovascular reflexes in the nucleus tractus solitarii. *Braz.J.Med.Biol.Res.*, 30: 533 - 543.

Menani, J.V.; Barbosa, S.P.; De, L.L., Jr.; De Gobbi, J.I. and Johnson, A.K., 2002. Serotonergic mechanisms of the lateral parabrachial nucleus and cholinergic-induced sodium appetite. *Am.J.Physiol Regul.Integr.Comp Physiol*, 282: R837 - R841.

Menani, J.V.; Bedran-de-Castro, M.T. and Krieger, E.M., 1988. Influence of the anteroventral third ventricle region and sinoaortic denervation on the pressor response to carotid occlusion. *Hypertension*, 11: 1178 - 1181.

Menani, J.V.; Machado, B.H.; Krieger, E.M. and Salgado, H.C., 1988. Tachycardia during the onset of one-kidney, one-clip renal hypertension: role of the renin-angiotensin system and AV3V tissue. *Brain Res.*, 446: 295 - 302.

Menani, J.V.; Saad, W.A.; Camargo, L.A.; Renzi, A.; de Luca Junior, L.A. and Colombari, E., 1990. The anteroventral third ventricle (AV3V) region is essential for pressor, dipsogenic and natriuretic responses to central carbachol. *Neurosci.Lett.*, 113: 339 - 344.

Menezes, R.C. and Fontes, M.A., 2007. Cardiovascular effects produced by activation of GABA receptors in the rostral ventrolateral medulla of conscious rats. *Neuroscience*, 144: 336 - 343.

Moreira, T.S.; Takakura, A.C.; Menani, J.V. and Colombari, E., 2007. Involvement of central alpha1- and alpha2-adrenoceptors on cardiovascular responses to moxonidine. *Eur.J.Pharmacol.*, 563: 164 - 171.

Morrison, S.F.; Callaway, J.; Milner, T.A. and Reis, D.J., 1989. Glutamate in the spinal sympathetic intermediolateral nucleus: localization by light and electron microscopy. *Brain Res.*, 503: 5 - 15.

Paxinos, G. and Watson, C., 1986. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. New York: Academic,

Ricardo, J.A. and Koh, E.T., 1978. 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.

Richard, D. and Bourque, C.W., 1992. Synaptic activation of rat supraoptic neurons by osmotic stimulation of the organum vasculosum lamina terminalis. *Neuroendocrinology*, 55: 609 - 611.

Ross, C.A.; Ruggiero, D.A.; Park, D.H.; Joh, T.H.; Sved, A.F.; Fernandez-Pardal, J.; Saavedra, J.M. and Reis, D.J., 1984. 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.

Ross, C.A.; Ruggiero, D.A. and Reis, D.J., 1981. Projections to the spinal cord from neurons close to the ventral surface of the hindbrain in the rat. *Neurosci.Lett.*, 21: 143 - 148.

Saper, C.B. and Levisohn, D., 1983. Afferent connections of the median preoptic nucleus in the rat: anatomical evidence for a cardiovascular integrative mechanism in the anteroventral third ventricular (AV3V) region. *Brain Res.*, 288: 21 - 31.

Schlicker, E.; Armah, B.I. and Gothert, M., 1990. Central presynaptic alpha 2-autoreceptors are involved in the blood pressure-lowering effect of moxonidine. *J.Cardiovasc.Pharmacol.*, 16: 15 - 22.

Schreihofner, A.M. and Guyenet, P.G., 1997. Identification of C1 presympathetic neurons in rat rostral ventrolateral medulla by juxtacellular labeling in vivo. *J.Comp Neurol.*, 387: 524 - 536.

Scroggin, K.E.; McKeogh, D.F. and Brooks, V.L., 2002. Is osmolality a long-term regulator of renal sympathetic nerve activity in conscious water-deprived rats? *Am.J.Physiol Regul.Integr.Comp Physiol*, 282: R560 - R568.

Shi, P.; Stocker, S.D. and Toney, G.M., 2007. Organum vasculosum laminae terminalis contributes to increased sympathetic nerve activity induced by central hyperosmolality. *Am.J.Physiol Regul.Integr.Comp Physiol*, 293: R2279 - R2289.

Stocker, S.D.; Stricker, E.M. and Sved, A.F., 2001. Acute hypertension inhibits thirst stimulated by ANG II, hyperosmolality, or hypovolemia in rats. *Am.J.Physiol Regul.Integr.Comp Physiol*, 280: R214 - R224.

Stornetta, R.L.; McQuiston, T.J. and Guyenet, P.G., 2004. GABAergic and glycinergic presympathetic neurons of rat medulla oblongata identified by retrograde transport of pseudorabies virus and in situ hybridization. *J.Comp Neurol.*, 479: 257 - 270.

Sun, M.K. and Reis, D.J., 1995a. Urethane directly inhibits chemoreflex excitation of medullary vasomotor neurons in rats. *Eur.J.Pharmacol.*, 293: 237 - 243.

Sun, M.K. and Reis, D.J., 1995b. NMDA receptor-mediated sympathetic chemoreflex excitation of RVL-spinal vasomotor neurones in rats. *J.Physiol*, 482 (Pt 1): 53 - 68.

Sun, M.K.; Young, B.S.; Hackett, J.T. and Guyenet, P.G., 1988. Reticulospinal pacemaker neurons of the rat rostral ventrolateral medulla with putative sympathoexcitatory function: an intracellular study in vitro. *Brain Res.*, 442: 229 - 239.

Sved, A.F.; Ito, S. and Yajima, Y., 2002. Role of excitatory amino acid inputs to the rostral ventrolateral medulla in cardiovascular regulation. *Clin.Exp.Pharmacol.Physiol*, 29: 503 - 506.

Swanson, L.W. and Kuypers, H.G., 1980a. A direct projection from the ventromedial nucleus and retrochiasmatic area of the hypothalamus to the medulla and spinal cord of the rat. *Neurosci.Lett.*, 17: 307 - 312.

Swanson, L.W. and Kuypers, H.G., 1980b. The paraventricular nucleus of the hypothalamus: cytoarchitectonic subdivisions and organization of projections to the pituitary, dorsal vagal complex, and spinal cord as demonstrated by retrograde fluorescence double-labeling methods. *J.Comp Neurol.*, 194: 555 - 570.

Swanson, L.W. and Sawchenko, P.E., 1983. Hypothalamic integration: organization of the paraventricular and supraoptic nuclei. *Annu.Rev.Neurosci.*, 6: 269 - 324.

Tolentino-Silva, F.P.; Haxhiu, M.A.; Waldbaum, S.; Dreshaj, I.A. and Ernsberger, P., 2000. alpha(2)-adrenergic receptors are not required for central anti-hypertensive action of moxonidine in mice. *Brain Res.*, 862: 26 - 35.

Toney, G.M.; Chen, Q.H.; Cato, M.J. and Stocker, S.D., 2003. Central osmotic regulation of sympathetic nerve activity. *Acta Physiol Scand.*, 177: 43 - 55.

Urban, R.; Szabo, B. and Starke, K., 1995. Involvement of alpha 2-adrenoceptors in the cardiovascular effects of moxonidine. *Eur.J.Pharmacol.*, 282: 19 - 28.

Valladao, A.S.; Saad, W.A.; Camargo, L.A.; Renzi, A.; de Luca Junior, L.A. and Menani, J.V., 1992. AV3V lesion reduces the pressor, dipsogenic, and natriuretic responses to ventromedial hypothalamus activation. *Brain Res.Bull.*, 28: 909 - 914.

Vieira, A.A.; Colombari, E.; De, L.L., Jr.; Colombari, D.S.; de Paula, P.M. and Menani, J.V., 2010. Importance of angiotensinergic mechanisms for the pressor response to L-glutamate into the rostral ventrolateral medulla. *Brain Res.*, 1322: 72 - 80.

Vieira, A.A.; Colombari, E.; De, L.L., Jr.; Colombari, D.S. and Menani, J.V., 2006. AV3V lesions reduce the pressor response to L-glutamate into the RVLM. *Brain Res.*, 1086: 160 - 167.

Vieira, A.A.; Colombari, E.; De, L.L., Jr.; de Almeida Colombari, D.S. and Menani, J.V., 2007. Central cholinergic blockade reduces the pressor response to L-glutamate into the rostral ventrolateral medullary pressor area. *Brain Res.*, 1155: 100 - 107.

Vieira, A.A.; Colombari, E.; De, L.L., Jr.; de Almeida Colombari, D.S. and Menani, J.V., 2004. Cardiovascular responses to microinjection of L-glutamate into the NTS in AV3V-lesioned rats. *Brain Res.*, 1025: 106 - 112.

Vieira, A.A.; Nahey, D.B. and Collister, J.P., 2010. Role of the organum vasculosum of the lamina terminalis for the chronic cardiovascular effects produced by endogenous and exogenous ANG II in conscious rats. *Am.J.Physiol Regul.Integr.Comp Physiol*, 299: R1564 - R1571.

Willette, R.N.; Barcas, P.P.; Krieger, A.J. and Sapru, H.N., 1983. Vasopressor and depressor areas in the rat medulla. Identification by microinjection of L-glutamate. *Neuropharmacology*, 22: 1071 - 1079.

Xu, Z.; Ross, M.G. and Johnson, A.K., 2001. Intracerebroventricular carbachol induces FOS immunoreactivity in lamina terminalis neurons projecting to the supraoptic nucleus. *Brain Res.*, 895: 104 - 110.

Yang, Z. and Coote, J.H., 1998. Influence of the hypothalamic paraventricular nucleus on cardiovascular neurones in the rostral ventrolateral medulla of the rat. *J.Physiol*, 513 (Pt 2): 521 - 530.