

Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Departamento de Farmacologia

Neurotransmissão glutamatérgica do córtex pré-frontal medial envolvida na modulação do sistema cardiovascular de ratos: uma via receptor NMDA/óxido nítrico.

Leonardo Resstel Barbosa Moraes

Ribeirão Preto, 2006.

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Departamento de Farmacologia

Neurotransmissão glutamatérgica do córtex pré-frontal medial envolvida na modulação do sistema cardiovascular de ratos: uma via receptor NMDA/óxido nítrico.

Leonardo Resstel Barbosa Moraes

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do grau de Doutor, pelo curso de Pós-graduação em Ciências, Área de concentração: Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Morgan de Aguiar Corrêa

Ribeirão Preto, 2006.

Data da Defesa: 17 de fevereiro de 2006

Banca examinadora

Prof. Dr. Fernando Morgan de Aguiar Corrêa _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Profa. Dra. Maria Cristina de Oliveira Salgado _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. Benedito Honório Machado _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Profa. Dra. Lisete Compagno Michelini _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. Ruy Ribeiro de Campos Junior _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dedico,

A minha amada esposa Sâmia. Você sempre foi meu maior orgulho e minha maior referência.

Agradecimentos...

Ao Prof. Dr. Fernando Morgan de Aguiar Corrêa por ter confiado que eu poderia corresponder suas expectativas, pela paciência que sempre teve comigo, pela orientação, pelos princípios éticos que regem sua conduta, os quais serviram de espelho para meu processo de formação e principalmente pela grande amizade. A você Prof. Morgan meu muito obrigado.

À Prof. Dra. Maria Cristina O. Salgado pela acessoria e colaboração visando a melhor conduta e realização dessa tese.

Aos membros da banca examinadora: Prof. Dr. Benedito H. Machado, Profa. Dra. Lisete C. Michelini e Prof. Dr. Ruy R. Campos Júnior pelas sugestões que enriqueceram ainda mais o conteúdo desse trabalho.

Aos meus companheiros e amigos de laboratório, Rodrigo, Gislaíne, Cris e Milena por terem colaborado para que eu fosse feliz em nosso laboratório.

Aos meus parceiros de todas as horas dentro e fora do laboratório: Fernando e Carlos.

A Idalia I. B. Aguiar e Ivanilda A. C. Fortunato, pelo carinho e assistência técnica na realização dos procedimentos cirúrgicos e aquisição histológica.

A Simone Guilhaume, José Carlos e Eleni pela amizade e disponibilidade em ajudar sempre que necessário.

Ao pessoal da secretária Sônia Andrade, José Waldik Ramon e Fátima Petean, que, com boa vontade, carinho e muita competência, atenderam e auxiliaram com as dificuldades burocráticas.

Às funcionárias Eliana B.C. de Barros e Maria I.C. Nemoto, pelo cuidado e respeito que dedicam aos animais no biotério.

A todos os meus grandes amigos do Departamento de Farmacologia.

À minha melhor amiga e parceira América, por ter sido sempre especial em minha vida.

Aos meus pais e irmãos por todo o carinho que sempre dedicaram a mim.

A Deus, por ter colocado todas essas pessoas em minha vida e possibilitado que eu pudesse valorizar cada uma delas. E por ter me guiado em todos os momentos de minha vida, levando-me sempre às escolhas corretas.

Agradeço a CAPES e FAPESP (Processo 03/00545-5) pelo suporte financeiro.

ÍNDICE

RESUMO	11
SUMMARY	13
INTRODUÇÃO	15
OBJETIVOS	21
MATERIAIS E MÉTODOS	22
1- Animais.....	22
2- Técnica de implante de cânula guia no vCPFM.....	22
3- Canulação da artéria e veia femoral e registro da pressão arterial.....	23
4- Microinjeção de drogas no vCPFM.....	24
5- Estimulação dos barorreceptores arteriais.....	24
6- Padronização do método de análise da atividade do barorreflexo.....	25
7- Soluções e drogas utilizada.....	26
8- Determinação anatômica dos sítios de injeção de droga no vCPFM.....	27
9-Protocolos experimentais.....	28
9.1- Efeitos da administração bilateral de lidocaína no vCPFM sobre a atividade do barorreflexo em ratos não anestesiados.....	28
9.2- Efeitos da administração bilateral de ácido quinurênico no vCPFM sobre a atividade do barorreflexo em ratos não anestesiados.....	29
9.3- Efeitos da administração bilateral de DL-AP7 no vCPFM sobre a atividade do barorreflexo em ratos não anestesiados.....	29
9.4- Efeitos da administração bilateral de NBQX no vCPFM sobre a atividade do barorreflexo em ratos não anestesiados.....	30
9.5- Efeitos da administração bilateral de L-NAME no vCPFM sobre a atividade do barorreflexo em ratos não anestesiados.....	30
9.6- Efeitos da administração bilateral de N ^o -Propyl-L-Arginine no vCPFM sobre a atividade do barorreflexo em ratos não anestesiado.....	31

9.7- Efeitos da administração de L-glu no vCPFM sobre a pressão arterial e frequência cardíaca de ratos não anestesiados.....	32
9.8- Efeitos do pré-tratamento sistêmico com bloqueador ganglionar pentolínio sobre as respostas cardiovasculares à administração de L-glu no vCPFM de ratos não anestesiados.....	32
9.9- Efeitos do pré-tratamento sistêmico com antagonista seletivo beta1-adrenérgico atenolol sobre as respostas cardiovasculares à administração de L-glu no vCPFM de ratos não anestesiados.....	33
9.10- Efeitos do pré-tratamento sistêmico com antagonista muscarínico metilbrometo de homatropina sobre as respostas cardiovasculares à administração de L-glu no vCPFM de ratos não anestesiados.....	33
9.11- Efeito da pré-administração de DL-AP7 no vCPFM sobre as respostas cardiovasculares à administração de L-glu no vCPFM de ratos não anestesiados.....	34
9.12- Efeito da pré-administração de NBQX no vCPFM sobre as respostas cardiovasculares à administração de L-glu no vCPFM de ratos não anestesiados.....	34
9.13- Efeito da pré-administração de L-NAME no vCPFM sobre as respostas cardiovasculares à administração de L-glu no vCPFM de ratos não anestesiados	35
9.14- Efeito da pré-administração de N ^o -Propyl-L-Arginina no vCPFM sobre as respostas cardiovasculares à administração de L-glu no vCPFM.....	35
9.15- Efeitos da administração de NPS no vCPFM sobre a pressão arterial e frequência cardíaca de ratos não anestesiados.....	36

10- Análise estatística.....	36
RESULTADOS.....	38
1- Efeitos da administração bilateral de lidocaína no vCPFM sobre a atividade do barorreflexo em ratos não anestesiados.....	38
2- Efeitos da administração bilateral de ácido quinurênico no vCPFM sobre a atividade do barorreflexo em ratos não anestesiados.....	43
3- Efeitos da administração bilateral de DL-AP7 no vCPFM sobre a atividade do barorreflexo em ratos não anestesiados.....	47
4- Efeitos da administração bilateral de NBQX no vCPFM sobre a atividade do barorreflexo em ratos não anestesiados.....	51
5- Efeitos da administração bilateral de L-NAME no vCPFM sobre a atividade do barorreflexo em ratos não anestesiados.....	53
6- Efeitos da administração bilateral de N ^ω -Propyl-L-Arginine no vCPFM sobre a atividade do barorreflexo em ratos não anestesiados.....	55
7- Efeitos da administração de L-glu no vCPFM sobre a pressão arterial e frequência cardíaca de ratos não anestesiados.....	60
8- Efeitos do pré-tratamento sistêmico com bloqueador ganglionar pentolínio sobre as respostas cardiovasculares à administração de L-glu no vCPFM de ratos não anestesiado.....	67
9- Efeitos do pré-tratamento sistêmico com antagonista seletivo beta ₁ -adrenérgico atenolol sobre as respostas cardiovasculares à administração de L-glu no vCPFM de ratos não anestesiados.....	69
10- Efeitos do pré-tratamento sistêmico com antagonista muscarínico metilbrometo de homatropina sobre as respostas cardiovasculares à	

administração de L-glu no vCPFM de ratos não anestesiados.....	71
11- Efeito da pré-administração de DL-AP7 no vCPFM sobre as respostas cardiovasculares à administração de L-glu no vCPFM de ratos não anestesiados.....	74
12- Efeito da pré-administração de NBQX no vCPFM sobre as respostas cardiovasculares à administração de L-glu no vCPFM de ratos não anestesiados.....	77
13- Efeito da pré-administração de L-NAME no vCPFM sobre as respostas cardiovasculares da administração de L-glu no vCPFM de ratos não anestesiados.....	79
14- Efeito da pré-administração de N ^o -Propyl-L-Arginina no vCPFM sobre as respostas cardiovasculares à administração de L-glu no vCPFM de ratos não anestesiados.....	81
15- Efeitos da administração de NPS no vCPFM sobre a pressão arterial e frequência cardíaca de ratos não anestesiados.....	84
DISCUSSÃO.....	91
CONCLUSÕES.....	109
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	110
APÊNDICE	

RESUMO

Tem sido atribuída à porção ventral do córtex pré-frontal medial (vCPFM) a capacidade de influenciar a atividade cardiovascular em ratos. Essa influência do vCPFM sobre a atividade cardiovascular parece ser apenas modulatória, uma vez que sua destruição ou inativação não altera os valores basais da pressão arterial e frequência cardíaca.

A modulação do sistema cardiovascular exercida pelo vCPFM pode ser observada sobre a atividade do barorreflexo. Dentre vários neurotransmissores presentes no vCPFM, envolvidos com respostas cardiovasculares, o L-glutamato (L-glu) aparece como candidato a neuromodulador da atividade do barorreflexo. Além disso, pouco se sabe sobre a influência da neurotransmissão glutamatérgica do vMPFC sobre o sistema cardiovascular.

Nossos dados mostram que o sistema glutamatérgico do vCPFM modula tonicamente a atividade parassimpática do barorreflexo, sem alterar o componente simpático, através de receptores NMDA. Além disso, a administração de L-glu no vCPFM de ratos não anestesiados causa aumento da pressão arterial, como consequência do aumento da frequência cardíaca, dependente da atividade simpática cardíaca. Da mesma forma que a modulação da atividade do barorreflexo, as respostas cardiovasculares desencadeadas pela administração de L-glu no vCPFM também são dependente de receptores NMDA.

A síntese de óxido nítrico pela isoforma neuronal da óxido nítrico sintase (nNOS) esta associada a ativação de receptores NMDA no sistema nervoso central. Com base nesse dado, nós observamos que tanto a modulação do

barorreflexo quanto as respostas cardiovasculares causadas pela ativação de receptores NMDA dependem da síntese de óxido nítrico via nNOS.

Em resumo, nossos resultados sugerem que o sistema glutamatérgico presente no vCPFM, interagindo com o sistema nitrérgico através de receptores NMDA, está envolvido com a modulação cardíaca, mais especificamente facilitando tonicamente o componente parassimpático do barorreflexo e aumentando a atividade simpática cardíaca.

SUMMARY

It has been reported that the ventral portion of medial prefrontal cortex (vMPFC) modulates cardiovascular activity in rats. vMPFC lesion or its functional blockade do not affect basal mean arterial pressure or heart rate values, indicating lack of tonic influence of the vMPFC on the cardiovascular system.

The vMPFC cardiovascular modulation can be observed on the baroreflex activity. Among the neurotransmitters present into the vMPFC that are involved in cardiovascular responses, L-glutamate (L-glu) is a putative neurotransmitter for baroreflex modulation. Moreover, no data are available on the role of vMPFC glutamatergic system in cardiovascular control.

Our results showed a tonic vMPFC-glutamatergic modulation on the parasympathetic baroreflex activity, without affecting the sympathetic component during arterial pressure increases caused by activation of NMDA receptors. Moreover, microinjection L-glu into the vMPFC of unanesthetized rats evoked arterial pressure increase as a consequence of heart rate increase due to increased cardiac sympathetic activity. The cardiovascular response evoked by L-glu microinjection in the vMPFC was associated with activation of NMDA-receptors.

The neuronal isoform of nitric oxide sintase (nNOS) produces nitric oxide almost exclusively after activation of NMDA receptors in central nervous system. We report that baroreflex modulation and the cardiovascular responses evoked by L-glu, which are NMDA-receptor-dependent, involve nitric oxide synthesis by nNOS.

In summary, our results show that a vMPFC glutamatergic system, involving NMDA receptor-nitric oxide interaction, tonically modulates the parasympathetic component of baroreflex and facilitates cardiac sympathetic activity.

INTRODUÇÃO

Antes da década de 60 supunha-se que o rato não apresentava uma estrutura cortical que pudesse ser considerada análoga ao córtex pré-frontal de primatas. Leonard (1969) mostrou que o núcleo talâmico médio-dorsal do cérebro do rato projetava-se para duas regiões distintas do córtex frontal, que de acordo com a definição de Rose & Woolsey (1948), poderiam ser consideradas análogas ao córtex pré-frontal (CPF).

O CPF do rato pode ser dividido topograficamente em duas regiões diferentes. A primeira, uma região medial denominada córtex pré-frontal medial (CPFM), e a segunda, uma região ventrolateral denominada córtex pré-frontal lateral (CPFL) (LEONARD, 1972, KRETTEK & PRICE, 1977, SARTER & MARKOWITSCH, 1983, SARTER & MARKOWITSCH, 1984, GROENEWEGEN, 1988, SESACK et al., 1989).

O CPFM é uma estrutura do sistema límbico (CECHETTO & SAPER, 1990; VERBERNE & OWENS, 1998) que está envolvida na modulação de respostas autonômicas, exercendo influência sobre os sistemas hormonal, gastrointestinal e cardiovascular do rato (HENKE, 1983; BURNS & WYSS, 1985; HURLEY-GIUS & NEAFSEY, 1986; HARDY & HOLMES, 1988; DUNN, 1990). O CPFM é dividido em córtex cíngulo 1 e 2 (Cg1 e Cg2), córtex pré-límbico (PL), córtex infralímbico (IL) e córtex dorsopenduncular (DP), (ZILLES & WREE, 1995).

Em experimentos com estimulação elétrica pôde-se observar que a influência do CPFM sobre o sistema cardiovascular ocorre principalmente na sua porção ventral (vCPFM), composta pelo PL, IL e DP. Respostas pressoras, depressoras ou bifásicas foram relatadas, dependendo do sítio de estimulação no

vCPFM e das condições experimentais, tais como anestesia (BURNS & WYSS, 1985; TAVARES et al., 2004). A influência do vCPFM sobre o sistema cardiovascular parece ser apenas modulatória, não atuando na manutenção do tônus basal da pressão arterial (PA) ou da frequência cardíaca (FC). A lesão completa dessa área cortical ou o seu bloqueio com lidocaína não alteram quer a PA, quer a FC basal de ratos normotensos ou hipertensos (VERBERNE et al., 1987, 1988; RESSTEL et al., 2004).

Em ratos anestesiados, a estimulação elétrica do vCPFM promove apenas efeito hipotensor (BURNS & WYSS, 1985), o qual é precedido por redução da atividade simpática registrada nos nervos esplênico e lombar (VERBERNE, 1996; OWENS et al., 1999), sugerindo que o vCPFM poderia influenciar de forma diferenciada o fluxo vasomotor simpático para os leitos vasculares. Além disso, tem sido descrito que o vCPFM teria uma atividade inibitória sobre o sistema cardiovascular durante o processo de habituação (a resposta cardiovascular é caracterizada por aumento de PA e FC), observado em ratos submetidos a imersão da cauda em água gelada (GLASER & GRIFFIN, 1962).

A influência do CPM sobre o sistema cardiovascular também pode ser observada durante situações comportamentais relacionadas a reações defensivas, tais como na resposta emocional condicionada (REC - FRYSZTAK & NEAFSEY, 1991). Realizando lesões bilaterais do córtex pré-lobulocaudado (PL) e do córtex infralímbico (IL) duas estruturas que compõem a porção ventral do CPM (vCPFM), FRYSZTAK & NEAFSEY (1994) observaram uma redução na resposta taquicárdica simpática, mas não no aumento da pressão arterial induzidos pelo medo condicionado em ratos durante a REC.

Reforçando a hipótese de que o vCPFM modularia o sistema cardiovascular durante exposição a estímulos estressantes, tais como na reação de defesa, é descrito que a exposição de ratos ao modelo de labirinto em cruz elevado, a protocolos de condicionamento usando choque nas patas (modelo do medo condicionado), à aplicação de jatos de ar no focinho, ao nado forçado ou ao estresse de restrição induzem expressão de proteína fos em células do vCPFM (IMAKI et al., 1993; BECK & FIBIGER, 1995, CULLINAN et al., 1995; DUNCAN et al., 1996). Assim, podemos atribuir ao vCPFM uma atuação modulatória sobre o sistema cardiovascular durante eventos aversivos, levando a alterações na pressão arterial e frequência cardíaca.

FISK & WYSS (1997), utilizando técnica de tracejamento neuronal, descreveram que o IL e o PL apresentavam projeções para regiões conhecidamente envolvidas na modulação do sistema nervoso autônomo, tais como o hipotálamo, a amígdala (IWATA et al., 1986 a,b; Reis & LEDOUX, 1987) e o núcleo do trato solitário (LAWRENCE & JARROTT, 1996), as quais poderiam constituir substrato neuroanatômico para as respostas cardiovasculares observadas durante a estimulação do vCPFM. Além disso, o hipotálamo e a amígdala são estruturas prosencefálicas particularmente envolvidas com as respostas cardiovasculares que acompanham o medo condicionado em modelo que mimetiza o comportamento apresentado em situações de defesa (FENDT & FANSELOW, 1999; IWATA et al., 1986 a, b; REIS & LEDOUX, 1987; ROOZENDAAL et al., 1991 a, b; ARMONY et al., 1995; BOHUS et al., 1996). Essas estruturas não apenas se conectam com o vCPFM como também são

ativadas a partir da estimulação do mesmo (HOSOYA & MATSUSHITA, 1980; BRUTUS et al., 1984; HURLEY et al., 1991; MCDONALD et al., 1996).

Um importante mecanismo de regulação do sistema cardiovascular utilizado pelo sistema nervoso central é o barorreflexo (NOSAKA, 1996; LANFRANCHI & SOMERS, 2002). O barorreflexo encontra-se atenuado durante reações de defesa, favorecendo as respostas cardiovasculares decorrentes do estímulo aversivo (NOSAKA & MURATA, 1989; NEAFSEY, 1990; NOSAKA et al., 1991). Usando N-metil-D-aspartato, Verberne et al. (1987) realizaram lesões bilaterais do CPFM de ratos e observaram que a atividade do barorreflexo apresentava-se alterada em animais com o CPFM lesado, em comparação com os animais que não sofreram lesão, sugerindo que essa área participaria da modulação da atividade do barorreflexo em ratos.

Em experimentos realizados em nosso laboratório (RESSTEL et al., 2004), investigamos o envolvimento do vCPFM na modulação da atividade do barorreflexo em ratos, através do estudo do efeito do seu bloqueio com lidocaína injetada bilateralmente na área. O bloqueio agudo do vCPFM interferiu apenas no componente parassimpático do barorreflexo, o que foi caracterizado por uma redução da resposta bradicárdica reflexa a aumentos de pressão arterial decorrentes de infusão i.v. de fenilefrina. Além disso, observamos que a administração de CoCl_2 , um bloqueador não seletivo de sinapses (KRETZ, 1984), no vCPFM causou efeitos similares àqueles da lidocaína. Assim, podemos sugerir que a modulação tônica da atividade parassimpática do barorreflexo envolve neurotransmissão local no vCPFM.

Dentre os neurotransmissores presentes no vCPFM que poderiam modular a atividade tônica do barorreflexo estão a acetilcolina (LEHMANM, et al., 180; GAYKEMA et al., 1990) que via receptores muscarínicos promove hipotensão (CRIPPA et al., 1999) e modulação cardíaca durante reações de defesa (PIRCH et al., 1992) e a noradrenalina (MORRISSON et al., 1979; DIOP et al., 1987) que promove hipertensão via receptores alfa-1 (FERNANDES et al., 2003). Entretanto, a administração quer de atropina (antagonista muscarínico) quer de antagonistas seletivos α_1 -adrenérgico (WB4101) ou α_2 -adrenérgico (RX821002), bilateralmente no vCPFM não afetou a atividade do componente parassimpático do barorreflexo em resposta a aumentos da PA (RESSTEL et al., 2005), ficando em aberto a possível participação de outros neurotransmissores presentes nessa área cortical na modulação do componente parassimpático do barorreflexo.

Um importante neurotransmissor presente no vCPFM é o glutamato (GIGG et al., 1994). Verberne (1996) descreveu que a administração de L-glutamato (L-glu) no vCPFM causava quedas na pressão arterial por redução na atividade simpática em ratos anestesiados. Além disso, estudo com ligantes marcados revelou que o CPFM apresenta grande quantidade de receptores ionotrópicos glutamatérgicos, dentre eles o receptor NMDA (NICOLLE & BAXTER, 2003). Assim, o sistema glutamatérgico presente no vCPFM, aparece como possível candidato a modulador da atividade do barorreflexo em ratos.

Garthwaite et al. (1988 e 1989) demonstraram que a ativação de receptores NMDA levava à liberação de óxido nítrico (NO) no SNC. A liberação do NO após estimulação do receptor NMDA ocorria como resultado da ativação da enzima que

catalisa a síntese de NO a partir da L-arginina, chamada de sintase do NO (NOS). O mapeamento histoquímico da NOS em cérebro de ratos evidenciou a presença dessa enzima no córtex frontal, mais especificamente no córtex piriforme e no CPFM (VINCENT & KIMURA, 1992). Esses resultados levantam a possibilidade de existir no vCPFM uma atuação do sistema glutamatérgico através de receptores NMDA e NO sobre o sistema cardiovascular.

Considerando o envolvimento de sistema glutamatérgico presente no vCPFM com respostas cardiovasculares; a existência de receptores ionotrópicos para aminoácidos excitatórios e de NOS no vCPFM e o fato de ocorrer interação entre esses receptores e a NOS, o presente projeto teve como hipótese que o sistema glutamatérgico interagindo com o sistema nitrérgico presente no vCPFM, poderia influenciar a atividade do barorreflexo em ratos não anestesiados. Além disso, também testamos a hipótese de que a estimulação de receptores glutamatérgicos ou do sistema nitrérgico no vCPFM causaria efeitos diretos sobre pressão arterial e frequência cardíaca, podendo o sistema glutamatérgico atuar nessas respostas através de uma interação entre receptores NMDA e NOS.

OBJETIVOS

O presente estudo teve como objetivos específicos:

- 1- Estudar a participação da neurotransmissão glutamatérgica do vCPFM na modulação barorreflexa da frequência cardíaca. Além disso, estudar os efeitos cardiovasculares decorrentes da estimulação farmacológica de receptores glutamatérgicos no vCPFM sobre o sistema cardiovascular em ratos não anestesiados, caracterizando o tipo de receptor e os mecanismos periféricos envolvidos.
- 2- Estudar a possível interação entre o sistema nitrérgico e o sistema glutamatérgico do vCPFM na modulação barorreflexa da frequência cardíaca, bem como os efeitos cardiovasculares decorrentes da administração farmacológica de doador de NO no vCPFM e sua interação com o sistema glutamatérgico.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Animais:

Foram utilizados 177 ratos Wistar pesando entre 230-270 g. Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central do Campus da USP de Ribeirão Preto, e mantidos durante todo o tempo de experimento em caixas individuais sendo alimentados com ração granulada e água. O comitê de ética animal da instituição aprovou previamente todas as condições de manutenção e procedimentos experimentais utilizadas com os animais (4^o reunião ordinária, realizada em 25 de novembro de 2002).

2. Técnica de implante de cânula guia no vCPFM:

Os animais foram anestesiados com tribromoetanol (Sigma-Aldrich, USA) na dose de 250 mg/ Kg, i.p. Após tricotomia na cabeça, os animais foram imobilizados em um estereotáxico (Stoelting, USA) e a calota craniana foi exposta por meio de uma incisão na pele, de aproximadamente 1,5 cm de diâmetro. O periósteo foi retirado e a calota craniana secada com H₂O₂ a 10%. Todas as coordenadas tiveram como referência parâmetros do Atlas de Paxinos & Watson (1986), ajustados ao peso do animal. O bregma foi utilizado como ponto de referência para a coordenada lateral.

vCPFM unilateral:

A torre do estereotáxico foi posicionadas em um ângulo de 23 graus.

.Antero-posterior: +11,7 mm em relação à linha interaural.

.Lateral: +0,5 mm a partir do bregma.

.Vertical: -2,6 mm em relação ao osso.

vCPFM bilateral:

As torres do estereotáxico foram posicionadas em um ângulo de 23 graus.

.Antero-posterior: +11,7 mm em relação à linha interaural.

.Lateral: +2,5 mm a partir do bregma.

.Vertical: -3,2 mm em relação ao osso.

Uma cânula de aço inoxidável de 11 mm de comprimento e 0,55 mm de diâmetro externo foi introduzida no vCPFM do animal através de um orifício, feito com uma broca odontológica. A cânula foi fixada ao crânio com resina acrílica autopolimerizável. Um mandril, de 0,2 mm de diâmetro, foi introduzido na cânula para evitar a obstrução da mesma durante o período de recuperação do animal.

Como medida profilática, cada animal recebeu por via intramuscular 0,2 mL de Pentabiótico veterinário (Fontoura-Wyeth, BR), ao final da cirurgia.

3. Canulação da artéria e veia femoral e registro da atividade cardiovascular:

Quatro dias após o procedimento com o estereotáxico, o animal foi novamente anestesiado com tribromoetanol, na dose de 250 mg/ kg, aplicado i.p. Um cateter foi implantado na artéria femoral para registro da pressão arterial e outro na veia homônima para administração sistêmica de drogas. Os cateteres eram constituídos de um segmento de polietileno PE-10 (3-4 cm) soldado a um outro seguimento PE-50 (12-13 cm), preenchidos com anticoagulante (heparina a 0,3% em salina) e obstruídos em sua terminação externa com um pino de metal. Uma vez implantados, os cateteres foram exteriorizados na região escapular no dorso do rato, sendo fixados por linha de sutura.

O registro da atividade cardiovascular (PA e FC) foi realizado 24 horas após o procedimento cirúrgico para a implantação dos cateteres na artéria e veia

femoral, permitindo a completa recuperação dos animais dos efeitos do anestésico. Os animais foram mantidos em caixas individuais durante o período pós-operatório e de registro da PA e FC. O catéter arterial, previamente heparinizado, foi conectado a um transdutor de pressão, acoplado a um amplificador HP7754-A (Hewlett Packard, USA), por sua vez conectado a um sistema de aquisição de dados computadorizado (Biopac, USA). Foram registradas as pressões arteriais pulsátil (PAP), a pressão arterial média (PAM) e a FC.

4. Microinjeção de drogas no vCPFM.

A lidocaína foi administrada em um volume de 0,5 μ L e as demais drogas foram administradas em um volume de 0,2 μ L, através de uma agulha injetora 1 mm mais longa do que as cânulas guias. A agulha injetora foi conectada a uma seringa de 1 μ L (Hamilton, USA) por meio de um tubo de polietileno (PE-10, Clay-Adams, USA).

5. Estimulação dos barorreceptores arteriais.

A estimulação dos barorreceptores arteriais foi realizada por infusão i.v. de fenilefrina (50 μ g/ mL) causando efeito pressor ou nitroprussiato de sódio (NPS, 50 μ g/ mL) causando efeito depressor, utilizando-se uma bomba de infusão (KD Scientific, USA). O catéter da veia femoral foi conectado através de um tubo de polietileno PE-50 a uma seringa de 1 mL preenchida com a solução vasoativa. A seringa, por sua vez, foi montada na bomba de infusão a qual foi programada para uma velocidade de infusão de 0,34 mL/ min/ Kg para a fenilefrina e 0,8 mL/ min/ Kg para o NPS. Sob estas condições foi possível a obtenção de uma variação na

pressão arterial (pressora ou depressora) entre 50 a 60 mmHg em um período de tempo de 40 a 50 segundos de infusão.

6. Padronização do método de análise da atividade do barorreflexo.

Após a infusão dos agentes vasoativos os dados registrados (PAM e FC) foram analisados para a observação da atividade do barorreflexo. A análise foi feita relacionando os pontos da variação de PAM com a variação da FC reflexa correspondente. Utilizando os pontos obtidos da correlação na variação da PA e FC durante as infusões de fenilefrina e NPS, foram traçadas curvas sigmóides como descrito na literatura (KORNER et al, 1972). A avaliação de cada curva sigmóide foi feita com base em três parâmetros (Figura 01): **1-** variação da FC (ΔP , bpm, diferença entre os valores máximos e mínimos dos platôs da frequência cardíaca); **2-** Pressão arterial média (PA_{50} , mmHg, valor de PAM que promove 50% de variação na FC) e **3-** Variação do ganho (G, bpm/ mmHg, é a variação da inclinação da curva).

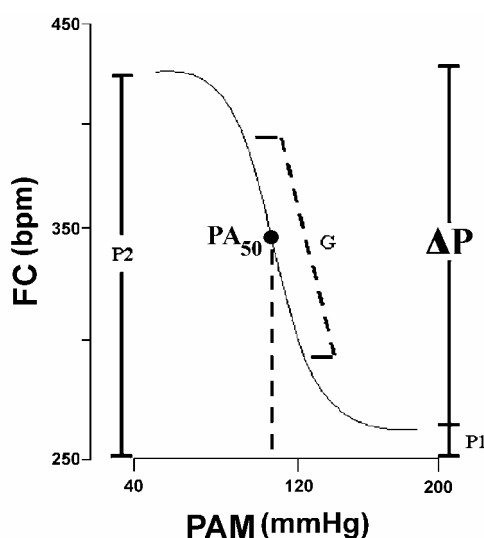


Figura 01- Parâmetros da curva sigmóide do barorreflexo relacionando frequência cardíaca (FC) e pressão arterial média (PAM). P1 (bpm), platô mínimo da frequência cardíaca. P2 (bpm), platô máximo da frequência cardíaca. (P (bpm), diferença entre P1 e P2. PA_{50} (mmHg), média da pressão arterial quando a frequência cardíaca variar 50%. G, ganho (inclinação da curva).

Partindo dos mesmos pontos obtidos da correlação dos valores de PAM e FC correspondente, foram traçadas curvas de regressão linear e determinada a atividade do barorreflexo separando a atividade barorreflexa durante o efeito pressor e depressor na PA. O valor da FC para cada valor de PA foi assumido decorrido 1,2 s. Este retardo na resposta reflexa da FC deve-se a dois fatores: o tempo de processamento das sinapses do barorreflexo, que de acordo com estudos de Su et al., (1992), é de aproximadamente 700 ms e o retardo eletrônico do próprio sistema de registro, que é de aproximadamente 500 ms.

7. Soluções e drogas utilizadas:

- Fenilefrina (agonista adrenérgico - α_1), (SIGMA, USA).
- Nitroprussiato de sódio (doador de óxido nítrico), (SIGMA, USA).
- Veículo - salina - NaCl a 0,9%.
- Tribromo etanol (SIGMA, USA).
- Uretana (SIGMA, USA).
- Cloridrato de lidocaína a 0,2% (ASTRA, BR).
- Ácido quinurênico (antagonista de receptores ionotrópicos glutamatérgicos), (TOCRIS, USA).
- L-glu (agonista glutamatérgico), (TOCRIS, USA).
- Pentolínio (ganglioplégico), (SIGMA, USA).
- Atenolol, (antagonista seletivo beta1-adrenoceptor), (SIGMA, USA).
- Metilbrometo de homatropina (antagonista muscarínico), (Sigma, USA).
- DL-AP7 (antagonista seletivo NMDA), (TOCRIS, USA).
- NBQX (antagonista seletivo para receptores não NMDA), (TOCRIS, USA).

- N(G)-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME, inibidor da óxido nítrico sintase), (RBI, USA).
- N^ω-Propyl-L-Arginine (N-Propyl, inibidor seletivo da óxido nítrico sintase neuronal), (TOCRIS, USA).

8. Determinação anatômica dos sítios de injeção de droga no vCPFM:

Ao final de cada experimento, os animais foram anestesiados com uretana na dose de 1,25 g/ kg, i.p. antes de iniciar-se a perfusão. Foram injetados 0,2 µL de corante azul de Evan a 1% unilateralmente ou bilateralmente (a depender do protocolo) no vCPFM, para evidenciar o sítio de injeção na área. Em seguida, os ratos foram submetidos à abertura do tórax para a exposição do coração, uma incisão foi feita na aurícula direita para o escoamento do sangue e do perfusado e uma agulha para perfusão foi então introduzida no ventrículo esquerdo. A perfusão foi realizada inicialmente com 20 mL de salina, seguida por 20 mL de solução tamponada de formalina a 10%.

Ao final da perfusão, o cérebro foi retirado da caixa craniana e pós-fixado em solução de perfusão. No dia seguinte, o cérebro foi seccionado em cortes frontais de 40 µm de espessura, utilizando um criostato (modelo CM 1900, Leica, Alemanha) e corados com acetato de cresil violeta 0,5 % (ACROS ORGANICS, USA) diluído em uma solução de etanol a 20 %. Os cortes foram analisados utilizando o Atlas de Paxinos & Watson (1986) como referência.

9. Protocolos experimentais

Parte 01

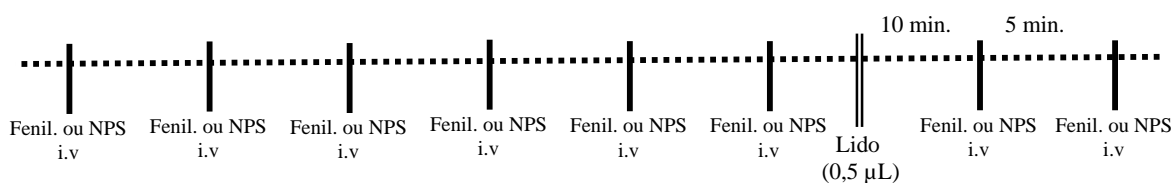
Estudo da neurotransmissão glutamatérgica do vCPFM na modulação do barorreflexo.

Os protocolos experimentais descritos a seguir tiveram como objetivo estudar os efeitos da administração local no vCPFM de antagonistas farmacológicos ou de inibidores da NOS sobre a modulação da atividade do barorreflexo, em ratos não anestesiados.

A atividade do barorreflexo foi estudada verificando a resposta reflexa da FC à infusão i.v. de fenilefrina ou NPS. Após adaptação dos animais às condições ambientais do laboratório, foram realizadas inicialmente três infusões de fenilefrina e três infusões de NPS de forma randômica para verificar a atividade do barorreflexo antes dos tratamentos.

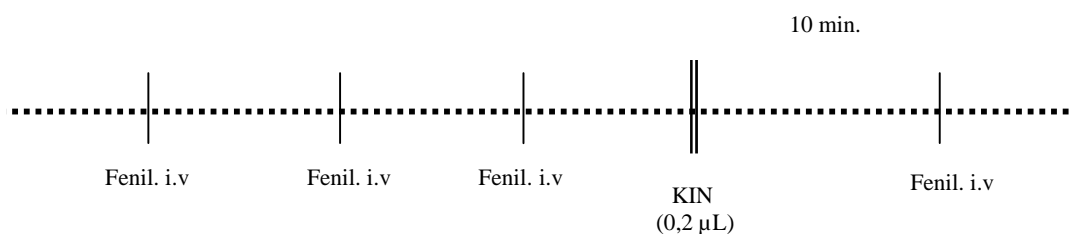
9.1. Efeitos da administração bilateral de lidocaína no vCPFM sobre a atividade do barorreflexo em ratos não anestesiados.

A lidocaína 2% (anestésico local) foi administrada em um volume 0,5 µL, bilateralmente no vCPFM, com objetivo de avaliar a participação dessa área na modulação do barorreflexo.



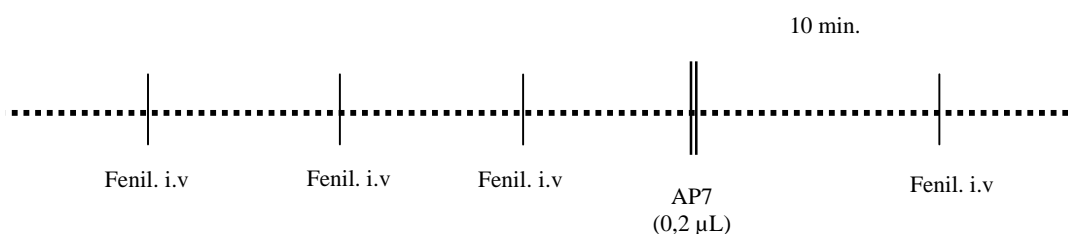
9.2. Efeitos da administração bilateral de ácido quinurênico no vCPFM sobre a atividade do barorreflexo em ratos não anestesiados.

O ácido quinurênico (KIN, antagonista não seletivo para receptores ionotrópicos) foi administrado na dose de 16 nmol/ 0,2 μ L (dose baseada no trabalho de HAIBARA et al., 1999), bilateralmente no vCPFM, com objetivo de avaliar a participação de receptores ionotrópicos para aminoácidos excitatórios presentes nessa área na modulação do barorreflexo.



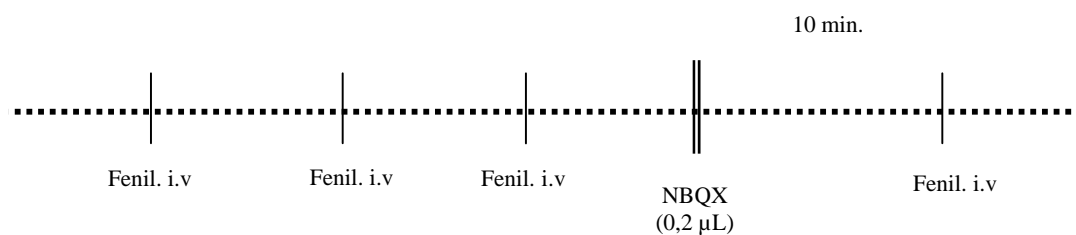
9.3. Efeitos da administração bilateral de DL-AP7 no vCPFM sobre a atividade do barorreflexo em ratos não anestesiados.

O AP7 (antagonista seletivo para receptores NMDA) foi administrado na dose de 4 nmol/ 0,2 μ L (dose baseada no trabalho de VIARD & SAPRU, 2002), bilateralmente no vCPFM, com objetivo de avaliar a participação de receptores NMDA presentes nessa área na modulação do barorreflexo.



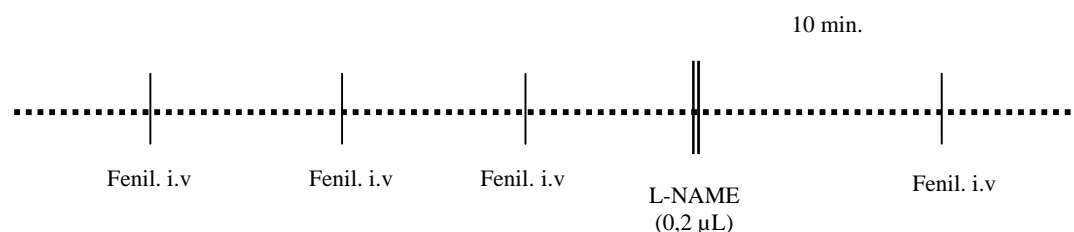
9.4. Efeitos da administração bilateral de NBQX no vCPFM sobre a atividade do barorreflexo em ratos não anestesiados.

O NBQX (antagonista seletivo para receptores não-NMDA) foi administrado na dose de 4 nmol/ 0,2 μ L (mesma dose utilizada de AP7), bilateralmente no vCPFM, com objetivo de avaliar a participação de receptores não-NMDA presentes nessa área na modulação do barorreflexo.



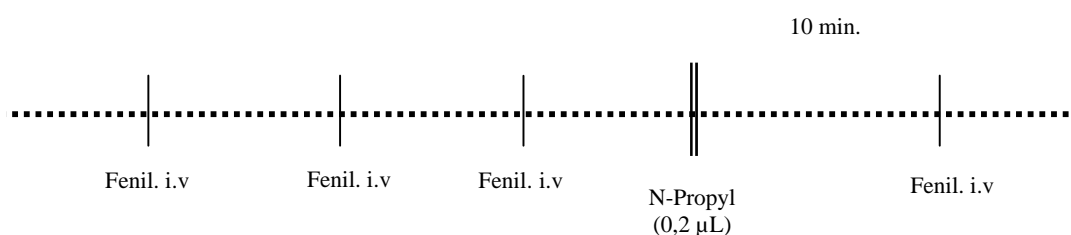
9.5. Efeitos da administração bilateral de L-NAME no vCPFM sobre a atividade do barorreflexo em ratos não anestesiados.

O L-NAME (inibidor da NOS) foi administrado na dose de 80 nmol/ 0,2 μ L (dose baseada no trabalho de LIU et al., 2004), bilateralmente no vCPFM, com objetivo de avaliar a participação da NOS presente nessa área na modulação do barorreflexo.



9.6. Efeitos da administração bilateral de N^o-Propyl-L-Arginine no vCPFM sobre a atividade do barorreflexo em ratos não anestesiados.

O N^o-Propyl-L-Arginine (N-Propyl, inibidor seletivo da NOS neuronal-nNOS) foi administrado na dose de 0,08 nmol/ 0,2 µL (dose baseada no trabalho de ZHANG et al., 1997), bilateralmente no vCPFM, com objetivo de avaliar a participação da NOS presente nessa área na modulação do barorreflexo.



Parte 02

Estudo dos efeitos sobre a PA e FC causados pela estimulação do sistema glutamatérgico no vCPFM.

Com a utilização de agonistas e antagonistas farmacológicos, os protocolos experimentais descritos a seguir tiveram como objetivo estudar os efeitos da estimulação farmacológica do vCPFM sobre a PA e FC em ratos não anestesiados, caracterizando os tipos de receptores e os possíveis mecanismos periféricos envolvidos com essas respostas cardiovasculares.

Uma cânula guia foi implantada no vCPFM dos ratos. Após quatro dias após a cirurgia de implante da cânula guia foi feita a canulação da artéria femoral e no dia seguinte foi realizado o experimento. Nos experimentos onde se fez necessária à administração i.v. de drogas, os animais tiveram cateteres colocados

na veia femoral. Os animais estavam em livre movimentação durante todo o experimento, e as drogas foram injetadas após a estabilização da PA e FC.

9.7. Efeitos da administração de L-glu no vCPFM sobre a pressão arterial e frequência cardíaca de ratos não anestesiados.

Foram construídas curvas dose-resposta com administração unilateral no vCPFM de L-glu (agonista glutamatérgico), a partir da dose 20 nmol/ 0,2 µL (dose baseada no trabalho de VERBERNE, 1996), com o objetivo de avaliar seu efeito sobre a PA e FC em ratos não anestesiados. Para a construção das curvas de PA e FC, cada animal recebeu no mínimo duas e no máximo três doses de L-glu, em ordem variada.

9.8. Efeitos do pré-tratamento sistêmico com bloqueador ganglionar pentolínio sobre as respostas cardiovasculares da administração de L-glu no vCPFM de ratos não anestesiados.

O objetivo desse experimento foi verificar se as respostas cardiovasculares produzidas pela administração de L-glu no vCPFM ocorrem com a participação do sistema nervoso autonômico. Inicialmente os animais receberam L-glu (81nmol/ 0,2µL) no vCPFM. Após 10 minutos da administração de L-glu os animais receberam a administração i.v. (1mL/ Kg) de salina ou pentolínio (10mg/ Kg, dose baseada no trabalho de MORIGUCHI et al, 1998). Passado o tempo necessário para a PA e FC voltarem aos níveis controle, os animais receberam uma nova administração de L-glu no vCPFM.

9.9. Efeitos do pré-tratamento sistêmico com antagonista seletivo beta₁-adrenérgico atenolol sobre as respostas cardiovasculares da administração de L-glu no vCPFM de ratos não anestesiados.

O objetivo desse experimento foi verificar se as respostas cardiovasculares produzidas pela administração de L-glu no vCPFM ocorrem com a participação de receptores beta₁-adrenérgicos cardíacos. Inicialmente os animais receberam L-glu (81nmol/ 0,2μL) no vCPFM. Após 10 minutos da administração de L-glu os animais receberam a administração i.v. (1mL/ Kg) de salina ou atenolol (1,5 mg/ Kg, dose baseada no trabalho de LAHLOU, 2003). Passado o tempo necessário para a PA e FC se estabilizarem, os animais receberão uma nova administração de L-glu no vCPFM.

9.10. Efeitos do pré-tratamento sistêmico com antagonista muscarínico metilbrometo de homatropina sobre as respostas cardiovasculares da administração de L-glu no vCPFM de ratos não anestesiados.

O objetivo desse experimento foi verificar se as respostas cardiovasculares produzidas pela administração de L-glu no vCPFM ocorrem com a participação de receptores muscarínicos cardíacos. Inicialmente os animais receberam L-glu (81nmol/ 0,2μL) no vCPFM. Após 10 minutos da administração de L-glu os animais receberam a administração i.v. (1mg/ Kg) de salina ou metilbrometo de homatropina (MBH, 1,5 mg/ Kg, dose baseada no trabalho de COLEMAN, 1980). Passado o tempo necessário para a PA e FC se estabilizarem, os animais receberão uma nova administração de L-glu no vCPFM.

9.11. Efeito da pré-administração de DL-AP7 no vCPFM sobre as respostas cardiovasculares da administração de L-glu no vCPFM de ratos não anestesiados.

O objetivo do presente experimento foi verificar o efeito da administração de um antagonista seletivo para receptores NMDA (AP7) no vCPFM nas respostas cardiovasculares desencadeadas pela administração de L-glu no vCPFM. Para tanto, os animais desse grupo receberam uma administração de L-glu (81nmol/ 0,2µL) no vCPFM. Passados 20 minutos do final dos efeitos cardiovasculares da administração do L-glu, foi administrado o AP7 (4 nmol/ 0,2µL, dose baseada no experimento 3) ou salina, e após 10 minutos foi novamente administrado o L-glu.

9.12. Efeito da pré-administração de NBQX no vCPFM sobre as respostas cardiovasculares da administração de L-glu no vCPFM de ratos não anestesiados.

O objetivo do presente experimento foi verificar o efeito da administração de um antagonista seletivo para receptores não-NMDA (NBQX) no vCPFM nas respostas cardiovasculares desencadeadas pela administração de L-glu no vCPFM. Para tanto, os animais desse grupo receberam uma administração de L-glu (81nmol/ 0,2µL) no vCPFM. Passados 20 minutos do final dos efeitos cardiovasculares da administração do L-glu, foi administrado o NBQX (4 nmol/ 0,2µL, dose baseada no experimento 4) ou salina, e após 10 minutos foi novamente administrado o L-glu.

9.13. Efeito da pré-administração de L-NAME no vCPFM sobre as respostas cardiovasculares da administração de L-glu no vCPFM de ratos não anestesiados.

O objetivo do presente experimento foi verificar o efeito da administração de um inibidor da NOS, L-NAME, no vCPFM para observar o envolvimento da síntese de NO nas respostas cardiovasculares desencadeadas pela administração de L-glu no vCPFM. Para tanto, os animais desse grupo receberam uma administração de L-glu (81nmol/ 0,2µL) no vCPFM. Passados 20 minutos do final dos efeitos cardiovasculares da administração do L-glu foi administrado o L-NAME (80 nmol/ 0,2µL dose baseada no experimento 5) ou salina, e após 10 minutos foi novamente administrado o L-glu no vCPFM.

9.14. Efeito da pré-administração de N^o-Propyl-L-Arginina no vCPFM sobre as respostas cardiovasculares da administração de L-glu no vCPFM de ratos não anestesiados.

O objetivo do presente experimento foi verificar o efeito da administração de um inibidor da seletivo para nNOS, N-Propyl, no vCPFM para observar o envolvimento da síntese de NO via nNOS nas respostas cardiovasculares desencadeadas pela administração de L-glu no vCPFM. Para tanto, os animais desse grupo receberam uma administração de L-glu (81nmol/ 0,2µL) no vCPFM. Passados 20 minutos do final dos efeitos cardiovasculares da administração do L-glu foi administrado o L-NAME (0,08 nmol/ 0,2µl dose baseada no experimento 6) ou salina, e após 10 minutos foi novamente administrado o L-glu no vCPFM.

9.15. Efeitos da administração de NPS no vCPFM sobre a pressão arterial e frequência cardíaca de ratos não anestesiados.

O objetivo do presente experimento foi verificar o efeito da administração do doador de óxido nítrico (NO) NPS no vCPFM para observar o possível envolvimento desse composto nas respostas cardiovasculares. Para tanto, foram construídas curvas dose-resposta com administração unilateral no vCPFM de NPS, a partir da dose de 20 nmol/ 0,2 μ L (dose baseada no trabalho de Inoue et al., 1997). Para a construção das curvas de PA e FC, cada animal recebeu duas ou três doses de NPS, em ordem variada.

10. Análise estatística:

Os parâmetros das curvas sigmóides foram comparados antes e após o tratamento com lidocaína utilizando teste t de Student pareado.

A inclinação das curvas de regressão linear e o intercepto das curvas no eixo x foram determinados e comparados antes e após os tratamentos para verificar alterações no ganho do barorreflexo e deslocamento das curvas (respectivamente) utilizando teste t de Student pareado.

Para verificar o efeito dos tratamentos sobre a bradicardia reflexa induzida pelo aumento na PA, foi comparada a bradicardia reflexa antes e após os tratamentos correspondente ao aumento de 10, 20, 30 e 40 mmHg na PAM. Partindo dessas comparações foi determinada a variação percentual média da resposta bradicárdica reflexa induzida em cada tratamento, e essa variação foi então comparada com a variação obtida com o grupo controle (administração de salina 0,9% no vCPFM). Esses dados foram analisados utilizando one-way ANOVA seguido do pós-teste de Dunnett's.

Nos protocolos em que foram testados os efeitos da estimulação direta dos sistemas glutamatérgico ou administrado doador de NO no vCPFM bem como os efeitos do pré-tratamento com antagonistas ou inibidor da NOS ou os efeitos da inibição de mecanismos periféricos que atuam sobre o sistema cardiovascular sobre as respostas máximas de PA e FC foi utilizado teste t de Student pareado. A PA e FC também foram analisadas utilizando a análise de variância (ANOVA) de duas vias com tratamento como principal fator e o tempo como medida repetida. Em caso de interação significativa entre os fatores foi realizado o pós-teste de Boferroni para comparar os tratamentos em cada tempo. Todos os testes estatísticos foram realizados assumindo-se o nível de significância de $p < 0,05$.

RESULTADOS

1. Efeitos da administração bilateral de lidocaína no vCPFM sobre a atividade do barorreflexo em ratos não anestesiados .

A administração bilateral de salina no vCPFM (n= 6) não causou mudanças nos valores basais da PAM (antes= 99 ± 6 e após= 99 ± 5 mmHg; t= 0,9; p> 0,05) ou FC (antes= 355 ± 9 e após= 375 ± 10 bpm; t= 0,5; p> 0,05). A administração de salina não produziu qualquer efeito sobre a atividade do barorreflexo (inclinação das curvas de regressão linear durante queda da FC antes e após a administração de salina foram: $-1,4 \pm 0,2$ e $-1,1 \pm 0,3$ bpm/ mmHg; t= 0,3; p> 0,05 e durante o aumento da FC antes e após foram $-2,6 \pm 0,3$ e $-2,5 \pm 0,3$ bpm/ mmHg; t= 0,7; p> 0,05).

A administração bilateral de lidocaína no vCPFM (n= 8) não afetou os valores basais da PAM (antes= $92,6 \pm 6,2$ e após= $99,3 \pm 5,2$ mmHg; t= 0,4; p> 0,05) ou FC (antes= $355,2 \pm 9,6$ e após= $375,1 \pm 12,6$ bpm; t= 0,5; p> 0,05).

A administração de lidocaína no vCPFM foi capaz de alterar a atividade do barorreflexo. A variação da atividade do barorreflexo nas curvas sigmóides, antes e após a administração da lidocaína no vCPFM está representada na Figura 02. A administração da lidocaína no vCPFM alterou o platô mínimo da FC (P1) caracterizado por menor queda na FC (293 ± 2 para 320 ± 11 bpm; t= 2,4; p< 0,05). Nenhum dos outros parâmetros das curvas sigmóides avaliados foi diferente após a administração da lidocaína no vCPFM: platô máximo da FC (P2, 458 ± 11

para 461 ± 7 bpm; $t= 0,2$; $p> 0,05$), ΔP (165 ± 12 para 141 ± 17 bpm; $t= 1,1$; $p> 0,05$), PA_{50} (88 ± 2 para 84 ± 2 mmHg; $t= 0,05$; $p> 0,05$) e G (inclinação, $-16,3 \pm 0,9$ para $-16,1 \pm 4,7$ bpm/ mmHg; $t= 1,1$; $p> 0,05$).

Para uma melhor avaliação dos efeitos da administração de lidocaína no vCPFM sobre a atividade do barorreflexo, nós analisamos separadamente a bradicardia e a taquicardia reflexa promovidas pela variação da PA usando curvas de regressão linear (Figura 03).

Tanto os valores da inclinação quanto do intercepto no eixo x nas curvas de regressão linear geradas com o aumento da FC como função da queda da PAM após a administração de lidocaína no vCPFM foram similares aqueles observados antes da lidocaína (inclinação antes= $-2,6 \pm 0,2$ e após = $-2,5 \pm 0,3$ bpm/ mmHg; $t= 0,6$; $p> 0,05$; intercepto-x antes = $-3,2 \pm 2,8$ e após = $-3,6 \pm 3,5$ mmHg; $t= 0,9$; $p> 0,05$; Figura 03).

A administração de lidocaína no vCPFM causou um deslocamento da curva de regressão linear para a direita mudando a FC como função do aumento da PAM (Figura 03). O aumento no intercepto do eixo x foi significativo após a administração da lidocaína (antes= $-3,3 \pm 3,5$ e após= $7,5 \pm 1,4$ mmHg; $t= 5,6$; $p< 0,05$) e nenhuma mudança foi observada na inclinação da curva (antes = $-1,2 \pm 0,2$ e após = $-1,1 \pm 0,2$ bpm/ mmHg; $t= 0,4$; $p> 0,05$) (Figura 03). O bloqueio do vCPFM pela lidocaína causou um “reset” do início da bradicardia reflexa para aumentos da PAM. Após 10 minutos da administração bilateral de lidocaína no vCPFM ocorreu uma redução significativa na bradicardia reflexa ($44,6 \pm 3,2$ %) em

relação a bradicardia reflexa anterior a administração da lidocaína para os mesmos aumentos da PAM de forma significativa quando comparadas com a variação da bradicardia observada após a administração de salina ($-2,4 \pm 9,3 \%$; $F= 23,9$; $p < 0,01$) Figura 04 B). A recuperação da atividade do barorreflexo para aumentos da PAM pôde ser observada após 60 minutos da administração de lidocaína (Figura 04 B, $1,2 \pm 2,1 \%$; teste t de Student, $t= 0,2$; $p > 0,05$; comparado com o grupo salina) indicando a reversibilidade do efeito da lidocaína. Como apenas o componente parassimpático do barorreflexo (bradicardia) foi afetado pelo bloqueio agudo do vCPFM com a lidocaína, os experimentos subseqüentes foram realizados apenas com a infusão i.v. de fenilefrina.

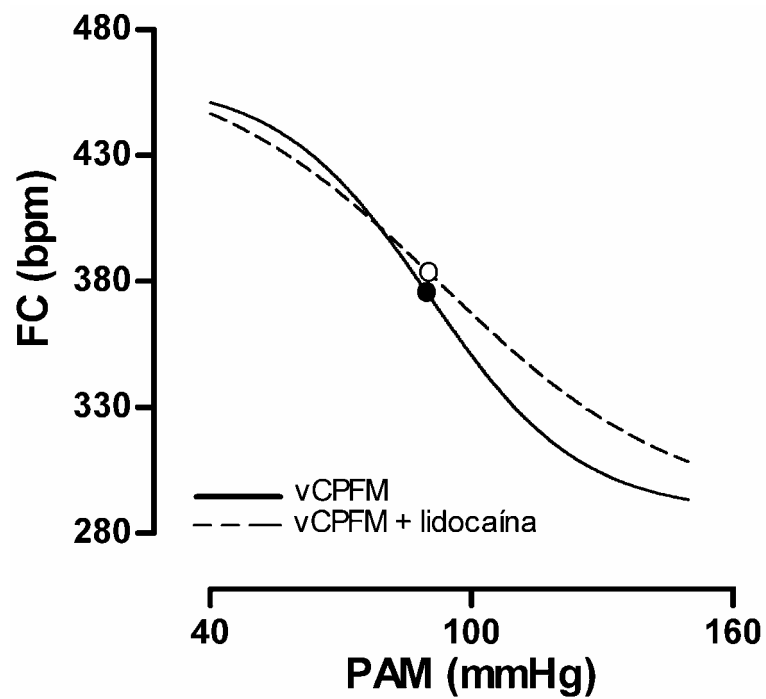


Figura 02- Curvas sigmóides representando a atividade do barorreflexo antes (linha contínua, $r^2 = 0,95$) e após (linha tracejada, $r^2 = 0,9$) a administração bilateral de $0,5 \mu\text{L}$ de lidocaína a 2% no vCPFM de ratos não anestesiados ($n = 8$). FC: frequência cardíaca; PAM: pressão arterial média.

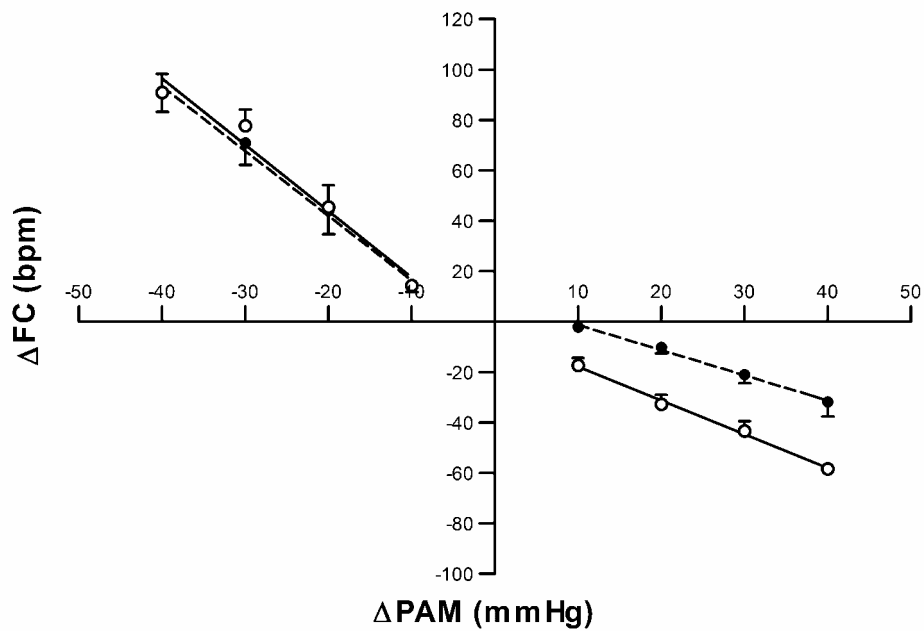


Figura 03- As curvas de regressão linear representam a atividade do barorreflexo antes (linha contínua) e após (linha tracejada) a administração bilateral de 0,5 μ L de lidocaína a 2% no vCPFM de ratos não anestesiados (n= 8). FC: frequência cardíaca; PAM: pressão arterial média. Correlação dos valores das curvas de regressão (r^2) para a bradicardia foram 0,91 antes e após a lidocaína. Correlação dos valores das curvas de regressão (r^2) para a taquicardia foram 0,9 antes e 0,94 após a lidocaína.

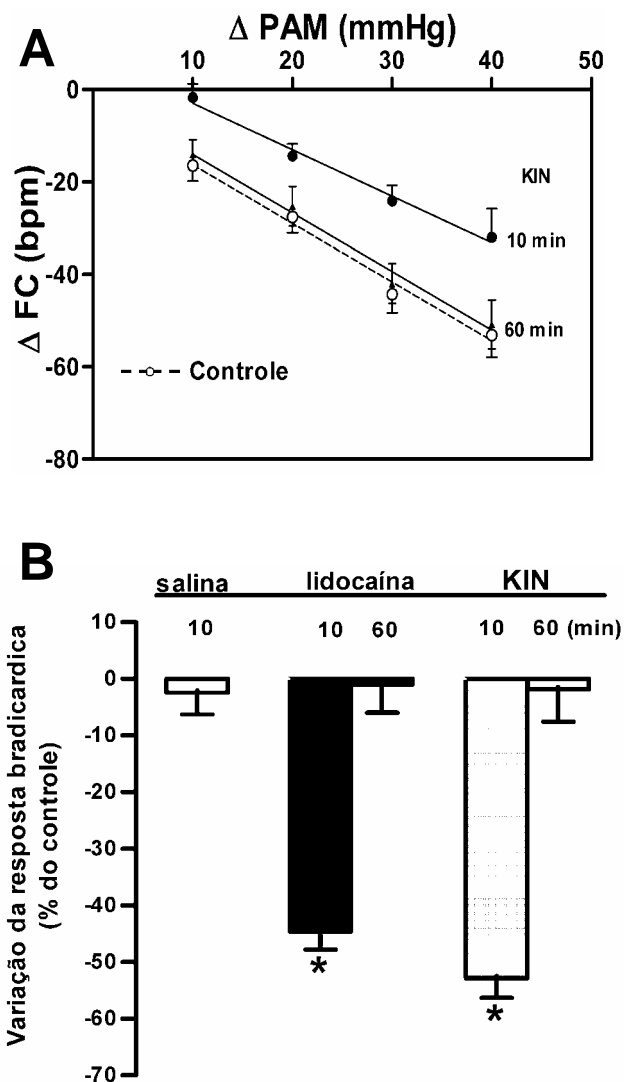
2. Efeitos da microinjeção bilateral de ácido quinurênico no vCPFM sobre o componente parassimpático do barorreflexo em ratos não anestesiados .

A microinjeção bilateral de KIN no vCPFM (n= 7) não afetou os valores basais da PAM (antes= 95 ± 7 e após= 99 ± 6 mmHg; $t= 0,7$; $p > 0,05$) ou FC (antes= 344 ± 11 e após= 365 ± 10 bpm; $t= 0,02$; $p > 0,05$).

A administração de KIN no vCPFM causou deslocamento da curva de regressão linear para a direita mudando a FC como função do aumento da PAM (Figura 04 A). O aumento no intercepto do eixo x foi significativo após a administração do KIN (antes= $-2,8 \pm 3,1$ e após= $7,1 \pm 2,3$ mmHg; $t= 4,7$; $p < 0,01$) e nenhuma mudança foi observada na inclinação da curva (antes= $-1,13 \pm 0,17$ e após= $-1,20 \pm 0,18$ bpm/ mmHg; $t= 0,7$; $p > 0,05$) (Figura 04 A). O aumento no intercepto do eixo x retornou aos valores anteriores a administração do KIN após 60 minutos de sua administração ($-1,1 \pm 1,2$ mmHg; $t= 1,5$; $p > 0,05$) e nenhuma mudança foi observada na inclinação da curva ($-1,2 \pm 0,1$ bpm/ mmHg; $t= 0,6$; $p > 0,05$) (Figura 04 A).

O bloqueio do vCPFM pelo KIN diminuiu a bradicardia reflexa para os aumentos da PA (Figura 05). Aumentos na PAM após 10 minutos da administração de KIN no vCPFM resultaram em redução da resposta bradicárdica reflexa, ocorrendo uma redução significativa da resposta bradicárdica reflexa ($52,8 \pm 4,1$ %) em relação a bradicardia reflexa anterior a administração de KIN para os mesmos aumentos da PAM de forma significativa quando comparadas com a variação da bradicardia observada com a administração de salina ($2,4 \pm 9,3$ %; $F= 23,9$; $p < 0,05$; Figura 04 B). A recuperação na integridade da atividade do

barorreflexo para aumentos da PAM pôde ser observada após 60 minutos da administração de KIN (Figura 04, $3,7 \pm 4,1$ %; teste t de Student, $t= 0,9$; $p> 0,05$; comparado com o grupo salina) indicando a reversibilidade do efeito do KIN. A redução da resposta bradicárdica provocada pela administração de KIN no vCPFM foi similar àquela observada após a administração de lidocaína, $52,8 \pm 4,1$ e $44,6 \pm 3,2$ % (teste t de Student, $t= 1,7$; $p> 0,05$) respectivamente.



Figuras 04- (A) Curvas de regressão linear representando a atividade do barorreflexo antes (controle, linha tracejada, $r^2= 0,9$) e após 10 e 60 minutos (linhas contínuas, $r^2= 0,78$ e $r^2= 0,86$ respectivamente) a administração bilateral de 16 nmol/ 0,2 μ L de ácido quinurênico (KIN) no vCPFM de ratos não anestesiados (n= 7). (B) Variação média da resposta bradicárdica (% do controle) em cada grupo durante a resposta pressora 10 e 60 minutos após administração de lidocaína (n= 8) ou ácido quinurênico (n= 7) no vCPFM comparada a variação do grupo salina (n= 6). As colunas representam as médias \pm EPM, *significativamente diferente do grupo salina, $p < 0,05$, one way-ANOVA e Dunnett's pós-teste.

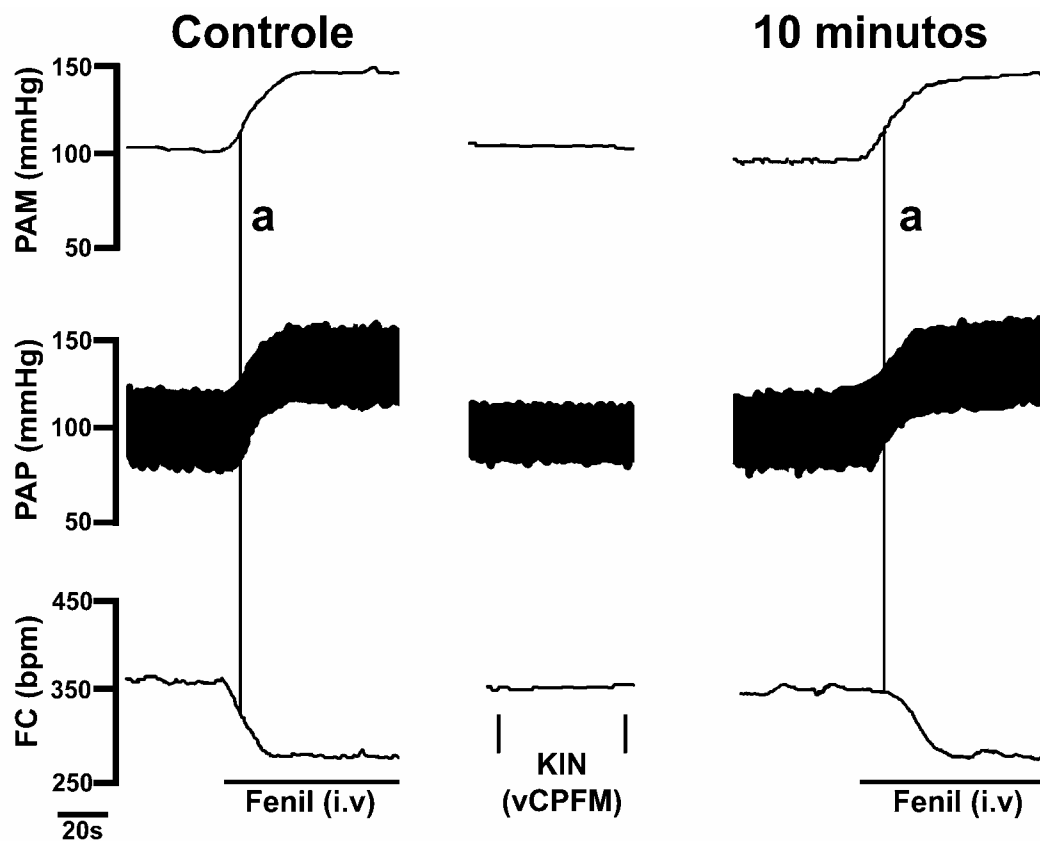


Figura 05- Traçados de pressão arterial média (PAM), pressão arterial pulsátil (PAP) e frequência cardíaca (FC) de um rato representativo do grupo, mostrando o efeito 10 minutos após a administração bilateral de 16 nmol/ 0,2 μ L de ácido quinurênico (KIN) no vCPFM sobre a resposta bradicárdica reflexa. As linhas verticais (a) indicam o aumento de 10 mmHg na PAM.

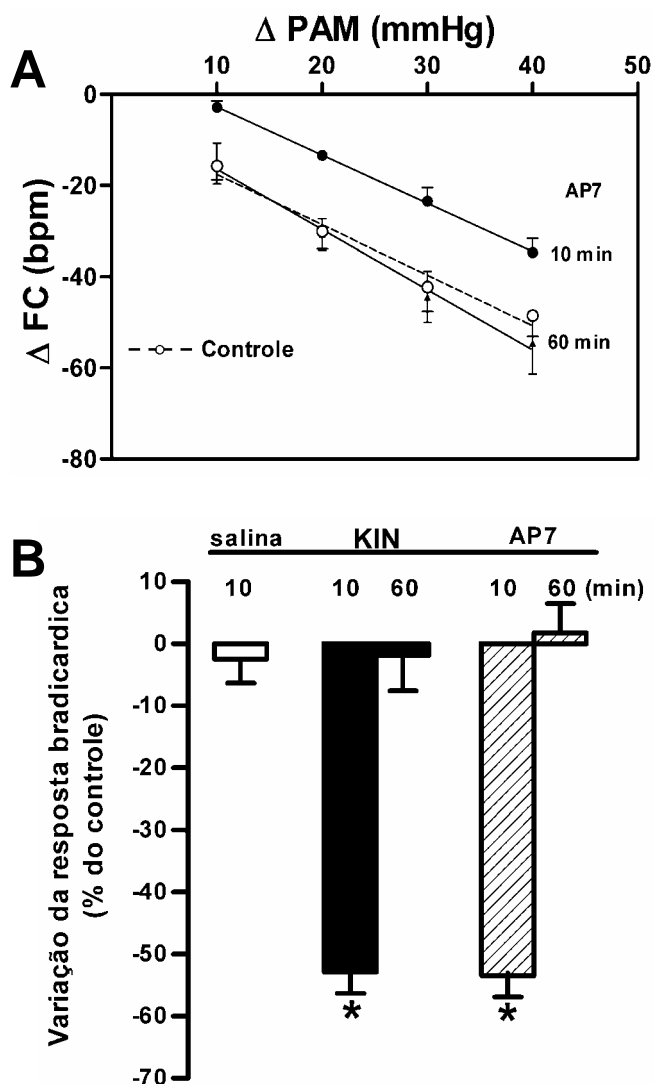
3. Efeitos da administração bilateral de DL-AP7 no vCPFM sobre o componente parassimpático do barorreflexo em ratos não anestesiados .

A administração bilateral de AP7 no vCPFM (n =6) não afetou os valores basais da PAM (antes= 100 ± 6 e após= 99 ± 5 mmHg; $t= 0,7$; $p> 0,05$) ou FC (antes= 341 ± 17 e após= 352 ± 13 bpm; $t= 0,06$; $p> 0,05$).

A administração de AP7 no vCPFM causou deslocamento da curva de regressão linear para a direita mudando a FC como função do aumento da PAM (Figura 06 A). O aumento no intercepto do eixo x foi significativo após a administração do AP7 (antes= $-5,8 \pm 5,2$ e após= $7,1 \pm 2,6$ mmHg; $t= 4,3$; $p< 0,01$) e nenhuma mudança foi observada na inclinação da curva (antes = $-1,1 \pm 0,2$ e após = $-1 \pm 0,1$ bpm/ mmHg; $t= 0,8$; $p> 0,05$; Figura 06 A). O aumento no intercepto do eixo x retornou aos valores anteriores a administração do AP7 após 60 minutos de sua administração ($-2,4 \pm 3,6$ mmHg; $t= 0,7$; $p> 0,05$) e nenhuma mudança foi observada na inclinação da curva ($-1,3 \pm 0,2$ bpm/ mmHg; $t= 0,9$; $p> 0,05$) (Figura 06 A). O bloqueio do vCPFM pelo AP7 causou um “reset” da bradicardia reflexa para os aumentos da PAM (Figura 07).

Aumentos na PAM após 10 minutos da microinjeção bilateral de AP7 no vCPFM resultaram em respostas bradicárdicas reflexas (53 ± 11 %) significativamente menores quando comparadas aquelas após a administração de salina ($2,4 \pm 9,3$ %; $F= 23,9$; $p< 0,05$; Figura 06 B). A recuperação da atividade do barorreflexo para aumentos da PAM pôde ser observada após 60 minutos da administração de AP7 (Figura 06 B, $1,7 \pm 8,2$ %; teste t de Student, $t= 0,7$; $p> 0,05$, comparado com o grupo salina) indicando a reversibilidade do efeito do AP7. A

redução da resposta bradicárdica provocada pela administração bilateral de AP7 no vCPFM foi similar àquela observada após a administração bilateral de KIN, 53 ± 11 vs. $52,8 \pm 4,1$ % (teste t de Student, $t= 0,2$; $p> 0,05$) respectivamente.



Figuras 06- (A) Curvas de regressão linear representando a atividade do barorreflexo antes (controle, linha tracejada, $r^2= 0,85$) e após 10 e 60 minutos (linhas contínuas, $r^2= 0,96$ e $r^2= 0,87$ respectivamente) a administração bilateral de 4 nmol/ 0,2 μ L de AP7 no vCPFM de ratos não anestesiados (n= 6). (B) Variação média da resposta bradicárdica (% do controle) em cada grupo durante a resposta pressora 10 e 60 minutos após administração de ácido quinurenico (KIN, n =7) ou AP7 (n= 6) no vCPFM comparada a variação do grupo salina (n= 6). As colunas representam as médias \pm EPM, *significativamente diferente do grupo salina, $p < 0,01$, one way-ANOVA e Dunnett's pós-teste.

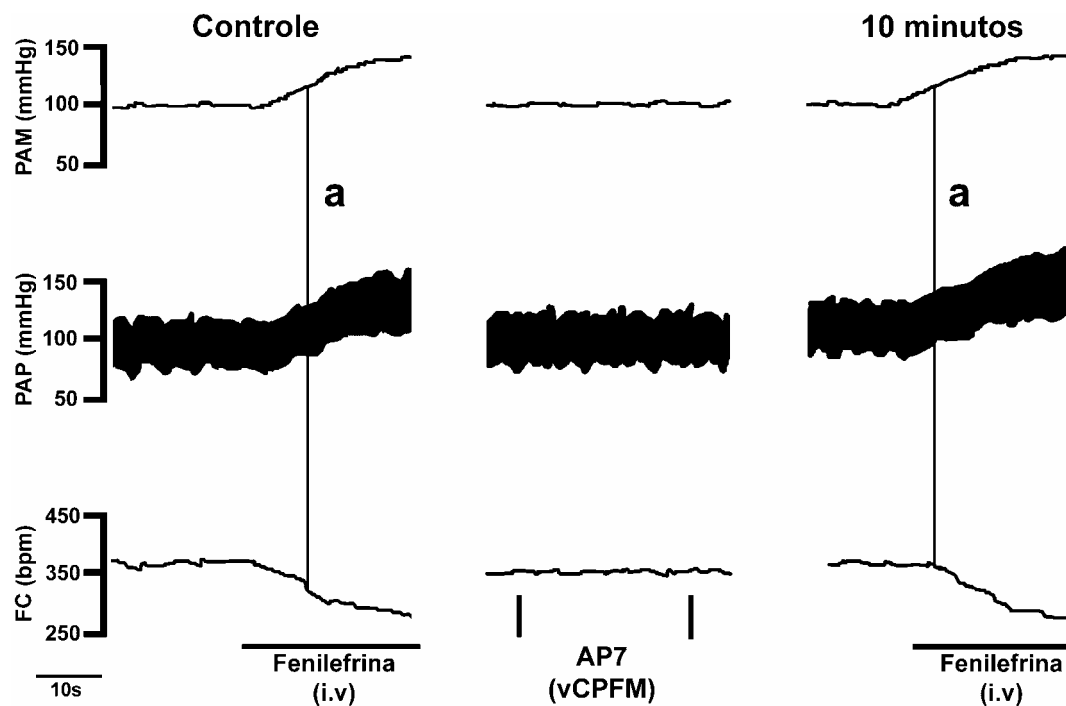


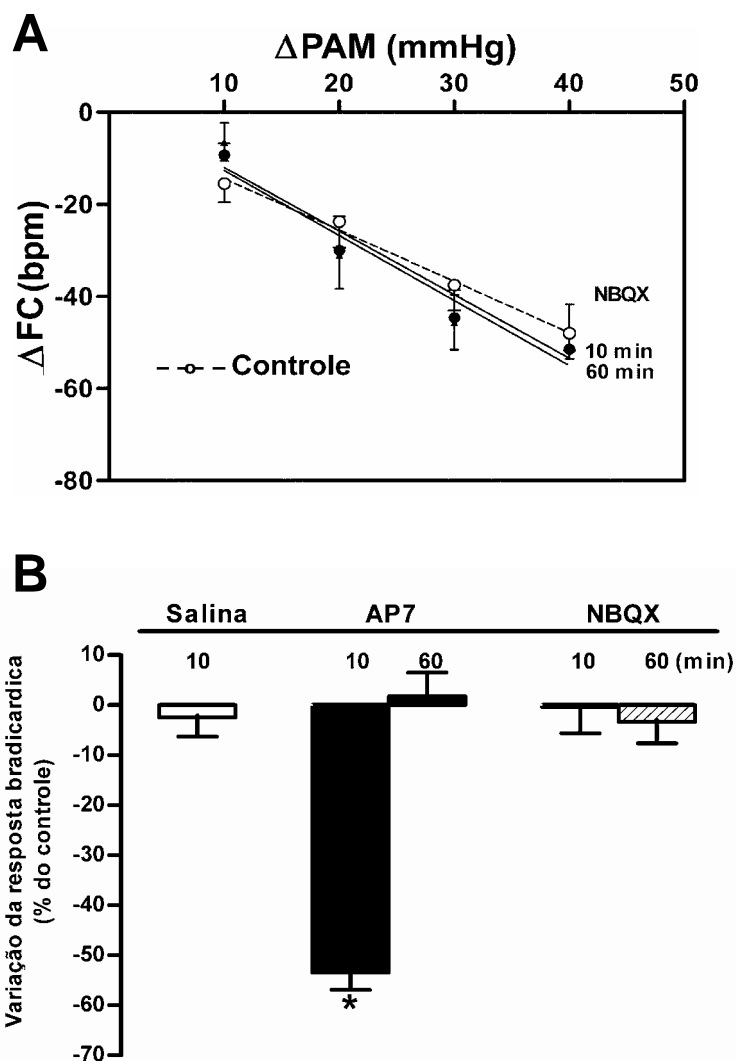
Figura 07- Traçados de pressão arterial média (PAM), pressão arterial pulsátil (PAP) e frequência cardíaca (FC) de um rato representativo do grupo, mostrando o efeito 10 minutos após a administração bilateral de 4 nmol/ 0,2 μ L de AP7 no vCPFM sobre a resposta bradicárdica reflexa. As linhas verticais (a) indicam o aumento de 10 mmHg na PAM.

4. Efeitos da microinjeção bilateral de NBQX no vCPFM sobre a atividade do barorreflexo em ratos não anestesiados .

A microinjeção bilateral de NBQX no vCPFM (n= 6) não afetou os valores basais da PAM (antes= 102 ± 7 e após= 95 ± 8 mmHg; $t= 0,8$; $p> 0,05$) ou FC (antes= 363 ± 19 e após= 341 ± 19 bpm; $t= 0,6$; $p> 0,05$).

A microinjeção bilateral de NBQX no vCPFM não alterou a curva de regressão linear (Figura 08 A). A variação do intercepto no eixo x não foi significativa após a administração do NBQX (antes= $-2,9 \pm 5,6$ e após= $1 \pm 6,3$ mmHg; $t= 0,4$; $p> 0,05$) e nenhuma mudança foi observada na inclinação da curva (antes = $-1,1 \pm 0,2$ e após = $-1,4 \pm 0,2$ bpm/ mmHg; $t= 1$; $p> 0,05$; Figura 08 A).

Aumentos na PAM após 10 minutos da microinjeção bilateral de NBQX no vCPFM não alteraram a resposta bradicárdica reflexa (3 ± 14 %) em relação a administração de salina ($2,4 \pm 9,3$ %; teste t de Student, $t= 0,03$; $p> 0,05$; Figura 08 B). Os valores da curva gerada 60 minutos após a administração de NBQX não foram diferentes dos valores observados antes da administração (Figura 08 B).



Figuras 08- (A) Curvas de regressão linear representando a atividade do barorreflexo antes (controle, linha tracejada, $r^2= 0,79$) e após 10 e 60 minutos (linhas contínuas, $r^2= 0,86$ e $r^2= 0,88$ respectivamente) a administração bilateral de 4 nmol/ 0,2 μ L de NBQX no vCPFM de ratos não anestesiados (n= 5). (B) Variação média da resposta bradicárdica (% do controle) em cada grupo durante a resposta pressora 10 e 60 minutos após administração de AP7 (n =6) ou NBQX (n= 5) no vCPFM comparada a variação do grupo salina (n =5). As colunas representam as médias \pm EPM, *significativamente diferente do grupo salina, $p < 0,05$, one way-ANOVA e Dunnett's pós-teste.

5. Efeitos da microinjeção bilateral de L-NAME no vCPFM sobre a atividade do barorreflexo em ratos não anestesiados .

A microinjeção bilateral de L-NAME no vCPFM (n= 6) não afetou os valores basais da PAM (antes= 97 ± 8 e após= 96 ± 5 mmHg; $t= 0,7$; $p> 0,05$) ou FC (antes= 358 ± 12 e após= 355 ± 12 bpm; $t= 0,08$; $p> 0,05$).

A microinjeção bilateral de L-NAME no vCPFM causou deslocamento da curva de regressão linear para a direita mudando a FC como função do aumento da PAM (Figura 09 A). O aumento no intercepto do eixo x foi significativo após a administração do L-NAME (antes= $-2 \pm 2,1$ e após= $7,7 \pm 3,1$ mmHg; $t= 2,6$; $p< 0,05$) e nenhuma mudança foi observada na inclinação da curva (antes = $-1,5 \pm 0,1$ e após = $-1 \pm 0,5$ bpm/ mmHg; $t= 0,5$; $p> 0,5$; Figura 09 A). O aumento no intercepto do eixo x retornou aos valores anteriores a administração do L-NAME após 60 minutos de sua administração ($-5,7 \pm 6$ mmHg; $t= 0,6$; $p> 0,05$) e nenhuma mudança foi observada na inclinação da curva ($-1,3 \pm 0,1$ bpm/ mmHg; $t= 0,8$; $p> 0,05$) (Figura 09 A).

Aumentos na PAM após 10 minutos da microinjeção bilateral de L-NAME no vCPFM resultaram em redução da resposta bradicárdica reflexa ($49 \pm 7,5$ %) significativamente diferente da administração de salina ($2,4 \pm 9,3$ %; $F= 23,9$; $p< 0,01$; Figura 09 B). A recuperação da atividade do barorreflexo para aumentos da PAM pôde ser observada após 60 minutos da administração de L-NAME (Figura 10, $0,15 \pm 2$ %; teste t de Student, $t= 0,7$; $p> 0,05$, comparado com o grupo salina) indicando a reversibilidade do efeito do L-NAME (Figura 09 B). A redução da resposta bradicárdica provocada pela administração bilateral de L-NAME no

vCPFM foi similar àquela observada após a administração bilateral de AP7, $49 \pm 7,5$ vs. 53 ± 11 (teste t de Student, $t= 0,7$; $p> 0,5$) respectivamente.

6. Efeitos da microinjeção bilateral de N^o-Propyl-L-Arginina no vCPFM sobre a atividade do barorreflexo em ratos não anestesiados .

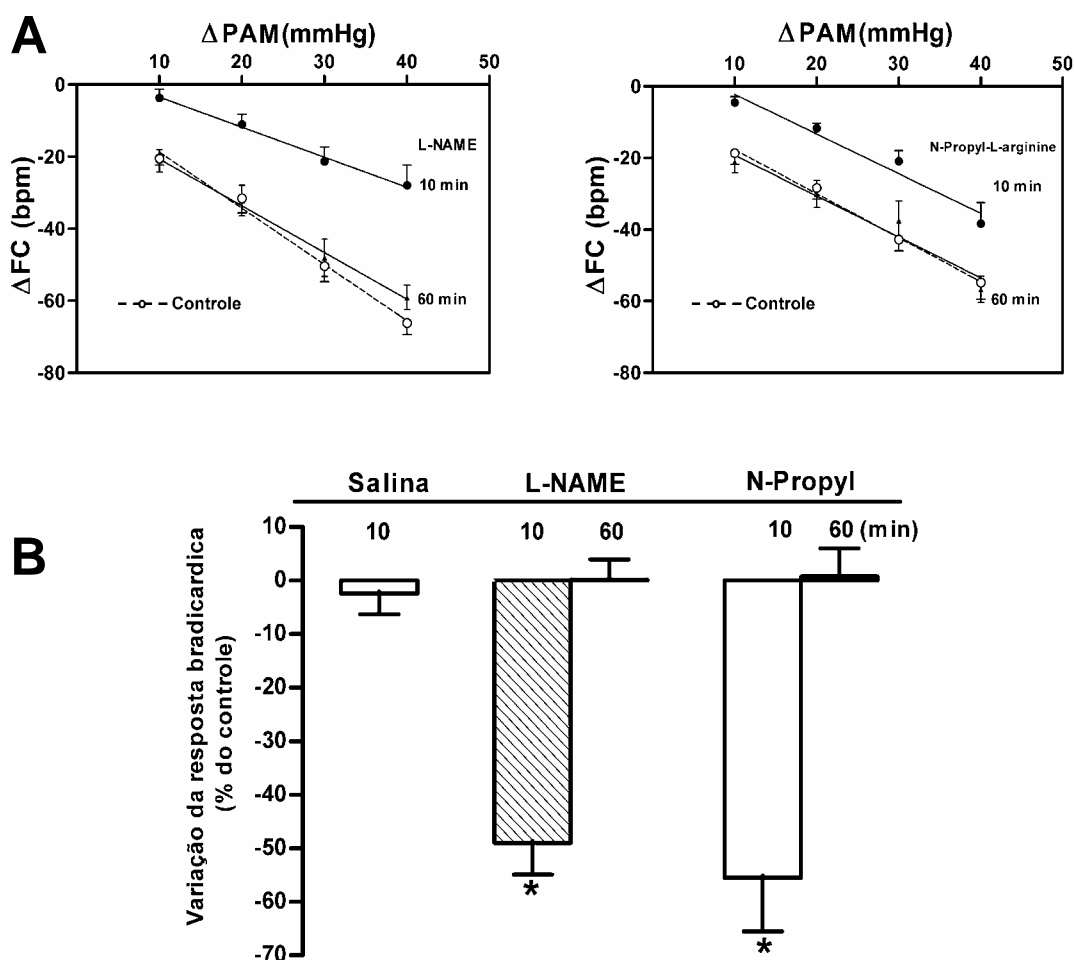
A microinjeção bilateral de N-Propyl no vCPFM (n= 6) não afetou os valores basais da PAM (antes= 101 ± 4 e após= 98 ± 5 mmHg; $t= 0,4$; $p> 0,05$) ou FC (antes= 368 ± 13 e após= 335 ± 11 bpm; $t= 0,18$; $p> 0,05$).

A microinjeção bilateral de N-Propyl no vCPFM causou deslocamento da curva de regressão linear para a direita mudando a FC como função da PAM (Figura 09). O aumento no intercepto do eixo x foi significativo após a administração do N-Propyl (antes= $-4,4 \pm 4,2$ e após= $7,9 \pm 3,1$ mmHg; $t= 2,4$; $p< 0,05$) e nenhuma mudança foi observada na inclinação da curva (antes = $-1,2 \pm 0,15$ e após = $-1,1 \pm 0,15$ bpm/ mmHg; $t= 0,4$; $p> 0,5$; Figura 09). O aumento no intercepto do eixo x retornou aos valores anteriores a administração do N-Propyl após 60 minutos de sua administração ($-6,8 \pm 5$ mmHg; $t= 0,36$; $p> 0,05$) e nenhuma mudança foi observada na inclinação da curva ($-1,1 \pm 0,2$ bpm/ mmHg; $t= 0,4$; $p> 0,05$) (Figura 09 A). A administração de N-Propyl no vCPFM causou um “reset” da bradicardia reflexa para os aumentos da PAM (Figura 10).

Aumentos na PAM após 10 minutos da microinjeção bilateral de N-Propyl no vCPFM resultaram em redução da resposta bradicárdica reflexa ($55 \pm 9,9$ %) significativamente diferente da administração de salina ($2,4 \pm 9,3$ %; $F= 23,9$; $p< 0,01$; Figura 09). A recuperação da atividade do barorreflexo para aumentos da PAM pôde ser observada após 60 minutos da administração de N-Propyl ($0,8 \pm 5,3$ %; teste t de Student, $t= 0,5$; $p> 0,05$, comparado com o grupo salina) indicando a reversibilidade do efeito do N-Propyl. A redução da resposta

bradicárdica provocada pela administração bilateral de N-Propyl no vCPFM foi similar àquela observada após a administração bilateral de L-NAME, $55 \pm 9,9$ vs. $49 \pm 7,5$ (teste t de Student, $t= 0,6$; $p> 0,05$) respectivamente.

A Figura 11 mostra uma representação diagramática do vCPFM (PAXINOS & WATSON, 1986) indicando o centro dos sítios de injeção KIN, AP7, NBQX, L-NAME e N-Propyl e uma fotomicrografia de um corte coronal do encéfalo de um rato representativo que recebeu microinjeções bilaterais no vCPFM.



Figuras 09- **(A)** Curvas de regressão linear representando a atividade do barorreflexo antes (controle, linha tracejada, $r^2= 0,96$ e $r^2= 0,74$) e após 10 e 60 minutos (linhas contínuas, $r^2= 0,83$ e $r^2= 0,89$, $r^2= 0,73$ e $r^2= 0,7$, respectivamente) a administração bilateral de 80 nmol/ 0,2 μ l de L-NAME ou 0,08 nmol/ 0,2 μ L de N-Propyl no vCPFM de ratos não anestesiados (n= 6). **(B)** Variação média da resposta bradicárdica (% do controle) em cada grupo durante a resposta pressora 10 e 60 minutos após administração de L-NAME (n= 6) ou N-Propyl (n= 6) no vCPFM comparada a variação do grupo salina (n= 6). As colunas representam as médias \pm EPM, *significativamente diferente do grupo salina, $p < 0,05$, one way-ANOVA e Dunnett's pós-teste.

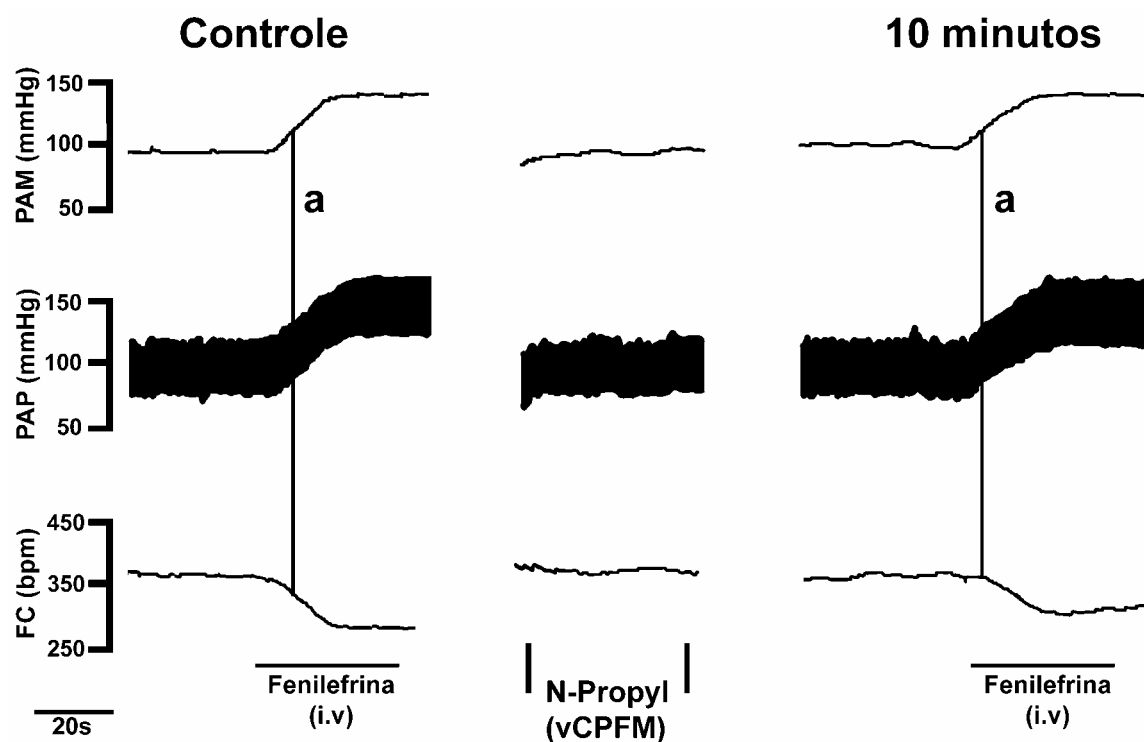


Figura 10- Traçados de pressão arterial média (PAM), pressão arterial pulsátil (PAP) e frequência cardíaca (FC) de um rato representativo do grupo, mostrando o efeito 10 minutos após a administração bilateral de 0,08 nmol/ 0,2 μ L de N-Propyl no vCPFM sobre a resposta bradicárdica reflexa. As linhas verticais (a) indicam o aumento de 10 mmHg na pressão arterial.

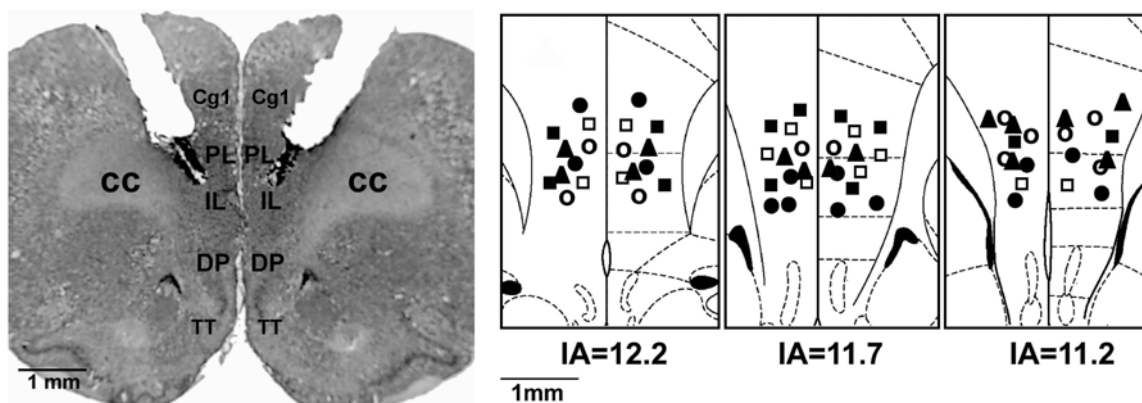


Figura 11-Esquerda: Fotomicrografia de um corte coronal do encéfalo de um animal representativo mostrando os sítios das microinjeções bilaterais no vCPFM. Cg1- córtex cingulado, área 1; PL- córtex pré-limbico; IL- córtex infralimbico; DP- córtex dorsal peduncular; cc- corpo caloso e TT- tenia tecta. **Direita:** Representação diagramática baseada no Atlas de Paxinos e Watson (1986), indicando o centro dos sítios de injeção do KIN (●), AP7 (○), NBQX (□), L-NAME (■) e N-Propyl(▲). IA- interaural.

7. Efeitos da microinjeção de L-glu no vCPFM sobre a pressão arterial e frequência cardíaca de ratos não anestesiados.

A microinjeção de diferentes doses de L-glu (9; 27; 81; 150; 300 nmol) no vCPFM de ratos não anestesiados, desencadeou respostas pressoras ($r= 0,8$; $df= 54$; $p< 0,05$) e taquicardias ($r= 0,74$; $df= 54$; $p< 0,05$) de forma dose-dependente (Figura 12). Foi observada uma significativa correlação entre os valores de ΔFC e ΔPAM correspondentes aos aumentos das doses de L-glu administradas no vCPFM ($r= 0,99$; $df= 2$; $p< 0,05$), Figura 12.

Os efeitos da administração de L-glu sobre a PA e FC não foram diferentes nas três áreas que compõem o vCPFM, quando comparadas entre si (Figura 13, Tabela 1 e 2 no apêndice). A dose de 81 nmol/ 0,2 μL de L-glu foi à dose escolhida para ser utilizada nos experimentos subseqüentes por se aproximar da DE_{50} . A Figura 14 apresenta um traçado de um rato representativo do grupo, mostrando os efeitos cardiovasculares promovidos pela administração de 81 nmol/ 0,2 μL de L-glu no vCPFM.

A microinjeção de 81 nmol/ 0,2 μL de L-glu no vCPFM de ratos normotensos ($PAM= 98 \pm 4$ mmHg, $n= 14$) causou resposta pressora ($\Delta PAM= 18, \pm 1$ mmHg, $n= 14$) que foi acompanhada de taquicardia ($\Delta FC= 28,2 \pm 4,2$ bpm, $n= 14$), significativamente diferente da administração de salina ($\Delta PAM= 2,1 \pm 1,8$ mmHg, $\Delta FC= 3,4 \pm 4,3$ bpm, $t= 8,2$; $p< 0,05$ e $t= 4,1$; $p< 0,05$, $n= 9$, respectivamente). O tempo de latência para o efeito do L-glu foi de 126 ± 17 s (PAM) e 117 ± 12 s (FC) com duração de 217 ± 29 s (PAM) e 224 ± 25 s (FC) (Figura 15), havendo efeito do tratamento (PAM: $F= 63,26$; $p< 0,05$ e FC: $F= 48,7$; $p< 0,05$), efeito do tempo (PAM: $F= 3,5$; $p< 0,05$ e FC: $F= 1,9$; $p< 0,05$), com interação entre esses fatores

(PAM: $F= 3,6$; $p< 0,05$ e FC: $F= 1,7$; $p< 0,05$) em relação à administração de salina (Figura 15).

Não foram observadas alterações na PA e FC após a administração de L-glu no córtex do cíngulo-área 1 (Cg1; PAM antes= 100 ± 3 e após= 104 ± 3 mmHg; $t= 0,7$; $p> 0,05$ e FC antes= 354 ± 10 e após= 348 ± 13 bpm; $t= 1,9$; $p> 0,05$; $n= 4$), corpo caloso (cc; PAM antes= 100 ± 3 e após= 103 ± 2 mmHg; $t= 0,9$; $p> 0,05$ e FC antes= 361 ± 9 e após= 359 ± 11 bpm; $t= 0,8$; $p> 0,05$; $n= 5$) e tênia tecta (TT; PAM antes= 101 ± 3 e após= 104 ± 4 mmHg; $t= 0,4$; $p> 0,05$ e FC antes= 347 ± 14 e após= 361 ± 16 bpm; $t= 0,6$; $p> 0,05$; $n= 4$) de ratos não anestesiados (Figura 16).

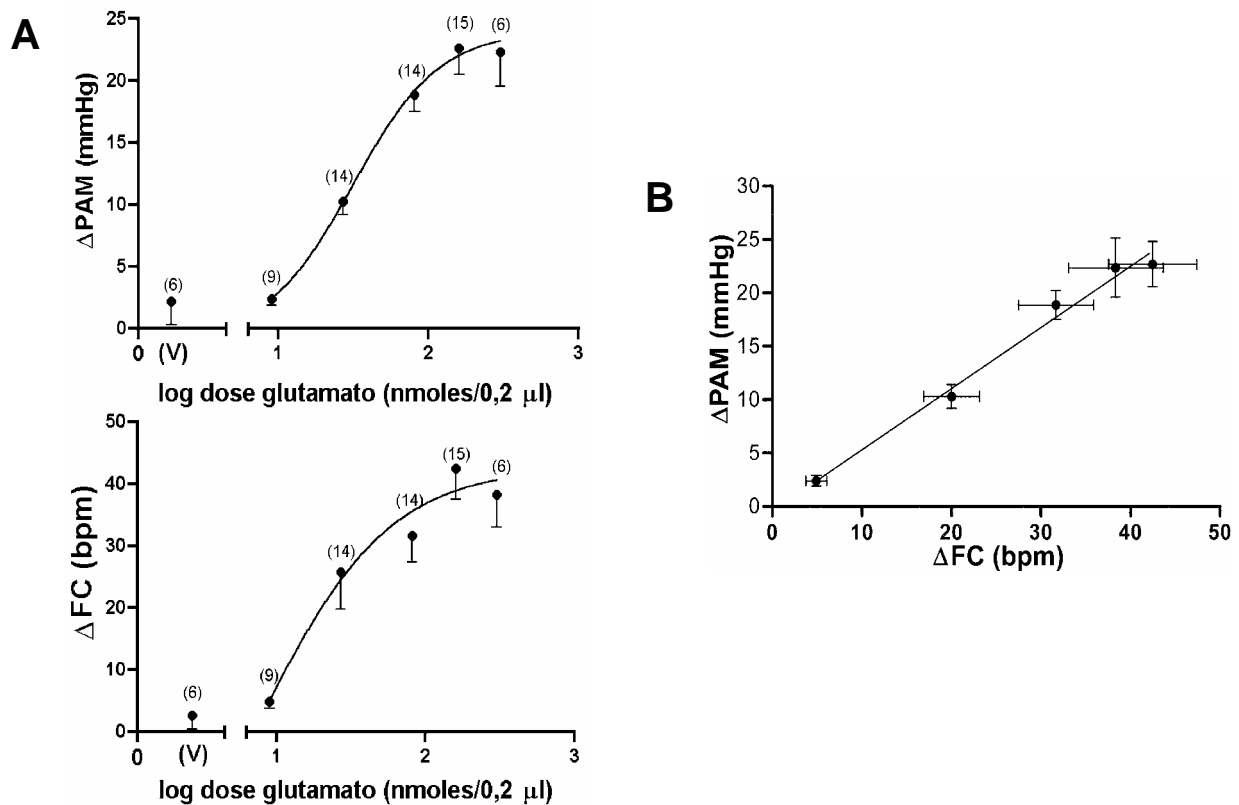


Figura 12- (A) Efeito da administração de diferentes doses de L-glu ou salina (V) no vCPFM de ratos não anestesiados sobre a pressão arterial média (ΔPAM) e frequência cardíaca (ΔFC). As doses de L-glu administradas foram: 9; 27; 81; 150; 300 nmol. Os círculos representam a variação média após a administração de L-glu e as barras representam o erro padrão das médias. (B) Curva de regressão linear mostrando a correlação entre a pressão arterial média (ΔPAM) e a frequência cardíaca (ΔFC) após injeção de doses crescentes de L-glu no vCPFM de ratos não anestesiados (n= 22). Os círculos representam as médias e as barras os EPM.

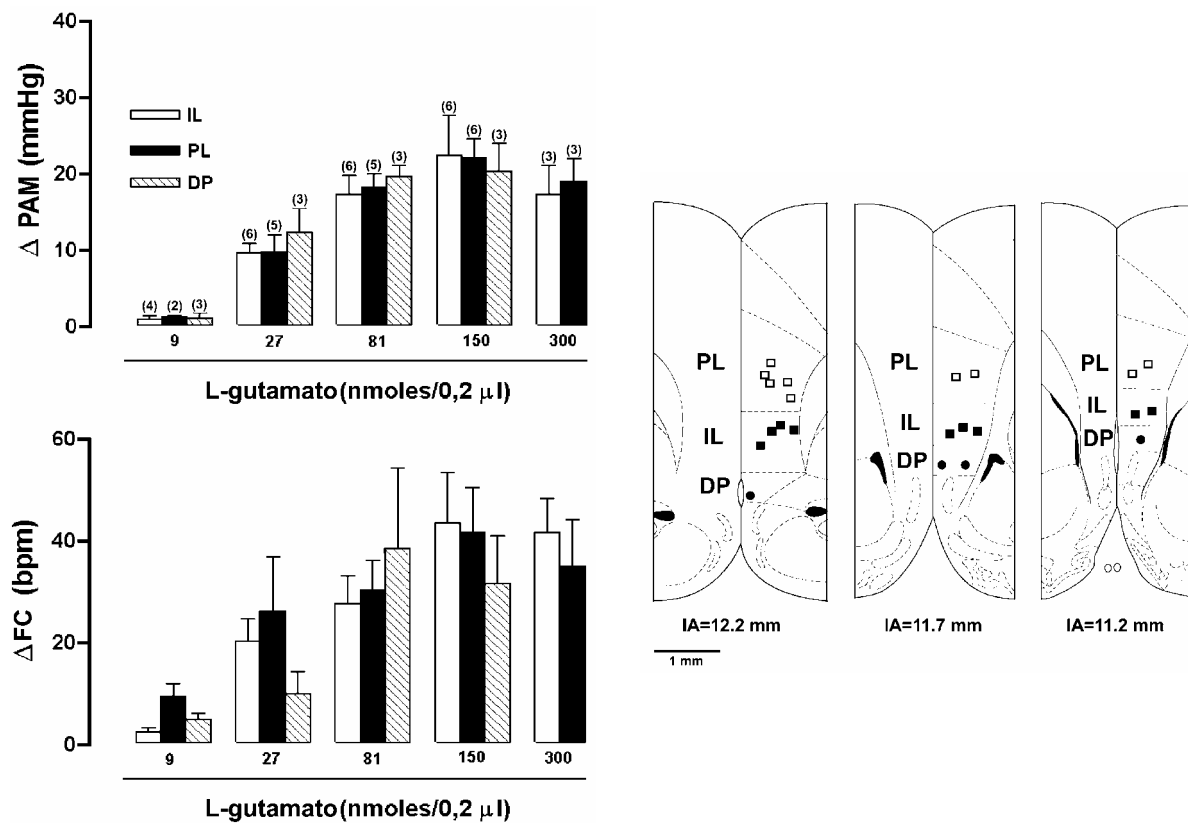


Figura 13- Esquerda: As colunas representam as variações na pressão arterial media (Δ PAM) e na frequência cardíaca (Δ FC) após a administração de diferentes doses de L-glu nas três áreas que compõem o vCPFM: córtex infralimbico (IL), córtex pré- limbico (PL) e córtex dorsal peduncular (DP) de ratos não anestesiados. As colunas representam as médias \pm EPM, One-way ANOVA (doses de 9, 27, 81 e 150) $p > 0,05$; teste t de Student (dose de 300) $p > 0,05$. **Direita:** Representação diagramática indicando o centro dos sítios de injeção de L-glu nas três áreas (quadrados brancos- PL; quadrados pretos- IL; círculos pretos- DP) do vCPFM, relativos às respostas obtidas no gráfico ao lado. Modificado do Atlas de Paxinos & Watson (1986). IA- interaural.

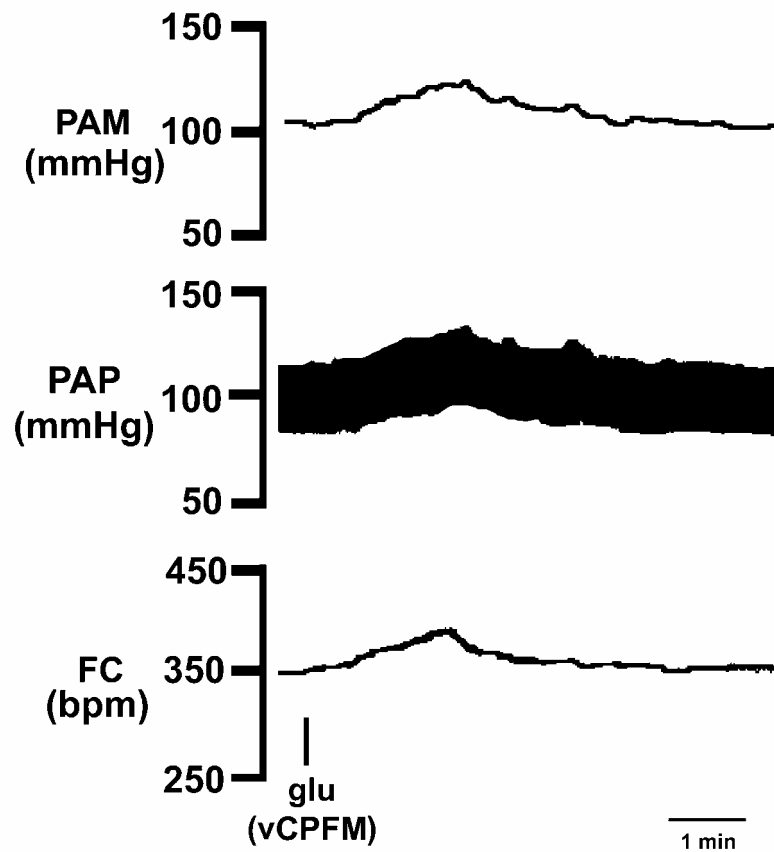


Figura 14- Traçados de pressão arterial média (PAM), pressão arterial pulsátil (PAP) e frequência cardíaca (FC) de um rato representativo do grupo, mostrando os efeitos da administração de 81 nmol/ 0,2 μ L de L-glu (glu) no vCPFM.

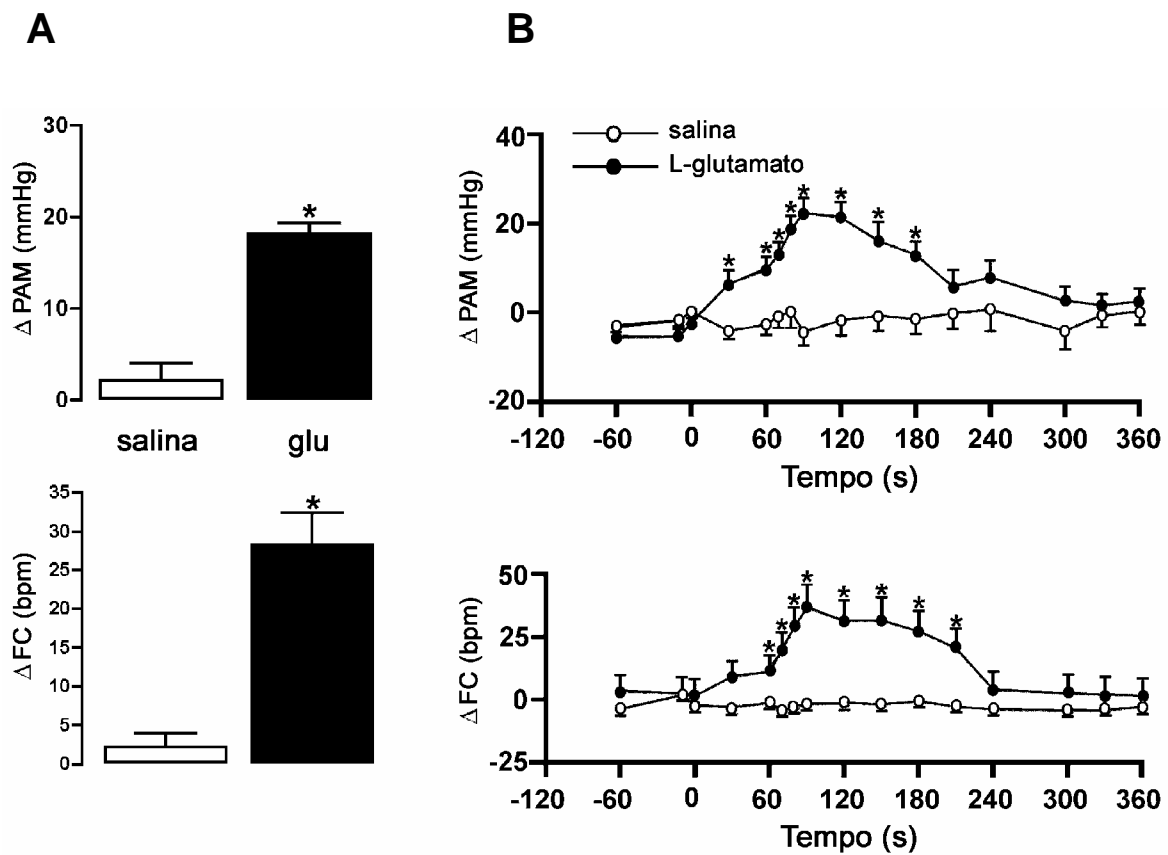


Figura 15- (A) Variações na pressão arterial (Δ PAM) e frequência cardíaca (Δ FC) após a administração de 0,2 μ L de salina (n= 9) ou 81 nmol/ 0,2 μ L de L-glu (glu, n= 14) no vCPFM de ratos não anestesiados. As colunas representam as médias \pm EPM, * p< 0,01, teste t de Student. (B) Variação da pressão arterial média (Δ PAM) e frequência cardíaca (Δ FC) ao longo do tempo após administração de salina ou L-glu no vCPFM. As administrações foram feitas no tempo 0 (zero). Os pontos representam a média \pm EPM, * p< 0,05, two-way ANOVA, pós-teste de Bonferroni.

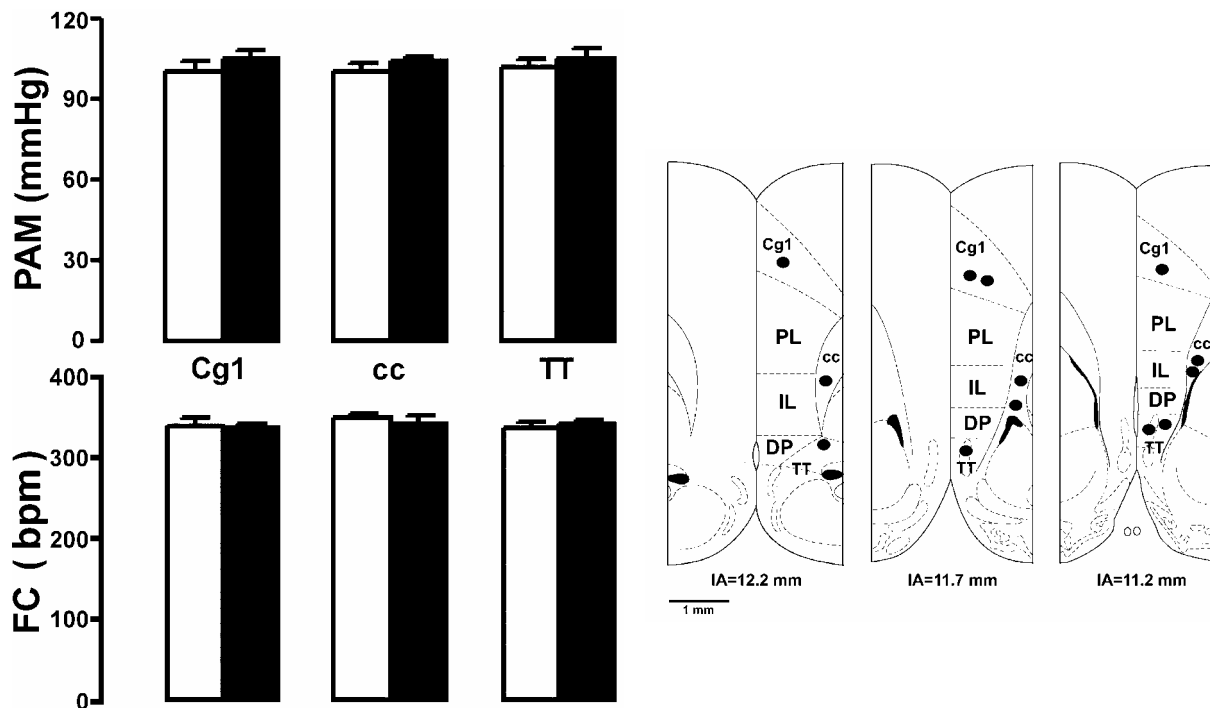


Figura 16- Esquerda: Pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) antes (colunas brancas) e após (colunas pretas) a administração de 81 nmol/0,2 μ L de L-glu no córtex do cíngulo-área 1 (Cg1), corpo caloso (cc) e tênia tecta (TT) de ratos não anestesiados. As colunas representam as médias \pm EPM. **Direita:** Representação diagramática indicando o centro dos sítios da injeção do L-glu (•) no córtex do cíngulo-área 1 (Cg1), corpo caloso (cc) e tênia tecta (TT), modificada do Atlas de Paxinos & Watson (1986). IA- interaural.

8. Efeitos do pré-tratamento sistêmico com bloqueador ganglionar pentolínio sobre as respostas cardiovasculares da microinjeção de L-glu no vCPFM de ratos não anestesiados.

O pré-tratamento i.v. com salina não afetou as respostas cardiovasculares provocadas pelo L-glu injetado no vCPFM (Δ PAM antes = $17,4 \pm 1,4$ e após salina = $19,2 \pm 2,2$ mmHg; $t = 0,5$; $p > 0,05$ e Δ FC antes = $24,2 \pm 4$ e após salina = $30,2 \pm 3,8$ bpm; $t = 0,7$; $p > 0,05$; $n = 8$) (Figura 17).

A administração i.v. de pentolínio reduziu aos valores basais de PAM (antes = 110 ± 6 mmHg e após = 67 ± 4 mmHg; $t = 4,3$; $p < 0,05$), porém nada ocorreu com a FC (antes = 341 ± 24 bpm e após = 347 ± 24 bpm; $t = 0,3$; $p > 0,05$; $n = 5$).

O pré-tratamento com pentolínio ($n = 5$) causou uma significativa redução nas respostas cardiovasculares causadas pelo L-glu (PAM: $F = 59,9$; $p < 0,01$ e FC: $F = 95,3$; $p < 0,01$; Figura 17), foi também observado significativo efeito do tempo (PAM: $F = 11,1$; $p < 0,01$ e FC: $F = 2,5$; $p < 0,01$), havendo interação entre tratamento e tempo (PAM: $F = 2,6$; $p < 0,01$ e FC: $F = 3,1$; $p < 0,01$). A redução promovida pelo pentolínio sobre o efeito máximo da resposta pressora (Δ PAM antes = $17,4 \pm 1,8$ mmHg e após = $2,4 \pm 3,2$ mmHg; $t = 5$; $p < 0,01$) e resposta máxima taquicárdica (Δ FC antes = $24,2 \pm 3,7$ bpm e após = $0,6 \pm 1,4$ bpm; $t = 7$; $p < 0,01$; $n = 5$) produzidas pelo L-glu administrado no vCPFM estão representadas na Figura 17.

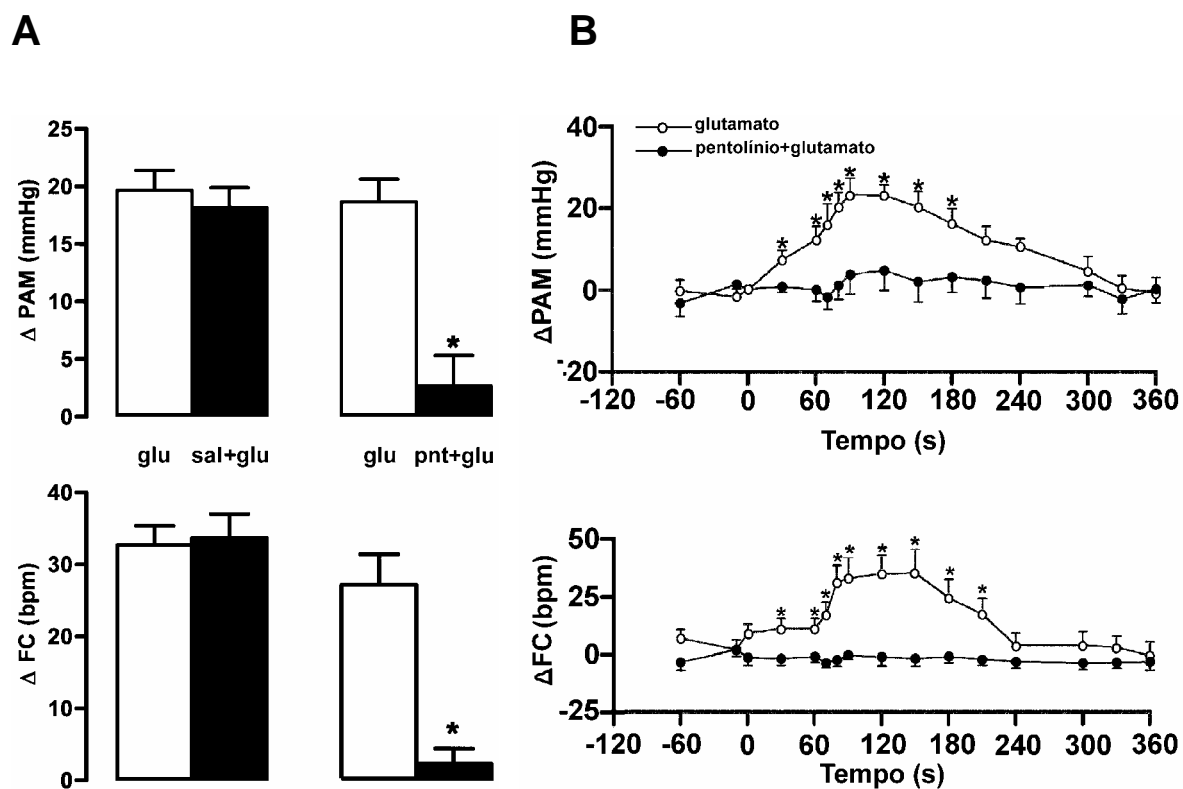


Figura 17- (A) Variação máxima da pressão arterial média (Δ PAM) e frequência cardíaca (Δ FC) após a administração de 81 nmol/ 0,2 μ L de L-glu no vCPFM de ratos não anestesiados antes (colunas brancas) e após (colunas pretas) administração i.v. de salina 0,9 % ou 10 mg/ Kg de pentolinio (pnt, n= 5). As colunas representam as médias \pm EPM, * p< 0,01, teste t de Student pareado. **(B)** Variação da pressão arterial média (Δ PAM) e frequência cardíaca (Δ FC) ao longo do tempo causada pela administração de L-glu no vCPFM antes e após administração i.v. de pentolinio (n= 5). As administrações foram feitas no tempo 0 (zero). Os pontos representam a média \pm EPM, * p< 0,05, two-way ANOVA, pós-teste de Boferroni.

9. Efeitos do pré-tratamento sistêmico com antagonista seletivo beta1-adrenoceptor atenolol sobre as respostas cardiovasculares da microinjeção de L-glu no vCPFM de ratos não anestesiados.

A administração i.v. de atenolol não alterou os valores basais de PAM (antes= 105 ± 4 mmHg e após= 107 ± 4 mmHg; $t = 0,8$; $p > 0,05$) e frequência cardíaca (antes= 351 ± 22 bpm e após= 355 ± 19 bpm; $t = 0,7$; $p > 0,05$; $n = 5$).

Similar ao pentolínio, o atenolol ($n = 5$) alterou de forma significativa as respostas cardiovasculares causadas pela administração de L-glu no vCPFM (PAM: $F = 142,6$; $p < 0,01$ e FC: $F = 123,5$; $p < 0,01$; Figura 18), foi também observado significativo efeito do tempo (PAM: $F = 63,2$; $p < 0,01$ e FC: $F = 48,7$; $p < 0,01$) havendo interação entre tratamento e tempo (PAM: $F = 5,2$; $p < 0,01$ e FC: $F = 2,3$; $p < 0,01$) (Figura 18). O pré-tratamento com atenolol reduziu significativamente a resposta pressora máxima (Δ PAM antes= $18,1 \pm 1,8$ mmHg e após o atenolol= $1,1 \pm 2,4$ mmHg; $t = 4,1$; $p < 0,01$) e a taquicardia máxima (Δ FC antes= $34,2 \pm 3,4$ bpm e após o atenolol= $0,6 \pm 2,5$ bpm; $t = 9,3$; $p < 0,01$) causados pela administração de L-glu no vCPFM (Figura 18).

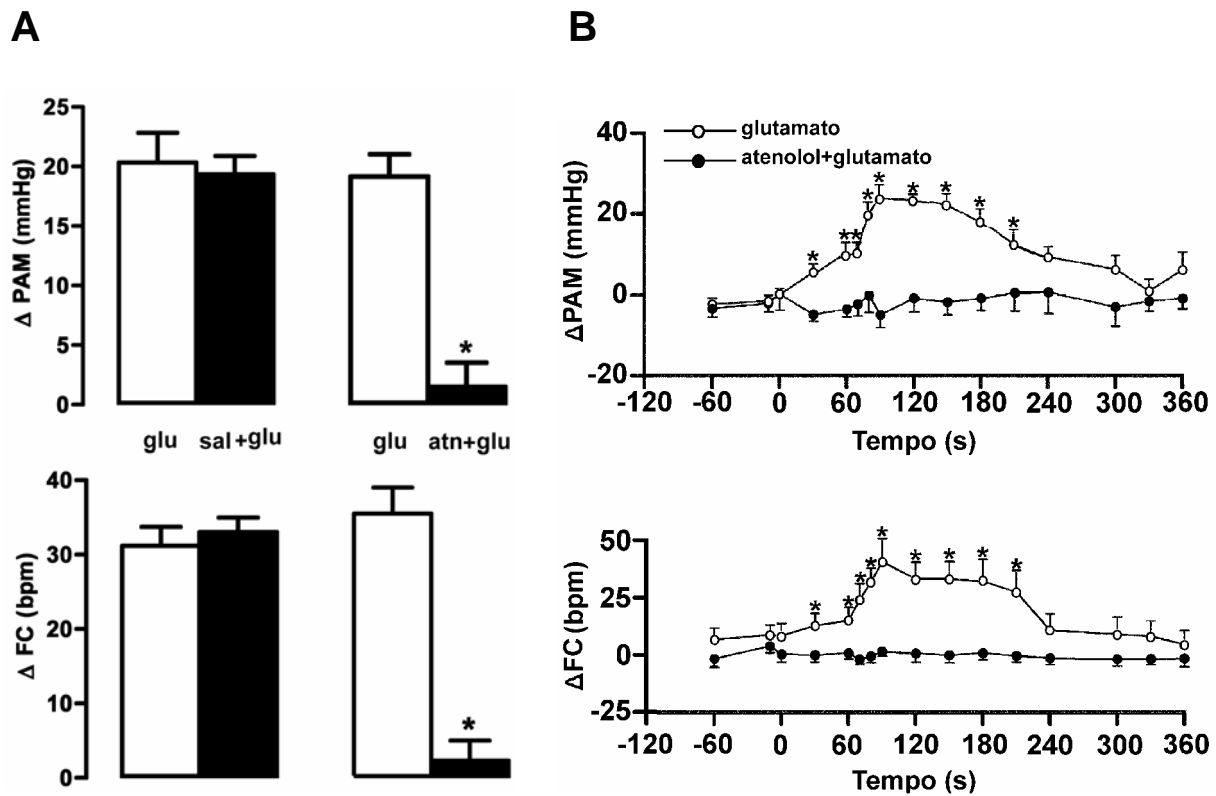


Figura 18- **(A)** Variação máxima da pressão arterial média (Δ PAM) e frequência cardíaca (Δ FC) após a administração de 81 nmol/ 0,2 μ L de L-glu no vCPFM de ratos não anestesiados antes (colunas brancas) e após (colunas pretas) administração i.v. de salina 0,9 % ou de 1,5mg/ Kg de atenolol (atn, n= 5). As colunas representam as médias \pm EPM, * p< 0,01, teste t de Student pareado. **(B)** Variação da pressão arterial média (Δ PAM) e frequência cardíaca (Δ FC) ao longo do tempo após administração de L-glu no vCPFM antes e após administração i.v. de atenolol (n= 5). As administrações foram feitas no tempo 0 (zero). Os pontos representam a média \pm EPM, * p< 0,05, two-way ANOVA, pós-teste de Bonferroni.

10. Efeitos do pré-tratamento sistêmico com antagonista muscarínico metilbrometo de homatropina sobre as respostas cardiovasculares da microinjeção de L-glu no vCPFM de ratos não anestesiados.

A administração i.v. de metilbrometo de homatropina (MBH) não alterou os valores basais de PAM (antes= 105 ± 4 mmHg e após MBH = 107 ± 4 mmHg; $t=0,5$; $p < 0,05$; $n=7$). Porém, os valores de FC foram aumentados (antes= 344 ± 19 bpm e após metilbrometo de homatropina= 405 ± 18 bpm; $t=2,5$; $p < 0,05$; $n=7$).

O pré-tratamento com MBH ($n=7$) alterou as respostas cardiovasculares causadas pela administração de L-glu no vCPFM (PAM: $F=7,6$; $p < 0,05$ e FC: $F=8,6$; $p < 0,05$; Figura 19 e 20), foi também observado efeito do tempo (PAM: $F=11,4$; $p < 0,01$ e FC: $F=14,1$; $p < 0,01$) havendo interação entre tratamento e tempo (PAM: $F=2,2$; $p < 0,05$ e FC: $F=2,1$; $p < 0,05$) (Figura 19). O pré-tratamento com MBH reduziu a latência para a resposta máxima da PAM e FC (PAM: 25 ± 9 s e FC: 19 ± 7 s, após o MBH) sem afetar a duração da resposta (PAM: 225 ± 20 s e FC: 219 ± 16 s, Figura 19 e 20).

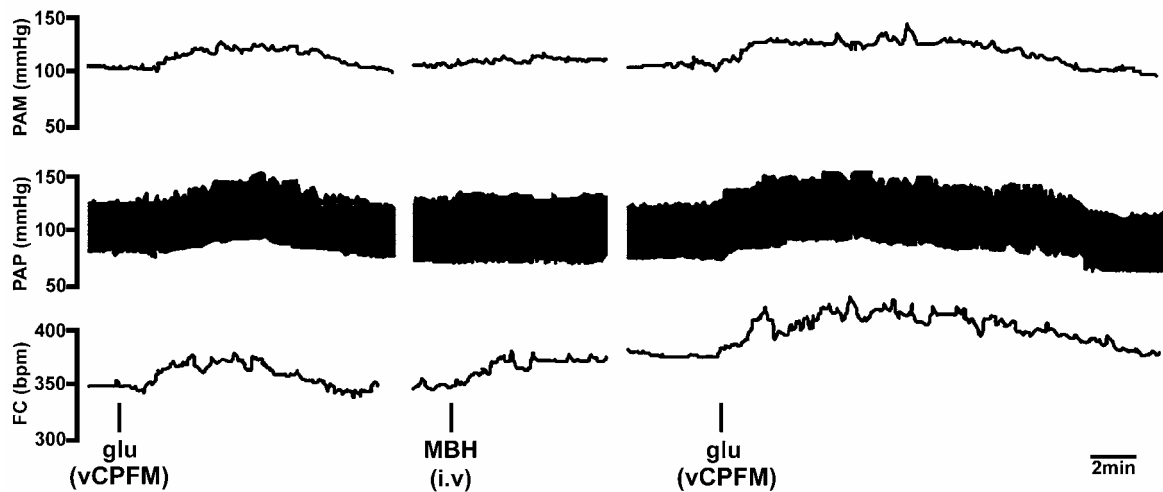


Figura 19- Traçados de pressão arterial média (PAM), pressão arterial pulsátil (PAP) e frequência cardíaca (FC) de um rato representativo do grupo, mostrando o efeito do pré-tratamento com 1,5 mg/ Kg de metilbrometo de homatropina (MBH) sobre as respostas cardiovasculares da administração de 81 nmol/ 0,2 μ L de L-glu (glu) no vCPFM.

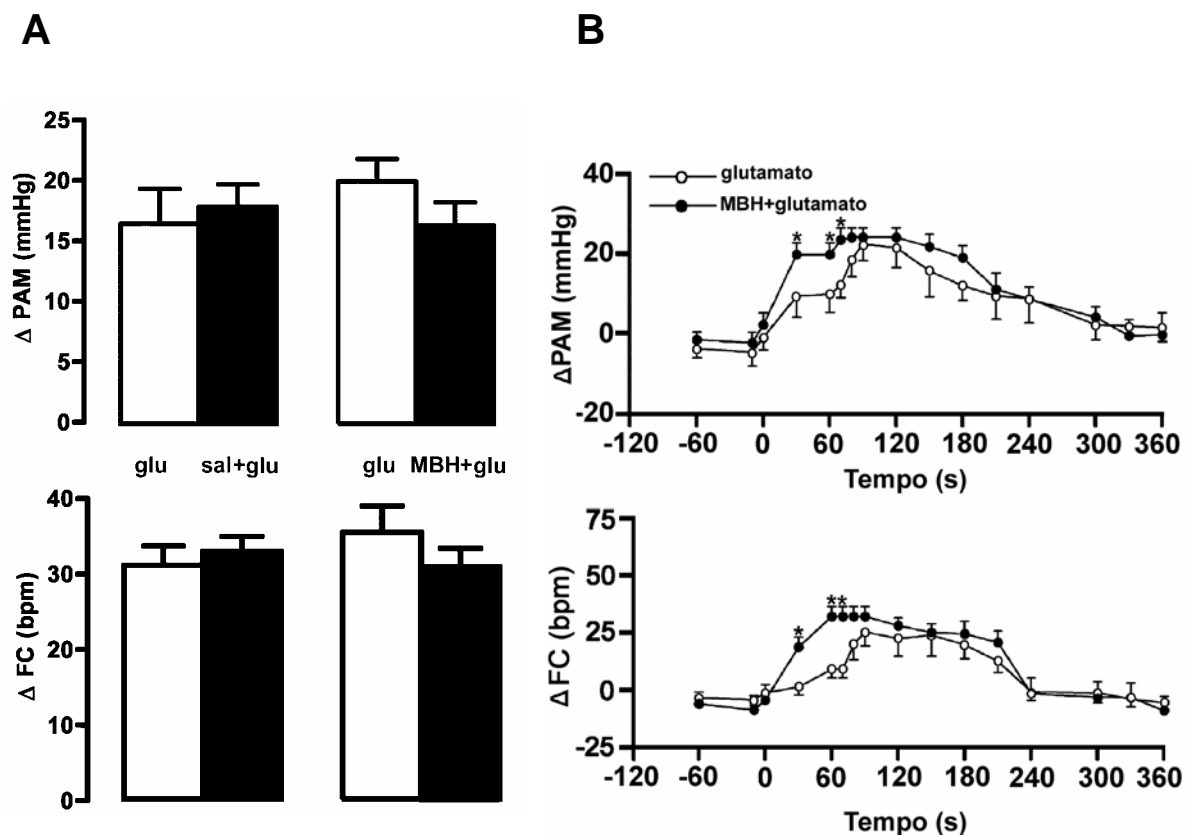


Figura 20- **(A)** Variação máxima da pressão arterial média (Δ PAM) e frequência cardíaca (Δ FC) após a administração de 81 nmol/ 0,2 μ L de L-glu (glu) no vCPFM de ratos não anestesiados antes (colunas brancas) e após (colunas pretas) administração i.v. de salina 0,9 % ou 1 mg/ Kg de metilbrometo de homatropina (MBH, n= 7). As colunas representam as médias \pm EPM. **(B)** Variação da pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (Δ FC) ao longo do tempo após administração de L-glu no vCPFM antes e após administração i.v. de i.v. de MBH (n= 7). As administrações foram feitas no tempo 0 (zero). Os pontos representam a média \pm EPM, * p< 0,05, two-way ANOVA, pós-teste de Bonferroni.

11. Efeito da pré-administração de DL-AP7 no vCPFM sobre as respostas cardiovasculares da microinjeção de L-glu no vCPFM de ratos não anestesiados.

O pré-tratamento do vCPFM com salina não afetou as respostas cardiovasculares desencadeadas pelo L-glu (Δ PAM antes= $18,2 \pm 1,9$ e após salina= $20 \pm 1,3$ mmHg; $t= 0,6$; $p > 0,05$ e Δ FC antes= $29,2 \pm 4$ e após salina= $33,6 \pm 3,3$ bpm; $t= 0,7$; $p > 0,05$; $n= 6$), Figura 21.

O pré-tratamento do vCPFM com 4 nmol/ 0,2 μ L de AP7 ($n= 6$) não produziu alterações nos valores basais de PA (PAM antes= 93 ± 3 e após= 97 ± 3 mmHg; $t= 0,5$; $p > 0,05$) e FC (antes= 348 ± 13 e após= 361 ± 13 bpm; $t= 0,7$; $p > 0,05$), porém reduziu significativamente a resposta pressora (Δ PAM antes= $18,5 \pm 1,8$ e após= $1,3 \pm 2,1$ mmHg; $t= 6,8$; $p < 0,05$) e taquicárdica (Δ FC antes= $32,5 \pm 3,4$ e após= $4,6 \pm 3,6$ mmHg; $t= 5,3$; $p < 0,05$) à administração de 81nmol/ 0,2 μ L de L-glu no vCPFM ($n= 6$, Figura 21 e 22).

O AP7 alterou os efeitos do L-glu (Figura 21 e 22), havendo efeito do tratamento (PAM: $F= 61,3$; $p < 0,05$ e FC: $F= 93$; $p < 0,05$), efeito do tempo (PAM: $F= 2,3$; $p < 0,05$ e FC: $F= 3,2$; $p < 0,05$), com interação entre esses fatores (PAM: $F= 2,3$; $p < 0,05$ e FC: $F= 3,1$; $p < 0,05$) comparado aos efeitos do L-glu antes do tratamento com AP7.

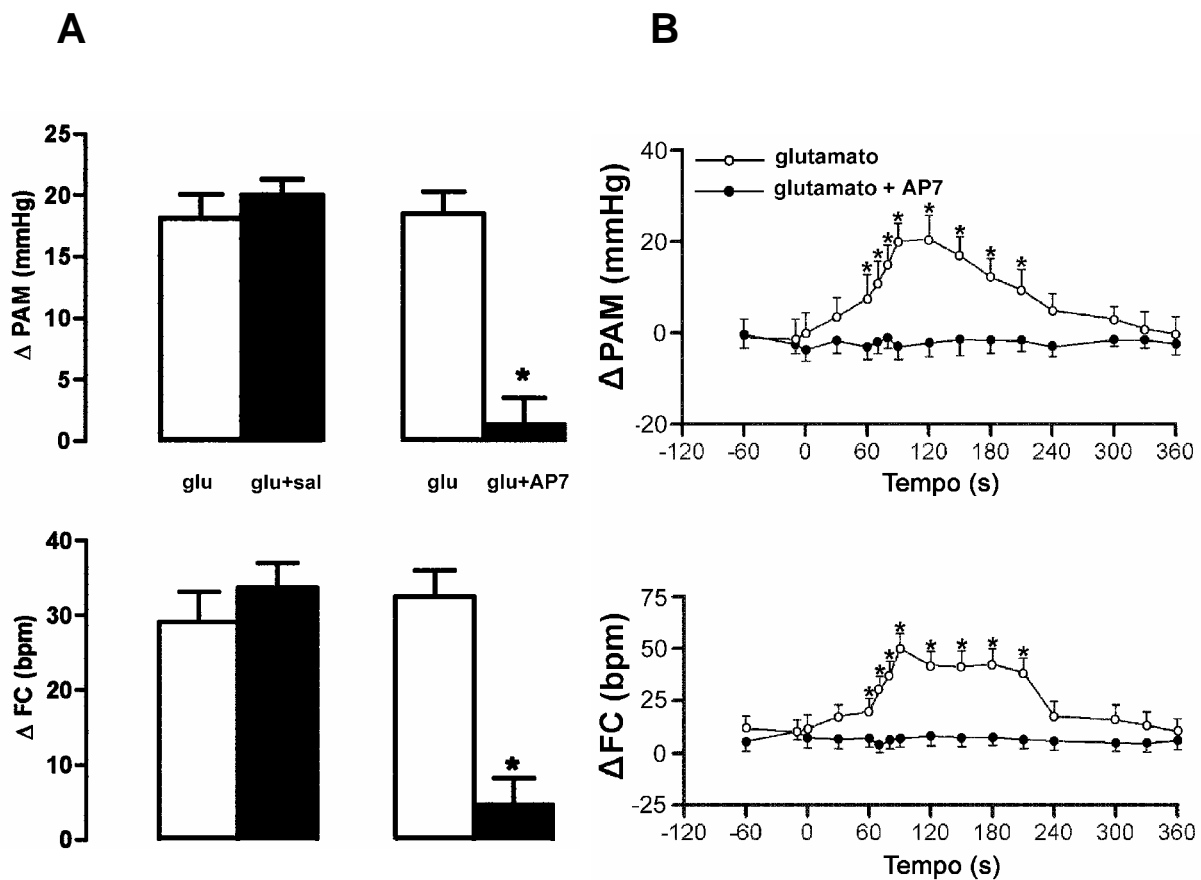


Figura 21- (A) Variação máxima da pressão arterial média (ΔPAM) e frequência cardíaca (ΔFC) após a administração de 81 nmol/ 0,2 μL de L-glu (glu) de ratos não anestesiados antes (colunas brancas) e após (colunas pretas) o pré-tratamento com 0,2 μL de salina 0,9 % ou 4 nmol de AP7 no vCPFM de ratos não anestesiados (n= 6). As colunas representam as médias \pm EPM, * $p < 0,01$, teste t de Student pareado. (B) Variação da pressão arterial média (ΔPAM) e frequência cardíaca (ΔFC) ao longo do tempo após administração de L-glu no vCPFM antes e após o pré-tratamento com AP7. As administrações foram feitas no tempo 0 (zero). Os pontos representam a média \pm EPM, * $p < 0,05$, two-way ANOVA, pós-teste de Bonferroni.

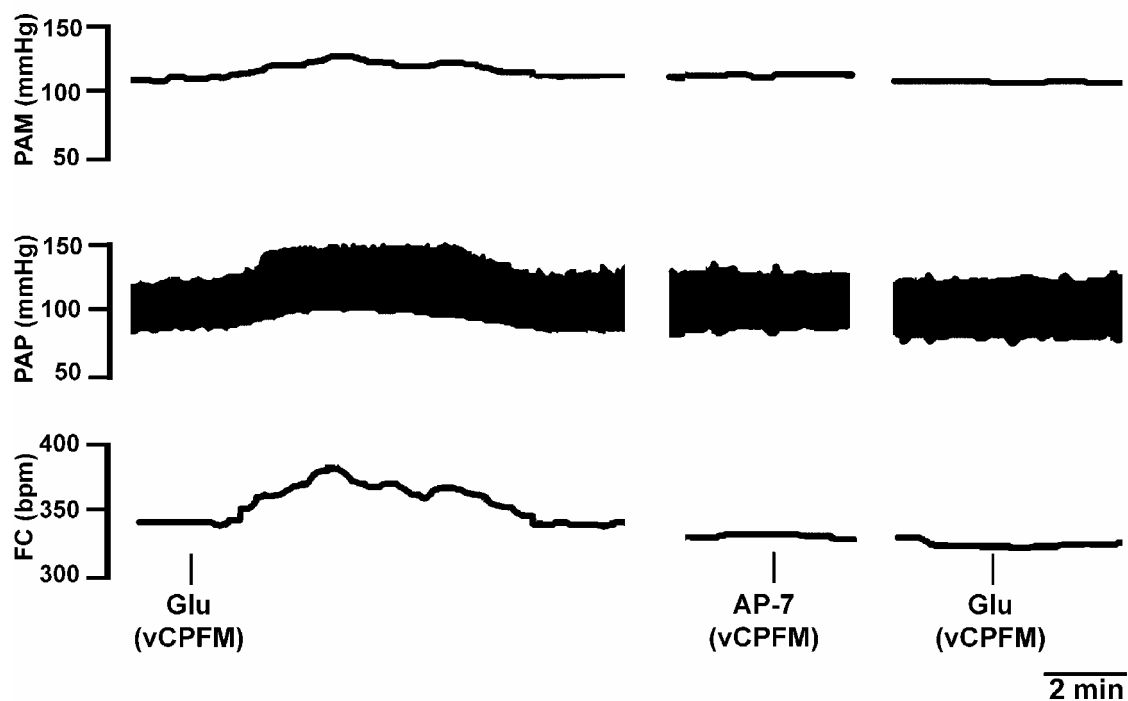


Figura 22- Traçados de pressão arterial média (PAM), pressão arterial pulsátil (PAP) e frequência cardíaca (FC) de um rato representativo do grupo, mostrando o efeito do pré-tratamento com 4 nmol/ 0,2 μ L de AP7 sobre as respostas cardiovasculares da administração de 81 nmol/ 0,2 μ L de L-glu (Glu) no vCPFM.

12. Efeito da pré-administração de NBQX no vCPFM sobre as respostas cardiovasculares da microinjeção de L-glu no vCPFM de ratos não anestesiados.

O pré-tratamento do vCPFM com 4 nmol/ 0,2 μ L de NBQX (n= 6) não produziu alterações nos valores basais de PA (PAM antes= 98 \pm 3 e após= 101 \pm 3 mmHg; t= 0,65; p> 0,05) e FC (antes= 312 \pm 20 e após= 341 \pm 16 bpm; t= 1,1; p> 0,05), além de não alterar significativamente a resposta pressora (Δ PAM antes= 17,5 \pm 1,7 e após= 20,2 \pm 1 mmHg; t= 0,9; p> 0,05) e taquicárdica (Δ FC antes= 31,6 \pm 4,1 e após= 25,9 \pm 5,4 bpm; t= 0,9; p> 0,05) à administração de 81nmol/ 0,2 μ L de L-glu no vCPFM (Figura 23).

A administração previa de 4 nmol/ 0,2 μ L de NBQX (n= 6) não produziu qualquer efeito sobre a resposta pressora (Δ PAM antes= 17,3 \pm 1,7 e após= 18,8 \pm 1,3 mmHg; t= 1; p> 0,05) e taquicárdica (Δ FC antes= 28,3 \pm 3,8 e após= 32,6 \pm 4,8 mmHg; t= 0,6; p> 0,05) à administração de L-glu no vCPFM (Figura 23), não havendo efeito do tratamento (PAM: F= 2,1; p> 0,05 e FC: F= 3,5; p> 0,05), sem interação entre tratamento e tempo (PAM: F= 0,4; p> 0,05, e FC: F= 0,3; p> 0,05) comparado aos efeitos do L-glu antes do tratamento com NBQX.

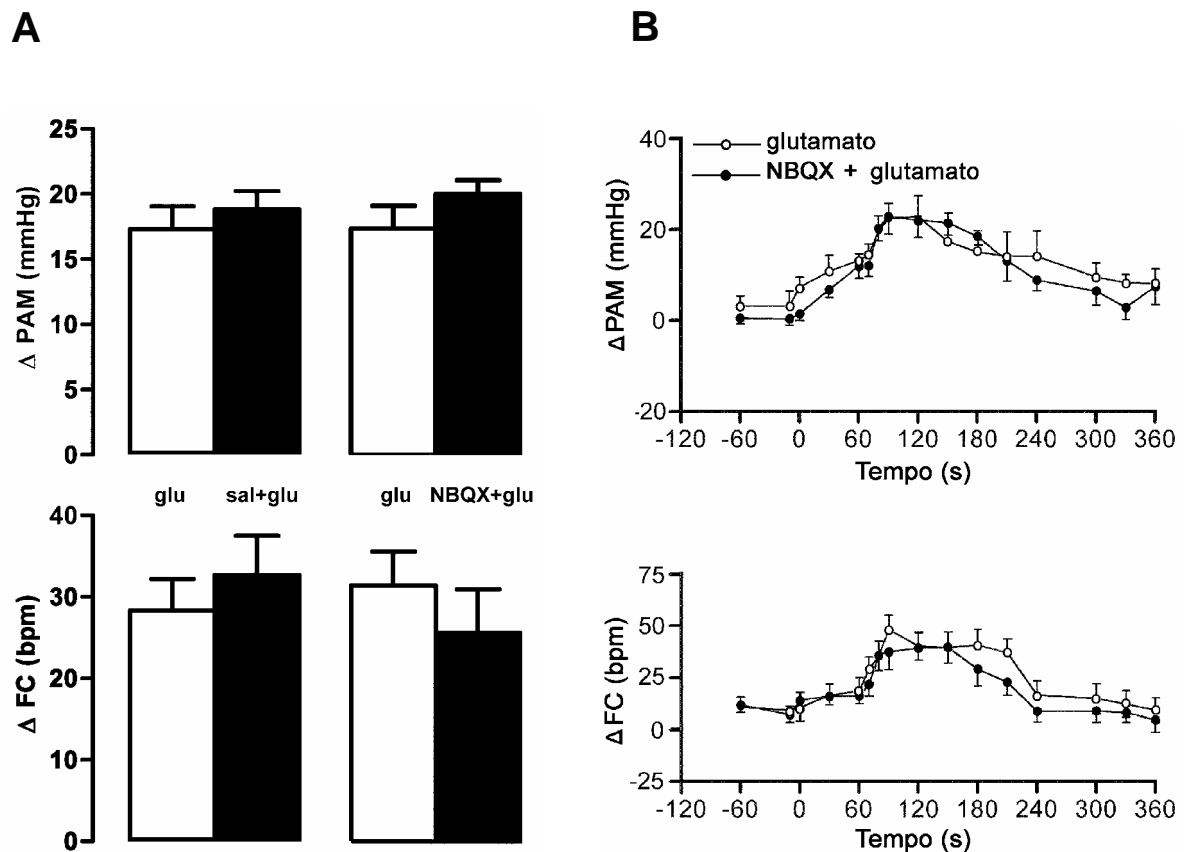


Figura 23- (A) Variação máxima da pressão arterial média (Δ PAM) e frequência cardíaca (Δ FC) após a administração de 81 nmol/ 0,2 μ l de L-glu (glu) antes (colunas brancas) e após (colunas pretas) o pré-tratamento com 0,2 μ L de salina 0,9 % ou 4 nmol de NBQX no vCPFM de ratos não anestesiados (n= 6). As colunas representam as médias \pm EPM. (B) Variação da pressão arterial média (Δ PAM) e frequência cardíaca (Δ FC) ao longo do tempo após administração de L-glu no vCPFM antes e após o pré-tratamento com NBQX. As administrações foram feitas no tempo 0 (zero). Os pontos representam a média \pm EPM.

13. Efeito da pré-administração de L-NAME no vCPFM sobre as respostas cardiovasculares da microinjeção de L-glu no vCPFM de ratos não anestesiados.

O pré-tratamento do vCPFM com 80 nmol/ 0,2 μ L de L-NAME (n= 6) não produziu alterações na PA (antes= 97 \pm 3 mmHg e após= 99 \pm 3 mmHg; t= 0,36; p> 0,05) e FC (antes= 381 \pm 19 bpm e após= 377 \pm 18 bpm; t= 0,13; p> 0,05), porém reduziu significativamente a resposta pressora (Δ PAM antes= 20,7 \pm 2,3 mmHg e após= 0,2 \pm 2,2 mmHg; t= 8,6; p< 0,05) e taquicárdica (Δ FC antes= 30,5 \pm 6,2 bpm e após= 1,5 \pm 0,7 bpm; t= 4,8; p< 0,05) à administração de 81nmol/ 0,2 μ L de L-glu no vCPFM (Figura 24).

Os efeitos do L-glu foram alterados pelo tratamento com L-NAME (n= 6) (Figura 24), havendo efeito do tratamento (PAM: F= 78,3; p< 0,05 e FC: F= 90,8; p< 0,05), efeito do tempo (PAM: F= 3,5; p< 0,05 e FC: F= 2,8; p< 0,05), com interação entre esses fatores (PAM: F= 3,2; p< 0,05, e FC: F= 2,8; p< 0,05), comparado aos efeitos do L-glu antes do tratamento com L-NAME.

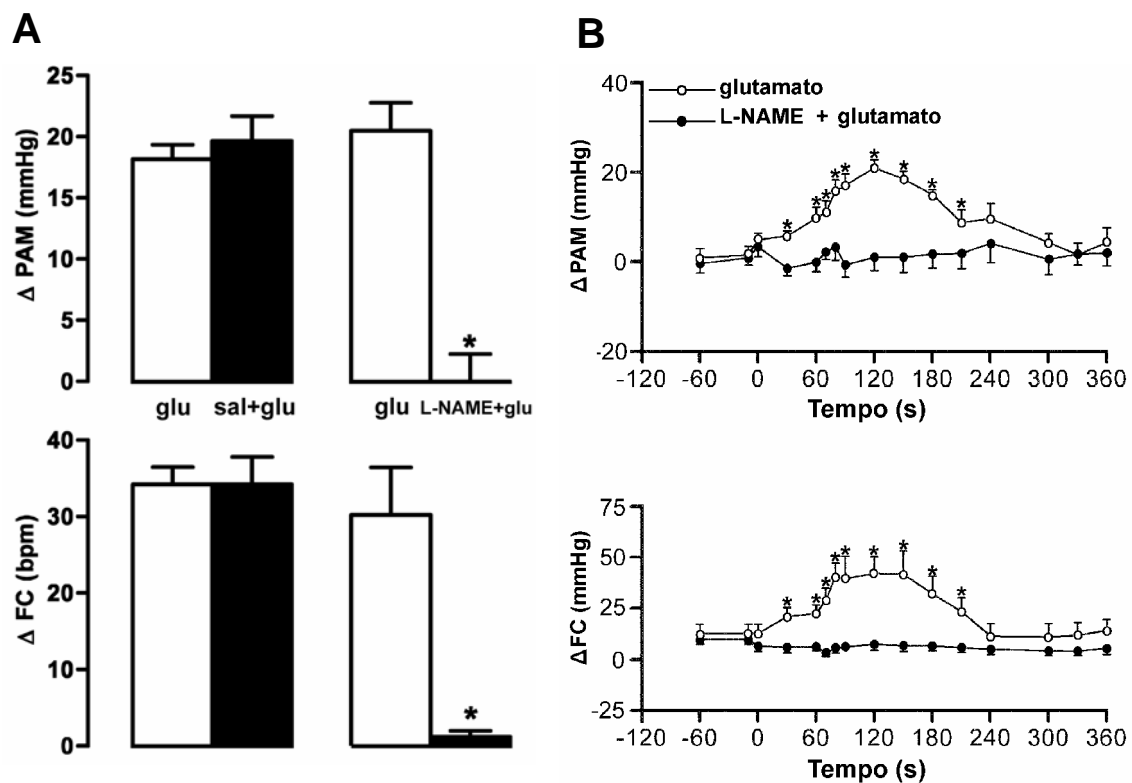


Figura 24- (A) Variação máxima da pressão arterial média (Δ PAM) e frequência cardíaca (Δ FC) após a administração de 81 nmol/ 0,2 μ L de L-glu (glu) antes (colunas brancas) e após (colunas pretas) o pré-tratamento com 0,2 μ l de salina 0,9 % ou 80 nmol de L-NAME no vCPFM de ratos não anestesiados (n= 6). As colunas representam as médias \pm EPM, * $p < 0,05$, teste t de Student pareado. **(B)** Variação da pressão arterial média (Δ PAM) e frequência cardíaca (Δ FC) ao longo do tempo após administração de L-glu no vCPFM antes e após o pré-tratamento com L-NAME. As administrações foram feitas no tempo 0 (zero). Os pontos representam a média \pm EPM, * $p < 0,05$, two-way ANOVA, pós-teste de Boferroni.

14. Efeito da pré-administração de N-Propyl no vCPFM sobre as respostas cardiovasculares da microinjeção de L-glu no vCPFM de ratos não anestesiados.

O pré-tratamento do vCPFM com 0,08 nmol/ 0,2 μ L de N-Propyl (n= 6) não produziu alterações na PA (antes= 98 \pm 2 mmHg e após= 97 \pm 2 mmHg; t= 0,81; p> 0,05) e FC (antes= 364 \pm 13 bpm e após= 367 \pm 14 bpm; t= 0,72; p> 0,05), porém reduziu significativamente a resposta pressora (Δ PAM antes= 22,5 \pm 1,1 mmHg e após= 1,2 \pm 1,8 mmHg; t= 12,8; p< 0,05) e taquicárdica (Δ FC antes= 33,8 \pm 4,3 bpm e após= 5 \pm 1,2 bpm; t= 5,5; p< 0,05) à administração de 81nmol/ 0,2 μ L de L-glu no vCPFM (Figura 25).

Os efeitos do L-glu foram alterados pelo tratamento com N-Propyl (n= 6) (Figura 25), havendo efeito do tratamento (PAM: F= 24,9; p< 0,05 e FC: F= 17,5; p< 0,05), efeito do tempo (PAM: F= 2,7; p< 0,05 e FC: F= 7,7; p< 0,05), com interação entre esses fatores (PAM: F= 2,9; p< 0,05 e HR: 7,5; p< 0,05) comparado aos efeitos do L-glu antes do tratamento com N-Propyl.

A Figura 26 mostra uma representação diagramática do vCPFM (PAXINOS & WATSON, 1986) indicando o centro dos sítios de injeção de salina, AP7, NBQX, L-NAME e N-Propyl.

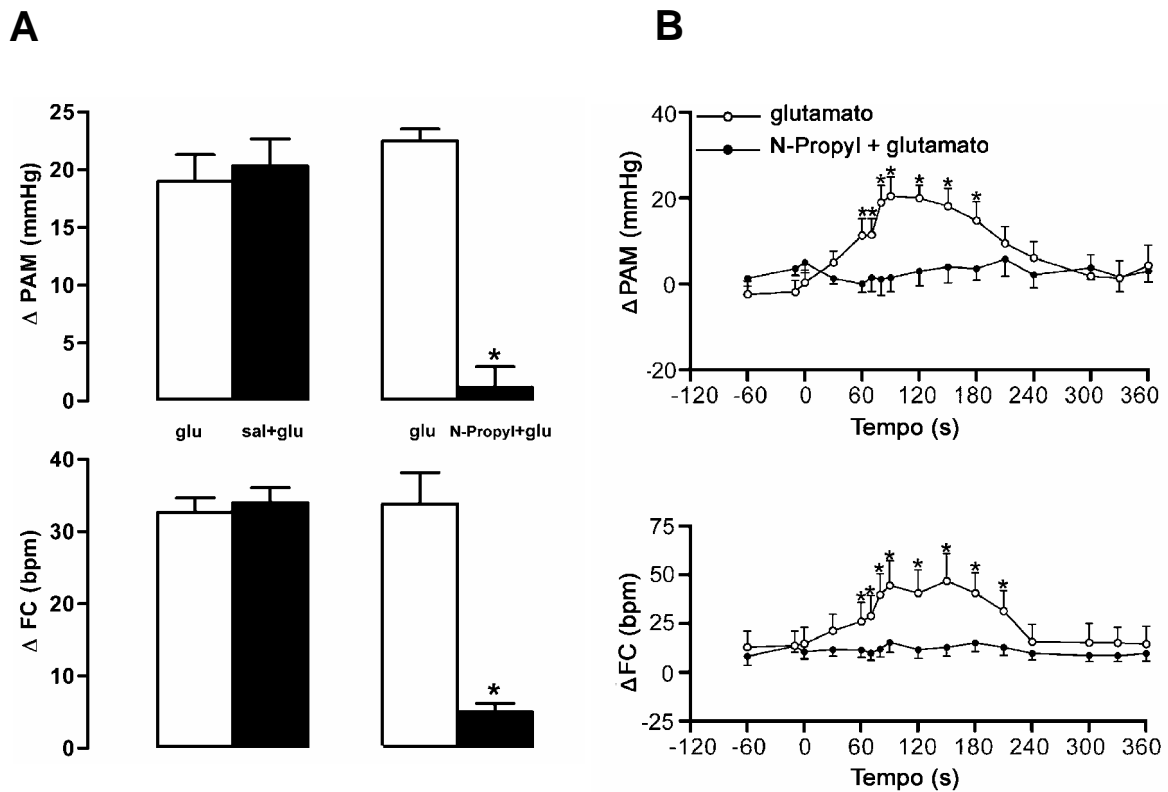


Figura 25- (A) Variação máxima da pressão arterial média (Δ PAM) e freqüência cardíaca (Δ FC) após a administração de 81 nmol/ 0,2 μ L de L-glu (glu) antes (colunas brancas) e após (colunas pretas) o pré-tratamento com 0,2 μ L de salina 0,9 % ou 0,08 nmol de N-Propyl no vCPFM de ratos não anestesiados (n= 6). As colunas representam as médias \pm EPM, * $p < 0,05$, teste t de Student pareado. (B) Variação da pressão arterial média (Δ PAM) e freqüência cardíaca (Δ FC) ao longo do tempo após administração de L-glu no vCPFM antes e após o pré-tratamento com N-Propyl. As administrações foram feitas no tempo 0 (zero). Os pontos representam a média \pm EPM, * $p < 0,05$, two-way ANOVA, pós-teste de Boferroni.

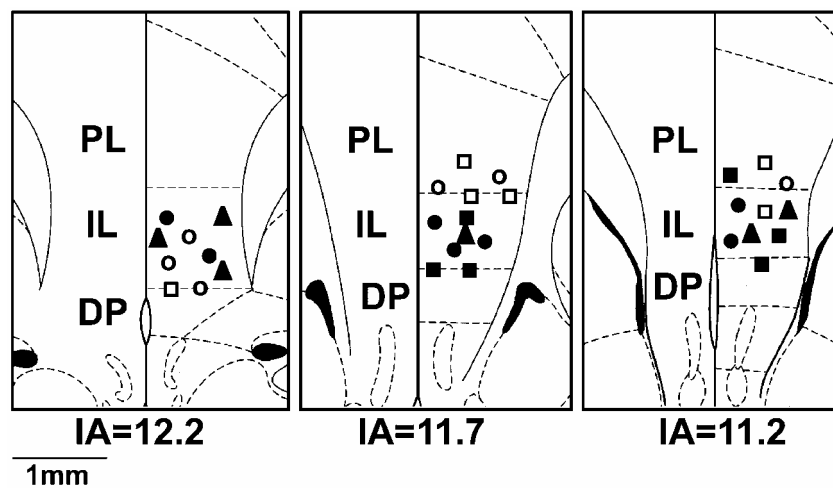


Figura 26- Representação diagramática baseada no Atlas de Paxinos & Watson (1986), indicando o centro dos sítios de injeção de salina (□), AP7 (○), NBQX (■), L-NAME (●) e N-Propyl (▲). PL- córtex pré-lobar; IL- córtex infralobar; DP- córtex dorsal peduncular. IA-interaural.

15. Efeitos da microinjeção NPS no vCPFM sobre a pressão arterial e frequência cardíaca de ratos não anestesiados.

A microinjeção de diferentes doses de NPS (3; 9; 27; 81;nmol) no vCPFM de ratos não anestesiados, desencadeou respostas pressoras ($r= 0,82$; $df= 20$; $p< 0,05$) e taquicardias ($r= 0,88$; $df= 20$; $p< 0,05$) de forma dose-dependente ($n= 6$, para cada uma das doses, Figura 27). Foi observada uma significativa correlação entre os valores de ΔFC e ΔPAM correspondentes aos aumentos das doses de L-glu administradas no vCPFM ($r= 0,98$; $df= 1$; $p< 0,05$), Figura 27.

A microinjeção de 27 nmol/ 0,2 μL de NPS ($n= 6$) no vCPFM de ratos normotensos ($PAM= 101 \pm 4$ mmHg) causou resposta pressora ($\Delta PAM= 18,3 \pm 1,4$ mmHg) que foi acompanhada de taquicardia ($\Delta FC= 31,7 \pm 2,5$ bpm, Figura 28 e 29) significativamente diferente da administração de 0,2 μL de salina ($\Delta PAM= 1 \pm 1,3$ mmHg; $t= 8,2$; $p< 0,05$ e $\Delta FC= 2 \pm 2,6$ bpm; $t= 19,2$; $p< 0,05$; $n= 6$) (Figura 29).

As respostas cardiovasculares causadas pela administração de NPS no vCPFM apresentaram um tempo de latência de 131 ± 12 s, e duração de 225 ± 28 s (Figura 29), havendo efeito do tratamento ($PAM: F= 77$; $p< 0,05$ e $FC: F= 67,7$; $p< 0,05$), efeito do tempo ($PAM: F= 3,1$; $p< 0,05$ e $FC: F= 3,6$; $p< 0,05$), com interação entre esses fatores ($PAM: F= 3,1$; $p< 0,05$ e $FC: F= 3,4$; $p< 0,05$) em relação à administração de salina (Figura 29).

Comparando as respostas provocadas pelas administrações de 27 nmol/ 0,2 μL de NPS ($n= 6$) e aquelas provocadas pela administração de 81 nmol/ 0,2 μL de L-glu ($n= 7$) no vCPFM (Figura 30), não se observou diferenças entre o tratamento ($PAM: F= 0,7$; $p> 0,05$ e $FC: F= 0,1$; $p> 0,05$) e não ocorreu interação

entre o tempo e tratamento (PAM: $F= 0,4$; $p> 0,05$ e FC: $F= 0,16$; $p> 0,05$). Porém, após o pré-tratamento com $4 \text{ nmol/ } 0,2 \text{ } \mu\text{L}$ de AP7 no vCPFM somente os efeitos cardiovasculares provocados pelo L-glu foram bloqueados, o quais foram significativamente diferentes daqueles provocados pelo NPS (MAP: $F= 24,9$; $p< 0,05$ e FC: $F= 20,9$; $p< 0,05$) e interação entre tempo e tratamento (PAM: $F= 2,9$; $p< 0,05$ e FC: $F= 3,3$; $p< 0,05$) após o pré-tratamento com AP7 (Figura 30).

A Figura 31 mostra uma representação diagramática do vCPFM (PAXINOS & WATSON, 1986) indicando o centro dos sítios de injeção de NPS e L-glu e uma fotomicrografia de um corte coronal do encéfalo de um rato representativo que recebeu microinjeção no vCPFM.

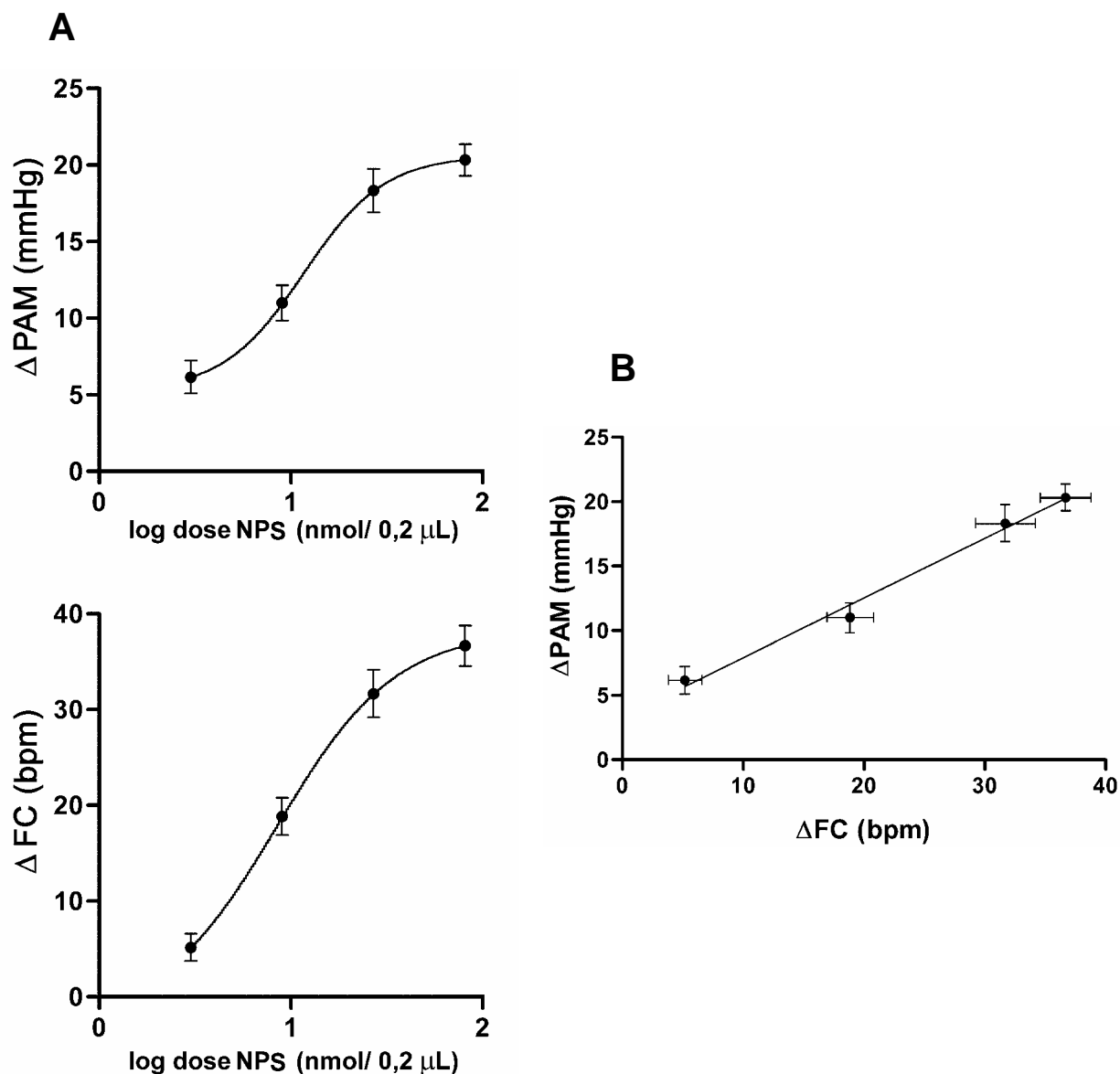


Figura 27- (A) Efeito da administração de diferentes doses de NPS no vCPFM de ratos não anestesiados sobre a pressão arterial média (ΔPAM) e frequência cardíaca (ΔFC). As doses administradas foram: 3; 9; 27; 81 nmol ($n= 6$, para todas as doses). Os círculos representam a variação média após a administração NPS e as barras representam o erro padrão das médias. **(B)** Curva de regressão linear mostrando a correlação entre a pressão arterial média (ΔPAM) e a frequência cardíaca (ΔFC) após injeção de doses crescentes de NPS no vCPFM de ratos não anestesiados ($n= 17$). Os círculos representam as médias e as barras os EPM.

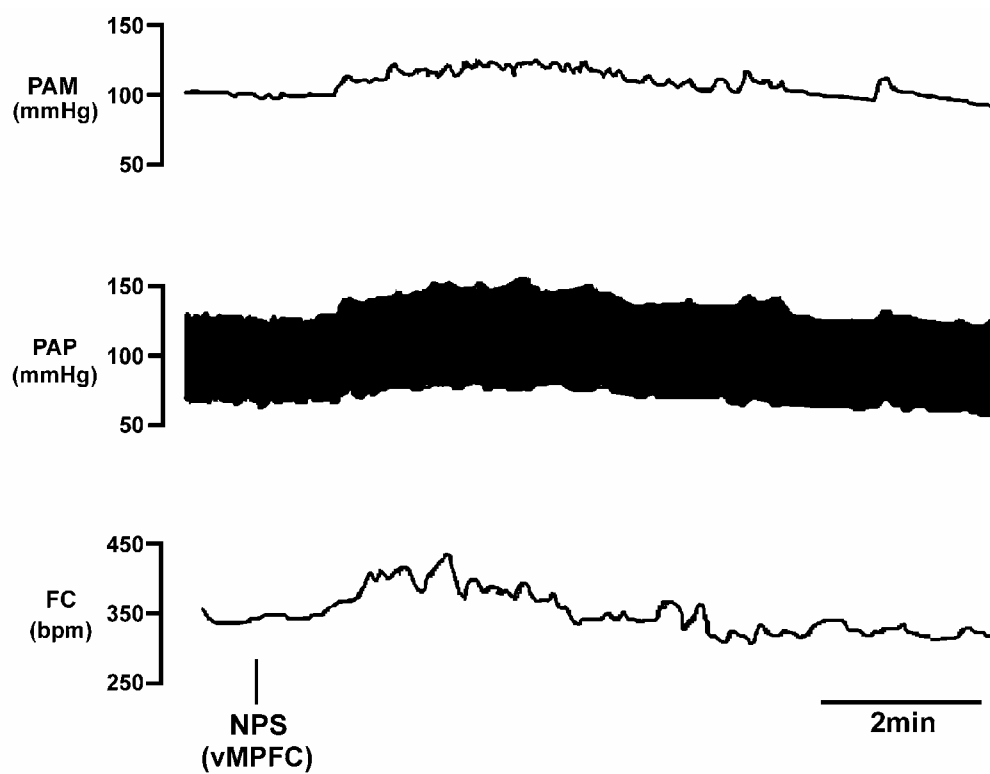


Figura 28- Traçados de pressão arterial média (PAM), pressão arterial pulsátil (PAP) e frequência cardíaca (FC) de um rato representativo do grupo, mostrando os efeitos da administração de 27 nmol/ 0,2 μ L de NPS no vCPFM.

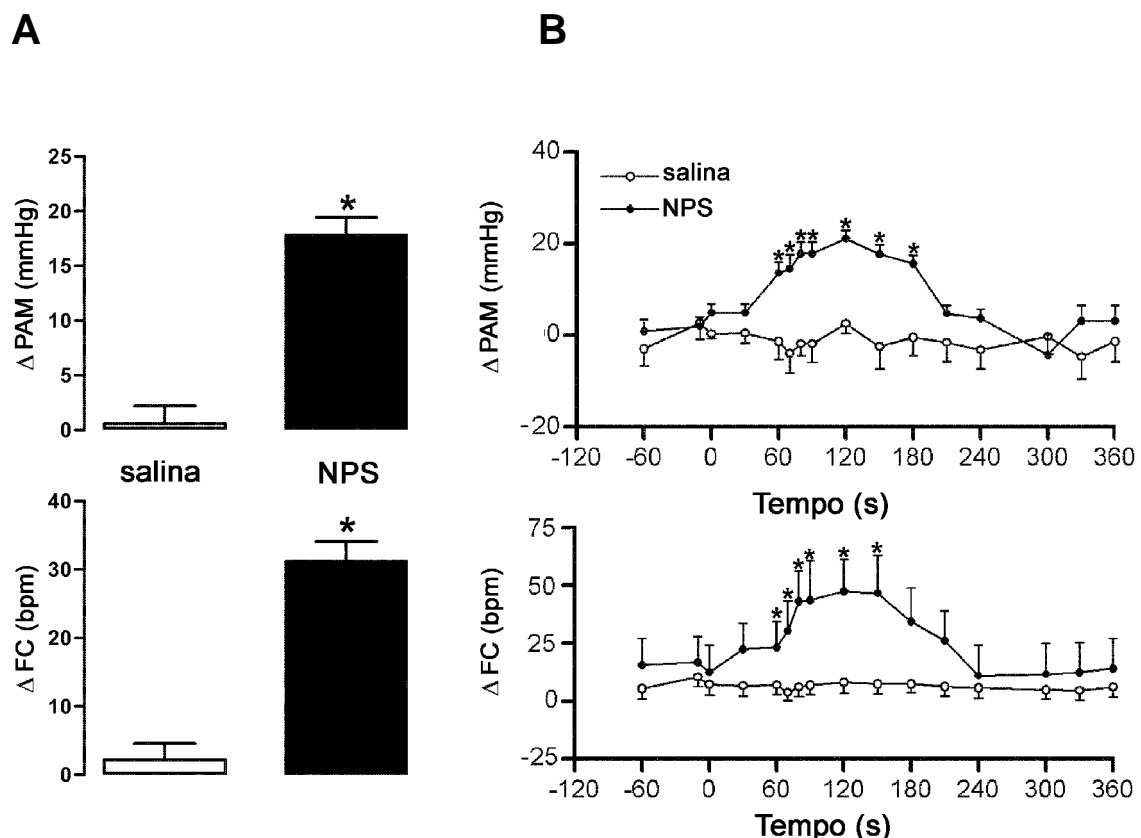


Figura 29- (A) Variações máximas na pressão arterial (Δ PAM) e frequência cardíaca (Δ FC) após a administração de 0,2 μ L de salina 0,9% ou 27 nmol de NPS no vCPFM de ratos não anestesiados ($n=6$). As colunas representam as médias \pm EPM, * $p < 0,05$, teste t de Student pareado. (B) Variação da pressão arterial média (Δ PAM) e frequência cardíaca (Δ FC) ao longo do tempo após administração de 0,2 μ L de salina 0,9% ou 27 nmol de NPS no vCPFM ($n=6$). As administrações foram feitas no tempo 0 (zero). Os pontos representam a média \pm EPM, * $p < 0,05$, two-way ANOVA, pós-teste de Boferroni.

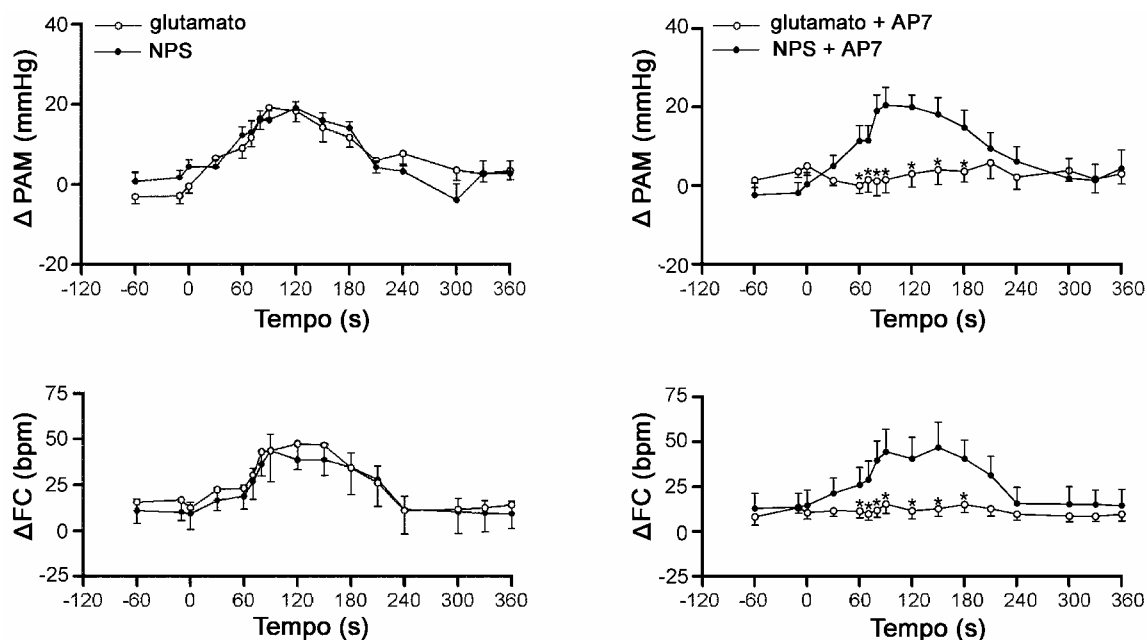


Figura 30- Variação da pressão arterial média (ΔPAM) e freqüência cardíaca (ΔFC) ao longo do tempo após administração de 81 nmol/ 0,2 μ L de L-glu ou 27 nmol/ 0,2 μ L de NPS no vCPFM de ratos não anestesiados antes e após o pré-tratamento do vCPFM com 4 nmol/ 0,2 μ l de AP7. As administrações foram feitas no tempo 0 (zero). Os pontos representam a média \pm EPM, * $p < 0,05$, two-way ANOVA, pós-teste de Boferroni.

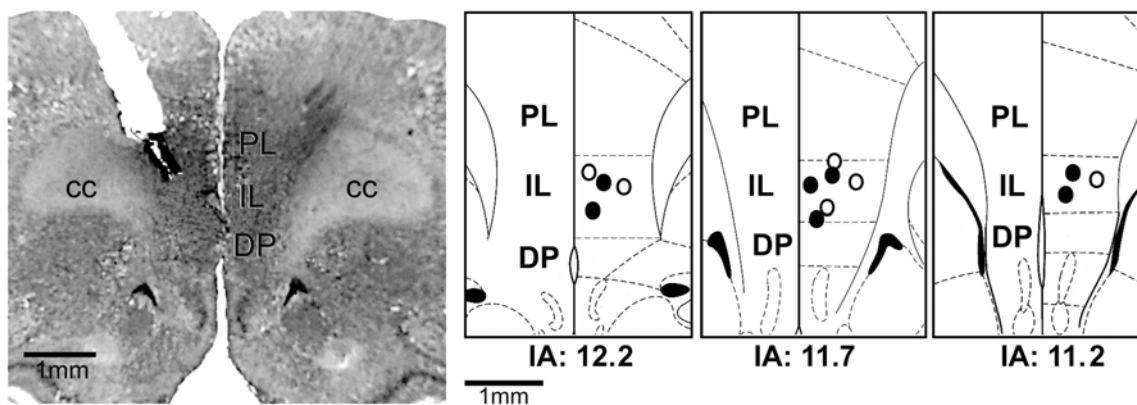


Figura 31- Esquerda: Fotomicrografia de uma secção coronal de um cérebro de um rato representativo mostrando os sítios de injeção unilateral no vCPFM. **Direita:** Representação diagramática baseada no Atlas de Paxinos e Watson (1986), indicando o entro dos sítios de injeção de NPS (○) e L-glu (●). Interaural: 11,7 mm. PL (pré-limbico), IL (córtex infralimbico), DP (córtex dorsal peduncular) e cc (corpo caloso).

DISCUSSÃO

Os principais achados da presente Tese foram: 1) O vCPFM exerce uma modulação tônica sobre a atividade parassimpática do barorreflexo; 2) Essa modulação da atividade parassimpática depende de uma interação entre receptores NMDA e nNOS presentes no vCPFM; 3) A interação entre receptores NMDA e nNOS também está envolvida com respostas cardiovasculares (taquicardia e hipertensão) provocadas pela administração de L-glu no vCPFM de ratos não-anestesiados.

Resultados anteriores do nosso laboratório mostraram que o bloqueio agudo do vCPFM com lidocaína interfere com a bradicardia reflexa durante respostas pressoras geradas pela infusão de fenilefrina (RESSTEL et al., 2004). Porém, o mesmo não foi observado durante respostas depressoras.

Para verificar a possibilidade de o vCPFM estar modulando a atividade do barorreflexo durante o efeito depressor, realizamos infusão i.v. de nitroprussiato de sódio (NPS) em ratos não anestesiados. Inicialmente foi realizada a análise da atividade do barorreflexo como um todo (bradicardia e taquicardia). Partindo dos pontos obtidos com a correlação da variação da PA e FC durante infusões de fenilefrina e NPS, foram traçadas curvas sigmóides (KORNER et al., 1972) antes e após a administração de lidocaína no vCPFM. A análise das curvas sigmóides mostrou apenas uma redução do platô inferior (P1) após a administração de lidocaína no vCPFM, caracterizada por uma menor queda na FC para os efeitos máximos de aumento da pressão arterial. De acordo com Head & McCarty (1987), a variação do platô inferior indica alterações no componente parassimpático do barorreflexo, o que em nossos resultados está caracterizado por redução da

atividade parassimpática. Por outro lado, as curvas sigmóides mostraram que o componente simpático do barorreflexo não apresentava alterações após o bloqueio agudo do vCPFM com lidocaína. A análise do ganho do barorreflexo nas curvas sigmóides mostrou que o bloqueio agudo do vCPFM com lidocaína não interfere com esse componente.

Quando separamos os pontos que formam as duas porções das curvas sigmóides (os pontos gerados pela infusão de fenilefrina e os gerados pelo NPS) e traçamos curvas de regressão linear, referentes ao efeito taquicárdico e ao efeito bradicárdico, a alteração do componente parassimpático do barorreflexo causado pelo bloqueio agudo do vCPFM com a lidocaína pôde ser melhor observada. A alteração do componente parassimpático provocada pela lidocaína nas curvas de regressão linear foi caracterizada por um deslocamento da curva para a direita, sem alteração na inclinação, revelando um “reset” do início da bradicardia reflexa. Como as curvas de regressão obtidas antes e após o tratamento com lidocaína foram paralelas, não apresentando diferença entre suas inclinações, a redução na bradicardia reflexa foi constante, possibilitando o cálculo da redução média da bradicardia reflexa causada pela administração da lidocaína no vCPFM. Por outro lado, a taquicardia reflexa ao efeito depressor causado pela infusão de NPS não foi alterada. Assim, podemos atribuir ao vCPFM uma ação modulatória tônica apenas sobre o componente parassimpático do barorreflexo.

Uma vez que o bloqueio agudo do vCPFM com lidocaína apenas alterou a atividade parassimpática do barorreflexo (alteração do P1, na análise da curva sigmóide e desvio da curva para a direita na regressão linear), mas não os outros

parâmetros do barorreflexo (tanto na curva sigmóide quanto na regressão linear), nos experimentos que se seguiram foram apenas sobre a bradicardia reflexa.

A administração bilateral de CoCl_2 no vCPFM mimetizou os efeitos da lidocaína (RESSTEL et al., 2005), mostrando que a modulação do componente parassimpático do barorreflexo pelo vCPFM envolve participação de sinapses locais, uma vez que o CoCl_2 atua bloqueando não seletivamente sinapses sem efeito sobre axônios presentes no local de sua administração (KRETS, 1984).

Dentre os neurotransmissores presentes no vCPFM, a acetilcolina, a noradrenalina e o L-glu estão envolvidos em respostas cardiovasculares (GIGG et al., 1994; CRIPPA et al., 1999; FERNANDES et al., 2003; VERBERNE, 1996). Conseqüentemente, poderia mediar a modulação do vCPFM sobre a atividade do barorreflexo.

O bloqueio de α_1 -adrenoceptores, α_2 -adrenoceptores ou receptores muscarínicos do vCPFM, por administração bilateral de respectivamente WB4101, RX821002 ou atropina no vCPFM, não afetou a resposta do barorreflexo (RESSTEL et al., 2005). Esses resultados indicam que α -adrenoceptores e receptores muscarínicos presentes no vCPFM não modulam a atividade parassimpática. Todavia, essas observações não excluem a possibilidade desses mediadores (acetilcolina e noradrenalina) apresentarem uma influência física sobre o barorreflexo.

A administração de agonistas glutamatérgicos no vCPFM de ratos anestesiados é capaz de promover alterações cardiovasculares (VERBERNE, 1996; FISK & WYSS, 1997). Além disso, estudos utilizando ligantes marcados

demonstraram a presença de receptores ionotrópicos para L-glu no vCPFM de ratos (NICOLLE & BAXTER, 2003). Nossos resultados demonstraram que o bloqueio desses receptores, utilizando a microinjeção bilateral de um antagonista não seletivo, o ácido quinurênico (KIN), afetou a resposta bradicárdica de forma similar ao CoCl_2 , ocorrendo uma redução da resposta bradicardia reflexa em decorrência de um “reset” do início da resposta reflexa para os aumentos da PA. Esses resultados indicam que o sistema glutamatérgico, através de receptores ionotrópicos, exerce influência facilitatória sobre o componente parassimpático do barorreflexo.

Os receptores ionotrópicos para o L-glu são canais permeáveis a cátions que são classificados em dois subtipos de acordo com sua maior seletividade para determinados agonistas: N-methyl-D-aspartate (NMDA) ou α -amino-3-hydroxy-5-methyl-isoxazole-4-propionate (AMPA)/kainato (não NMDA) (HOLLMANN & HEINEMANN, 1994; KEMP & MCKERNAN, 2002). Assim, para caracterizar o subtipo de receptor ionotrópico glutamatérgico envolvido na modulação do vCPFM sobre a atividade do barorreflexo, os efeitos da administração bilateral de AP7, um antagonista seletivo de receptores NMDA, foram comparados com os efeitos induzidos pela administração bilateral de NBQX, um potente e seletivo antagonista de receptores não-NMDA. A administração de AP7 causou efeito similar ao KIN na bradicardia reflexa, favorecendo a idéia de um envolvimento de receptores NMDA na modulação tônica do componente parassimpático do barorreflexo. A administração de NBQX não afetou a resposta bradicárdica, o que reforçou a idéia de que os efeitos do AP7 ocorrem sobre os receptores NMDA.

Os resultados com esses antagonistas mostraram o envolvimento de receptores NMDA na modulação glutamatérgica da atividade parassimpática. Dessa forma, demonstramos que o sistema glutamatérgico presente no vCPFM, atuando em receptores NMDA, modula a atividade do barorreflexo.

Inibição similar da atividade do barorreflexo foi descrita após a ativação de outras estruturas do sistema nervoso central, como o hipotálamo (BAUER et al., 1988) e a porção dorso-lateral da substância cinzenta periaquedutal (NOSAKA, 1996), áreas que sabidamente recebem projeções do vCPFM (BROWN & GUYNET, 1985; CARRIEVE & DAMPNEY, 1988; SESACK et al., 1989; BARMAN, 1990; TAKAGISHI & CHIBA, 1991; FISK & WYSS, 2000; VERTES, 2004). A inibição do barorreflexo associada com essas duas estruturas é caracterizada por redução da resposta bradicárdica, em particular a bradicardia de origem vagal (HOCKMAN et al., 1969; DOJOSUGITO et al., 1970; HOCKMAN & TALESNIK, 1971; COOTE et al., 1979; NOSAKA et al., 1993). A similaridade entre as respostas sugere que essas áreas podem fazer parte de uma via neuronal envolvida com a modulação parassimpática da atividade do barorreflexo modulada pelo vCPFM.

O NO, um radical livre gerado pela sintase do óxido nítrico neuronal (nNOS), Ca^{2+} /calmodulina-dependente, atua como um mensageiro que se difunde através do SNC e está envolvido em diversas respostas neuronais (GARTWAITE & BOULTON, 1995; HAWKINS et al., 1998). Evidências apontam para uma interação entre receptores NMDA e a nNOS (GARTHWAITE et al., 1988 e 1989). Receptores NMDA estão localizados próximos à nNOS (BRENMAN & BREDT,

1997) e a geração de NO tem sido descrita após a ativação de receptores NMDA (GARTHWAITE et al., 1988).

Para investigar se a inibição da NOS presente no vCPFM afetaria o componente parassimpático do barorreflexo, foram avaliados os efeitos da administração bilateral de L-NAME (um inibidor não seletivo de NOS) no vCPFM sobre a resposta bradicárdica reflexa gerada pela infusão de fenilefrina. A administração de L-NAME causou redução da bradicardia reflexa em resposta à infusão i.v. de fenilefrina, sem efeito significativo sobre o ganho do barorreflexo. Os efeitos provocados pelo L-NAME foram similares àqueles observados após a administração de AP7 no vCPFM. Considerando que os efeitos do L-NAME são devidos ao bloqueio de NOS (KNOWLES & MONCADA, 1994; MOORE & HANDY, 1997), nossos dados sugerem que a influência modulatória dos receptores NMDA no vCPFM sobre a atividade tônica do componente parassimpático do barorreflexo poderia envolver a geração de NO no vCPFM.

Todavia, como o L-NAME não é um inibidor específico para nNOS (ALDERTON et al., 2001), foi realizada também a administração bilateral de um inibidor seletivo para nNOS, o N^ω-Propyl-L-arginine (N-Propyl - ZHANG et al., 1997), no vCPFM. A administração bilateral de N-Propyl causou uma redução da bradicardia reflexa provocada pelo aumento da PA induzido pela infusão i.v. de fenilefrina, sem efeito significativo sobre o ganho do barorreflexo, de forma similar aos efeitos observados após a administração de L-NAME no vCPFM. O N-Propyl é descrito como sendo entre 3.000 e 150 vezes mais potente para inibir a nNOS do que as outras duas isoformas da NOS, a NOS induzida (iNOS) e a NOS endotelial (eNOS), respectivamente (HEVEL, et al., 1991, MARTASEK et al., 1996,

ZHANG et al., 1997). Assim, considerando que o N-Propyl foi administrado em doses 100 vezes menores do que aquelas de L-NAME e que sua constante de inibição (ki) é 1.000 vezes menor que a do L-NAME para inibir a nNOS, os resultados indicam que a nNOS presente no vCPFM está envolvida na mediação da modulação tônica da atividade do barorreflexo, exercida pelo L-glu.

Resultados da literatura indicam que inibição da atividade do barorreflexo está associada a reações de defesa (SCHLOR et al., 1984; KNUEPFER et al., 1991). O vCPFM, como parte do sistema límbico, está envolvido na integração entre respostas autonômicas e estímulos emocionais (NEAFSEY, 1990; FRYSZTAK & NEAFSEY, 1994). Assim, as alterações do barorreflexo observadas em nossos experimentos sugerem que o sistema glutamatérgico presente no vCPFM, assim como a nNOS, estaria envolvido na modulação das respostas cardiovasculares associadas a respostas emocionais ou ao exercício físico.

Durante o exercício físico ocorre um aumento na PA de forma moderada que se mantém durante toda a atividade física, porém não é acompanhada por bradicardia, mas sim por taquicardia (MICHELINI, 1998). Essa taquicardia é importante para manter não apenas o débito cardíaco, mas também os níveis de PA. Mesmo durante a atividade física, a atividade baroceptora apresenta-se normal (DICARLO & BISHOP, 1990). Todavia, os mecanismos que permitem que ocorra taquicardia na presença de aumento da PA durante o exercício físico modulando a resposta bradicárdica reflexa ainda não são totalmente conhecidos. Dessa forma, o sistema glutamatérgico presente no vCPFM poderia estar participando desse fenômeno, uma vez que é capaz de modular a atividade

parassimpática do barorreflexo de forma similar àquela observada na atividade física.

Apesar de relatos anteriores de que a administração farmacológica de agonistas glutamatérgicos no vCPFM provocaria alterações cardiovasculares em ratos anestesiados (BACON & SMITH, 1993; VERBERNE, 1996; FISK & WYSS, 1997; OWENS & VERBERNE, 2001), os seus efeitos em ratos não anestesiados ainda não haviam sido descritos. Com o objetivo de verificar se a anestesia poderia influenciar nas respostas cardiovasculares decorrentes da estimulação farmacológica do sistema glutamatérgico, foi realizada a administração de L-glu no vCPFM de ratos não anestesiados. Nossos resultados mostraram que anestesia influencia nas respostas cardiovasculares induzidas pela administração de L-glu no vCPFM, uma vez que apenas observamos taquicardia e hipertensão, as quais poderiam estar sendo mascarados ou suprimidas quando em presença de anestesia.

A anestesia pode atuar invertendo respostas cardiovasculares mediadas pelo sistema nervoso central, de hipertensivas em animais não anestesiados para hipotensivas em animais anestesiados (CORRÊA et al., 1982; BURNS & WYSS, 1985). Dessa forma, é importante estudar os efeitos cardiovasculares decorrentes da estimulação do sistema nervoso central em diferentes condições, a fim de que se possa compreender melhor os mecanismos envolvidos.

Os nossos resultados favorecem a hipótese de que o vCPFM estaria envolvido com a modulação cardiovascular tanto de respostas pressoras quanto depressoras. Corroborando essa idéia, Tavares et al. (2004) descreveram a

ocorrência de respostas pressoras após a estimulação elétrica do vCPFM de ratos não anestesiados e respostas hipotensoras em ratos anestesiados.

Microinjeções de L-glu foram aplicadas nas três áreas que compõem o vCPFM (IL:córtex infralímbico, PL: córtex prélimbico e DP: córtex dorso penduncular, ZILLES & WREE, 1995), não sendo observadas respostas cardiovasculares diferentes. Por outro lado, as microinjeções de L-glu em áreas adjacentes ao vCPFM, (Cg1, TT ou CC) não causaram efeito cardiovascular. Esses resultados sugerem que os efeitos cardiovasculares decorrentes da administração de L-glu são restritos à estimulação do vCPFM. Além disso, os resultados mostram que a porção ventral do CPFM apresenta uma homogeneidade nas respostas cardiovasculares desencadeadas pela estimulação química com L-glu, resultados esses que corroboram aqueles descritos com o uso de estimulação elétrica do vCPFM, em ratos anestesiados (VERBERNE, 1996).

O fato da resposta pressora causada pela administração de L-glu no vCPFM estar associada a taquicardia, não estando associada a bradicardia reflexa, sugere uma possível função facilitatória do vCPFM sobre o mecanismo de barorreflexo em ratos não anestesiados. Esses dados corroboram evidências que apontam para o envolvimento do vCPFM na modulação do barorreflexo (VERBERNE et al., 1987; RESSTEL et al., 2004). Além disso, durante a reação emocional condicionada, ratos que sofreram lesão química do CPFM apresentaram uma redução das respostas taquicárdicas ou até mesmo uma inversão para respostas bradicárdicas (FRYSZTAK & NEAFSEY, 1994), sugerindo uma ação modulatória do CPFM sobre a ativação do sistema nervoso simpático

cardíaco e um efeito concomitante de inibição do componente parassimpático do barorreflexo durante respostas cardiovasculares decorrentes de reação de defesa.

Uma vez que a ocorrência de respostas taquicárdicas e pressoras poderia decorrer de ação do sistema nervoso autônomo, realizamos o pré-tratamento i.v. com pentolínio, um ganglioplégico, que bloqueou tanto a taquicardia quanto a resposta pressora, provocadas pela administração de L-glu no vCPFM, mostrando que respostas cardiovasculares dependem de uma ativação do sistema nervoso autônomo. Uma vez que o pentolínio promove bloqueio indiscriminado do componente cardíaco e do componente vascular do sistema nervoso autônomo (HEAD, 2003), foi necessário verificar a possibilidade de uma relação causal entre as duas respostas.

Com o intuito de investigar a participação do sistema nervoso simpático cardíaco nas respostas cardiovasculares à estimulação do vCPFM com L-glu, nós realizamos o pré-tratamento i.v. com atenolol, um antagonista β_1 -adrenérgico. O atenolol bloqueou completamente a taquicardia e a resposta pressora do L-glu, indicando ser a resposta pressora decorrente de aumento na atividade simpática cardíaca. Essa idéia é favorecida pela significativa correlação entre as variações da FC e da PAM desencadeadas pelas doses crescentes de L-glu, além da similaridade na duração das respostas.

Enquanto os resultados apresentados com o pentolínio e o atenolol claramente indicaram que a taquicardia e o efeito pressor causados pela administração de L-glu no vCPFM são devidos a uma ativação do sistema nervoso simpático cardíaco, o lento início das respostas e o fato da resposta máxima ocorrer em média 90 segundos após a administração de L-glu necessita maiores

explicações. Considerando a predominância do sistema nervoso parassimpático sobre o tônus cardíaco e o fato de receptores NMDA estarem envolvidos com a modulação parassimpática cardíaca (como descrito anteriormente), estudamos os efeitos do bloqueio de receptores muscarínicos pelo pré-tratamento i.v. com metilbrometo de homatropina, um antagonista muscarínico que não atravessa a barreira hemato-encefálica, sobre as respostas cardiovasculares decorrentes da administração de L-glu no vCPFM.

O pré-tratamento com metilbrometo de homatropina não afetou os efeitos máximos da taquicardia ou da resposta pressora produzidas pelo L-glu. Porém, reduziu significativamente a latência para o início das respostas cardiovasculares. As respostas máximas foram observadas 25 segundos após a administração do L-glu, quando anteriormente ocorriam em média 90 segundos após a sua administração. Conseqüentemente, o início das respostas cardiovasculares analisadas nas curvas temporais após a administração do L-glu foi deslocado para a esquerda, mostrando que atividade parassimpática estaria retardando o início das respostas cardiovasculares mediadas pelo sistema nervoso simpático.

O fato da inibição da atividade parassimpática cardíaca adiantar o início das respostas cardiovasculares, sem afetar a intensidade ou duração das mesmas, sugere que o L-glu também ativa o componente parassimpático cardíaco quando administrado no vCPFM, além de uma predominante ativação do componente simpático. Partindo do fato que a resposta parassimpática ocorreu imediatamente após a administração do L-glu, a ativação do sistema nervoso parassimpático não pode ser atribuída a uma resposta do barorreflexo ao efeito pressor da administração de L-glu no vCPFM. As evidências que mostram que o bloqueio de

receptores NMDA no vCPFM afeta a atividade do componente parassimpático do barorreflexo favorecem a idéia de que a estimulação de receptores NMDA no vCPFM possa também ativar o sistema nervoso parassimpático cardíaco.

O aparecimento da resposta parassimpática à injeção de L-glu, logo após sua administração no VCPFM, vai de encontro a observações clássicas de que a atividade vagal cardíaca seria mais evidente imediatamente após a estimulação dos barorreceptores, apresentando uma tendência a adaptar-se mais rapidamente do que o componente simpático (WANG & BORISON, 1947). A reunião desses resultados mostra que a administração de L-glu no vCPFM de ratos não anestesiados promoveria aumento tanto da atividade parassimpática quanto da simpática cardíaca de tal forma que a atividade parassimpática inicialmente estaria se sobrepondo à simpática, inibindo o aparecimento da taquicardia. A taquicardia e conseqüentemente a resposta pressora se manifestariam no momento em que a atividade simpática predominasse sobre a atividade parassimpática.

Foi relatado que ratos submetidos a protocolos de condicionamento usando choque nas patas (modelo de medo condicionado) apresentavam hipertensão e taquicardia durante o condicionamento; resposta característica do aumento da atividade simpática observada durante reações de defesa (LEDOUX et al., 1984, CARRIVE, 2000). Além disso, a análise histológica dos cérebros desses animais revelou expressão de proteína fos em células do vCPFM (BECK & FIBIGER, 1995).

Embora existam evidências de projeções diretas do vCPFM para núcleos bulbares envolvidos com o controle do sistema nervoso autônomo cardiovascular, incluindo o núcleo do trato solitário, o núcleo ambíguo e o bulbo caudal e rostral

ventrolateral (CVLM e RVLM respectivamente) (HURLEY et al., 1991; BUCHANAN et al., 1994; VERTES, 2004), a possível existência de conexões intermediárias nas vias envolvidas na atividade cardiovascular do vCPFM não pode ser excluída. Essa idéia é sustentada por estudos funcionais que indicam a existência de conexões com o hipotálamo e a amígdala (como discutido anteriormente) ou até mesmo com o córtex pré-frontal lateral (HARDY & MACK, 1990).

Lesões de varias estruturas do sistema límbico alteram significativamente repostas autonômicas cardiovasculares durante situações de defesa. Lesões do hipotálamo diminuem significativamente as repostas cardiovasculares decorrentes da resposta emocional condicionada que são mediadas pelo sistema nervoso simpático (IWATA et al., 1986; LE DOUX et al., 1988). Lesões realizadas na amígdala, estrutura que apresenta projeções para o hipotálamo, também atenuam as repostas cardiovasculares observadas durante a resposta emocional condicionada (GALENO et al., 1984; GENTILE et al., 1986). Extensas conexões neuroniais tem sido demonstradas entre esses núcleos e o vCPFM (BECKSTEAD, 1979; HOSOYA & MATSUSHITA, 1980; ROOM et al., 1985; HURLEY et al., 1991). Além disso, existem ainda projeções que partem do IL para subdivisões centrais dos núcleos da amígdala (BECKSTEAD, 1979; ROOM et al., 1985; HURLEY et al., 1991), o qual apresenta extensas conexões com o núcleo parabraquial (SAPER, 1982), o complexo motor dorsal do vago (SCHWABER et al., 1982) e o núcleo do trato solitário (VAN DER KOOY et al., 1984), estruturas que exercem uma importante função na regulação cardiovascular.

Favorecendo a idéia de que o vCPFM modularia o sistema cardiovascular durante reações de defesa, Al-Maskati & Zbrozyna (1989) descreveram que a

estimulação do vCPFM em ratos foi capaz de inibir o componente cardiovascular da reação de defesa (hipertensão e taquicardia) evocado a partir da estimulação do hipotálamo ou da amígdala, além de suprimir outros componentes cardiovasculares tais como vasoconstrição renal e vasodilatação nos músculos esqueléticos. Porém, mais experimentos se fazem necessários para esclarecer se o sistema glutamatérgico presente no vCPFM participaria na modulação de respostas cardíacas observadas durante respostas em situações de defesa, como o modelo do medo condicionado.

Uma vez que observamos que receptores NMDA presentes no vCPFM estariam envolvidos na modulação parassimpática do barorreflexo e que essa modulação é importante para o ajuste cardíaco durante reações de estresse (NOSAKA, 1996), bem como o fato da administração de L-glu no vCPFM produzir respostas cardiovasculares caracterizadas por taquicardia e aumento da pressão arterial, foram testados os efeitos da inibição de receptores NMDA ou não-NMDA do vCPFM sobre as respostas cardiovasculares decorrentes da estimulação desta área por L-glu. Tanto a resposta pressora quanto a taquicardia provocada pela administração de L-glu no vCPFM foram inibidas após o pré-tratamento do vCPFM com AP7, um antagonista seletivo para receptores NMDA. Porém o mesmo não foi observado após o pré-tratamento com salina ou NBQX (mesma dose administrada de AP7), um antagonista de receptores não-NMDA. As doses utilizadas nesses protocolos foram às mesmas utilizadas nos protocolos para o estudo da atividade do barorreflexo. Dhurva et al. (1998) relataram que NBQX foi efetivo em bloquear efeitos cardiovasculares associados a receptores AMPA em uma dose cinco vezes menor do que aquela de AP-7 necessária para bloquear efeitos causados por

ativação de receptores NMDA. Assim sendo, o fato do pré-tratamento com NBQX na mesma dose utilizada de AP-7 não ter afetado a resposta ao L-glu favorece a idéia de um envolvimento preferencial de receptores NMDA na mediação da resposta ao L-glu injetado no vCPFM.

Com os resultados descritos até agora demonstramos que a administração de um antagonista seletivo (AP7) para receptores NMDA no vCPFM (mas não o NBQX) foi capaz de promover redução da atividade parassimpática cardíaca durante o aumento da PA e bloquear completamente as respostas cardiovasculares decorrentes da administração farmacológica do L-glu no vCPFM. Assim, neurônios glutamatérgicos presentes no vCPFM atuando em receptores NMDA aparecem como prováveis moduladores das respostas cardíacas desencadeadas durante a resposta emocional condicionada, modulando tonicamente o componente parassimpático do barorreflexo e modulando a atividade simpática cardíaca. Reforçando essa hipótese, foi descrito na literatura que durante estágios iniciais de estresse, as concentrações de L-glu no CPFM de ratos estão aumentadas (MONGHADDAM, 1993).

Com o intuito de saber se a NOS participaria da resposta cardiovascular produzida pelo L-glu no vCPFM via receptores NMDA, foi pré-administrado L-NAME no vCPFM. A administração de L-NAME aboliu significativamente as respostas cardiovasculares causadas por L-glu no vCPFM. Entretanto, como o L-NAME não é um inibidor específico da nNOS, foi administrado também o inibidor seletivo da nNOS, o N^ω-Propyl-L-arginine (N-Propyl) no vCPFM. O bloqueio seletivo da nNOS pelo N-Propyl aboliu as respostas cardiovasculares causadas por L-glu. O bloqueio promovido pelo N-Propyl foi similar ao do L-NAME. Como foi

discutido anteriormente, o N-Propyl apresenta uma seletividade para nNOS significativamente maior do que para iNOS e eNOS (HEVEL, et al., 1991, MARTASEK et al., 1996, ZHANG et al., 1997). Além disso, quando comparada sua seletividade para nNOS em relação ao L-NAME, essa chega a ser 1.000 vezes maior, reforçando do envolvimento específico da nNOS nos efeitos cardiovasculares provocados pela administração de L-glu no vCPFM.

Assim sendo, tanto AP7 quanto N-Propyl foram eficientes em inibir os efeitos cardiovasculares decorrentes da administração de L-glu no vCPFM. Esses resultados favorecem a hipótese da existência de interação entre receptores NMDA e a nNOS no vMPFC na modulação do sistema cardiovascular.

O NO atua primariamente como um mensageiro intracelular (GUIX et al., 2005), podendo difundir-se rapidamente da célula onde foi gerado e atingir alvos celulares a uma distância de aproximadamente 0.3–0.4 mm (LANCASTER, 1997; WOOD & GARTHWAITE, 1994). Assim, o NO liberado pode influenciar neurônios ou glia próximos de onde foi liberado. O NO induz mudanças neuronais sinalizando funções por diversas vias. O seu efeito mais evidente envolve a síntese de cGMP. A ativação da guanilato ciclase solúvel aumenta os níveis de cGMP e a ação de proteínas quinases dependente de cGMP tem sido sugerida como a principal via de transdução do sinal do NO (WANG & ROBINSON, 1997; SMOLENSKI et al., 1998).

Visando investigar os efeitos cardiovasculares decorrentes da administração de NO no vCPFM, injetamos um doador de NO, o nitroprussiato de sódio (NPS). O NPS causou respostas cardiovasculares caracterizadas por aumentos dose-dependentes na PA e FC, similares àqueles observados após

administração de L-glu. Esses resultados reforçam a idéia que o NO participaria na geração das respostas cardiovasculares, sendo sintetizado pela nNOS após a atuação do L-glu em receptores NMDA do vCPFM.

Tem sido descrita uma relação inversa entre NO e L-glu. Estudos realizados *in vitro* e *in vivo* utilizando doadores de NO, inibidores da NOS e agonistas glutamatérgicos sugerem que em varias áreas no sistema nervoso central, o NO aumentaria as concentrações de L-glu liberado pelas terminações nervosas (PRAST et al., 1998). Assim, o NO doado pelo NPS causaria seus efeitos por meio do aumento na liberação de L-glu, por estimular terminações glutamatérgicas presentes no vCPFM. Para verificar se as respostas cardiovasculares causadas pelo NO envolveriam liberação de L-glu, foi administrado AP7 antes da administração de NPS ou de L-glu. O bloqueio dos receptores NMDA com AP7 foi apenas eficaz em abolir as respostas cardiovasculares ao L-glu (como demonstrado anteriormente), sem alterar as respostas desencadeadas pelo NPS. Esses resultados mostram que os efeitos cardiovasculares causados pela administração de NPS no vCPFM não decorrem de liberação pré-sináptica de L-glu e sua conseqüente interação com receptores NMDA pós-sinápticos. Dessa forma, os dados confirmam que a função regulatória do L-glu no vCPFM sobre o sistema cardiovascular dependeria da formação de NO através de uma interação entre os receptores NMDA e nNOS.

Nossos resultados mostram que o vCPFM, através do sistema glutamatérgico, via ativação de receptores NMDA, atua diretamente na modulação cardíaca influenciando o sistema nervoso autonômico. Estes receptores seriam importantes na manutenção tônica da atividade parassimpática do barorreflexo e

na mediação de respostas pressoras e taquicárdicas em resposta à injeção de L-glu em ratos não anestesiados. Além disso, essas respostas cardiovasculares envolvem a formação de NO, decorrente da ativação da nNOS.

As respostas cardiovasculares causadas pela administração de L-glu não foram diferentes entre as áreas que compõem o vCPFM, já que essas respostas não foram observadas quando o L-glu foi administrado em áreas adjacentes ao vCPFM, mostrando que as respostas cardiovasculares decorrentes da administração de L-glu são restritas ao vCPFM. Além disso, essas respostas dependem de interação receptores NMDA e nNOS presentes no vCPFM, levando à ativação do sistema nervoso simpático cardíaco. A resposta pressora observada após a administração de L-glu está associada à taquicardia. Foi também evidenciada uma curta ação parassimpática logo após a administração de L-glu, mascarada pela predominância da resposta simpática.

O conjunto de dados apresentados sugere que o sistema glutamatérgico presente no vCPFM interagindo com sistema nitrérgico local estaria envolvido na modulação cardíaca associada a respostas comportamentais em ratos.

CONCLUSÕES

Concluimos que a neurotransmissão glutamatérgica presente no vCPFM de ratos atuando via receptores NMDA associados a nNOS exerce uma influência facilitatória tônica sobre o componente parassimpático do barorreflexo. Além disso, nossos resultados permitem concluir que a ativação de receptores NMDA no vCPFM também estariam envolvidos na modulação da atividade simpática cardíaca.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALDERTON, W.K.; COOPER, C.E.; KNOWLES, R.G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. **Biochem. J.**, v. 357, p. 593-615, 2001.
- AL- MASKATI H; ZBROZYNA, A.W. Stimulation in prefrontal cortex area inhibits cardiovascular and motor components of the defence reaction in rats. **J. Auton. Nerv. Syst.**, v. 28, p.117-25, 1989.
- ARMONY, J.L.; SERVAN-SCHREIBER, D; COHEN, J.D.; LEDOUX, J.E. An anatomically constrained neural network model of fear conditioning. **Behav Neurosci.**, v.109, p. 246-257, 1995.
- BACON, S.J.; SMITH, A.D. A monosynaptic pathway from an identified vasomotor center in the medial prefrontal cortex to an autonomic area in the thoracic spinal cord. **Neurosci.**, v. 54, p. 719-728, 1993.
- BARMAN, S.M. Descending projections of hypothalamic neurons with sympathetic nerve-related activity. **J. Neurophysiol.**, v. 64, p. 1019-1032, 1990.
- BAUER, R.M.; VELA, M.B.; SIMON, T.; WALDROP, T.G. A GABAergic mechanism in the posterior hypothalamus modulates baroreflex bradycardia. **Brain Res. Bull.**, v. 20, p. 633-641, 1988.
- BECK, C.H.; FIBIGER, H.C. Conditioned fear-induced changes in behavior and in the expression of the immediate early gene *c-Fos*: with and without diazepam pretreatment. **J. Neurosci.**, v. 15, p. 709-720, 1995.
- BECKSTEAD, R.M. Autoradiographic examination of corticoaortical and subcortical projections of the mediodorsal projection (prefrontal) cortex in rat. **J. Comp. Neurol.**, v. 184, p. 43-62, 1979.

- BOHUS, B.; KOOLHAAS, J.M.; LUITEN, P.G.; KORTE, S.M.; ROOZENDAAL, B.; WIERSMA, A. The neurobiology of the central nucleus of the amygdala in relation to neuroendocrine and autonomic outflow. **Prog Brain Res.**, v. 107, p. 447-460, 1996.
- BORDI, F.; UGOLINI, A. Antagonists metabotropic glutamate receptor do not prevent induction of long-term potentiation in the dentate gyrus of rats. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 273, p. 291-294, 1995.
- BRENNAN, J.E.; BRETT, D.S. Synaptic signaling by nitric oxide. **Curr. Opin. Neurobiol.**, v. 7, p. 374-378, 1997.
- BROWN, D.L.; GUYENET, P.G. Electrophysiological study of cardiovascular neurons in the rostral ventrolateral medulla in rats. **Circ. Res.**, v. 56, p. 359-369, 1985.
- BRUTUS, M.; WATSON, R.E.; SHAIKH, M.B.; SIEGEL, H.E.; WEINER, S.; SIEGEL, A. A. [14C]2-deoxyglucose analysis of the functional neural pathways of the limbic forebrain in the rat. IV. A pathway from the prefrontal cortical-medial thalamic system to the hypothalamus. **Brain Res.**, v. 24, p. 279-293, 1984.
- BUCHANAN, S.L.; THOMPSON, R.H.; MAXWELL, B.L.; POWELL, D.A. Efferent connections of the medial prefrontal cortex in the rabbit. **Exp. Brain Res.**, v.100, p. 469-483, 1994.
- BURNS, S.M.; WYSS, J.M. The involvement of anterior cingulate cortex in blood pressure control. **Brain Res.**, v. 340, p. 71-77, 1985.
- CALLERA, J.C; BONAGAMBA, L.G.; NOSJEAN, A.; LAGUZZI, R.; MACHADO, B.H. Activation of GABA_A but not GABA_B receptors in the NTS blocked

bradycardia of chemoreflex in awake rat. **Am J Physiol.**, v. 276, p. 1902-1910, 1999.

CARRIVE, P. Conditioned fear to environmental context: cardiovascular and behavioral components in the rat. **Brain Res.**, v. 858, p. 440-445, 2000.

CARRIVE, P.; BANDLER, R.; DAMPNEY, R.A. Anatomical evidence that hypertension associated with the defence reaction in the cat is mediated by a direct projection from a restricted portion of the midbrain periaqueductal grey to the subretrofacial nucleus of the medulla. **Brain Res.**, v. 460, p. 339-345, 1988.

CECHETTO, D.F.; SAPER, C.B. Role of the cerebral cortex in autonomic functions. In: **Central Regulation of Autonomic Functions.**, p.208-223. Eds ^a D. Loewy and K. m. Spyer. Oxford University Press: New York., 1990.

COLEMAN, T.G. Arterial baroreflex control of heart rate in conscious rat. **Am. J. Physiol.**, v. 238, p. 515-520, 1980.

COOTE, J.H.; HILTON, S.M.; PEREZ-GONZALEZ, J.F. Inhibition of the baroreceptor reflex on stimulation in the brain stem defence centre. **J. Physiol.**, v. 288, p. 549-560, 1979.

CORRÊA, F.M.A.; MAGRO, I.A.S.; PERES-POLON, V.L. CNS mediation of cardiovascular responses to the intracerebroventricular administration of catecholamines. **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 3, p. 330-332, 1982.

CRIPPA, G.E.; PERES-POLON, V.L.; KUBOYAMA, R.H.; CORRÊA, F.M.A. Cardiovascular response to the injection of acetylcholine into the anterior cingulate region of the medial prefrontal cortex of unanesthetized rats. **Cereb. Cortex.**, v. 9, p. 352-365, 1999.

CULLINAN, W.E.; HERMAN, J.P.; BATTAGLIA, D.F.; AKIL, H.; WATSON, S.J. Pattern and time course of immediate early gene expression in rat brain following acute stress. **Neuroscience**, v. 64, p. 477-505, 1995.

DE OLIVEIRA, R.W.; DEL BEL, E.A.; GUIMARÃES, F.S. Behavioral and c-fos expression changes induced by nitric oxide donors microinjected into the dorsal periaqueductal gray. **Brain Res. Bull.**, v. 51, p. 457-464, 2000.

DICARLO, S.E.; BISHOP, V.S. Exercise training enhances cardiac afferent inhibition of baroreflex function. **Am. J. Physiol.**, v. 258, p. 212-220, 1990.

DIOP, L., BRIERE, R.; GRONDIN, L. and READER, T. A. Adrenergic receptor and catecholamine distribution in rat cerebral cortex: binding studies with [3H] prazosin, [3H] idazoxan and [3H] dihydroalprenolol. **Brain Res.**, v. 402 (2), p. 403-408, 1987.

DJOJOSUGITO, A.M.; FOLKOW, B.; KYLSTRA, P.H.; LISANDER, B.; TUTTLE, R.S. Differentiated interaction between the hypothalamic defence reaction and baroreceptor reflexes. I. Effects on heart rate and regional flow resistance. **Acta Physiol. Scand.**, v. 78, p. 376-385, 1970.

DUNCAN, G.E.; KNNAP, D.J.; BREESE, G.R. Neuratomical characterization of Fos induction in rat behavioral models of anxiety. **Brain Res.**, v. 713, p. 79-91, 1996.

DUNN, J.D. Plasma corticosterone to electrical stimulation of medial frontal cortex. **Neurosci. Commun.**, v. 7, p. 1-7, 1990.

- DHRUVA, A.; BHATNAGAR, T.; SAPRU, H.N. Cardiovascular responses to microinjections of glutamate into the nucleus tractus solitarii of unanesthetized supracollicular decerebrate rats. **Brain Res.**, v. 801, p. 88–100, 1998.
- FENDT, M.; FANSELOW, M.S. The neuroanatomical and neurochemical basis of conditioned fear. **Neurosci. Biobehav. Res.**, v. 23, p. 743-760, 1999.
- FERNANDES, K.B.P.; CRIPPA, G.E.; TAVARES, R.F.; ANTUNES-RODRIGUES, J.; CORRÊA, F.M.A. Mechanisms involved in the pressor response to noradrenaline injection into the cingulate cortex of unanesthetized rats. **Neuropharmacol.**, v 44, p.757-763, 2000.
- FISK, G.D.; WYSS, J.M. Pressor and depressor sites are intermingled in the cingulate cortex of rat. **Brain Res.**, v. 754, p. 204-212, 1997.
- FISK, G.D.; WYSS, J.M. Descending projections of infralimbic cortex that mediate stimulation-evoked changes in arterial pressure. **Brain Res.**, v. 859, p. 83-95, 2000.
- FRYSZTAK, R.J.; NEAFSEY, E.J. The effect of medial frontal cortex lesions on respiration, "freezing", and ultrasonic vocalizations during conditioned emotional responses in rats. **Cerebral Cortex.**, v. 1, p. 418-425, 1991.
- FRYSZTAK, R.J.; NEAFSEY, E.J. The effect of medial frontal cortex lesions on cardiovascular conditioned emotional responses in rat. **Brain Res.** v. 643, p.181-193, 1994.
- GALENO, T.M.; VANHOESEN, G.W.; BRODY, M.J. Central amygdaloid nucleus lesion attenuates exaggerated hemodynamic responses to noise stress in the spontaneously hypertensive rat. **Brain Res.**, v. 291, p. 249-259, 1984.

- GARTHWAITE, J.; BOULTON, C.L. Nitric oxide signaling in the central nervous system. **Annu. Rev. Physiol.**, v. 57, p. 683-706, 1995.
- GARTHWAITE, J.; CHARLES, S.L.; CHESS-WILLIAMS, R. Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain. **Nature**, v. 336, p. 385-388, 1988.
- GARTHWAITE, J.; GARTHWAITE, G.; PALMER, R.M.J.; MONCADA, S. NMDA receptor activation induces nitric oxide synthesis from arginine in rat brain slices. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 172, p. 413-416, 1989.
- GENTILE, C.G.; JARRELL, T.W.; TEICH, A.H.; MCCABE, P.M.; SCHNEIDERMAN, N. The role of amygdaloid central nucleus in the retention of differential Pavlovian conditioning of bradycardia in rabbits. **Behav. Brain Res.**, v. 20, p. 263-273, 1986.
- GIGG, J.; TAN, A.M.; FINCH, D.M. Glutamatergic hippocampal formation projections to prefrontal cortex in the rat are regulated by GABAergic inhibition and show convergence with glutamatergic projections from the limbic thalamus. **Hippocampus**, v. 4, p.189-198, 1994.
- GLASER, E.M.; GRIFFIN, J.P. Influence of the cerebral cortex on habituation. **J. Physiol.**, v. 160, p. 429-445, 1962.
- GROENEWEGEN, H.J. Organization of the afferent connections of the mediodorsal thalamic nucleus in the rat, related to the mediodorsal-prefrontal topography. **Neuroscience**, v. 24, p. 379-431, 1988.

- GUIMARÃES, F.S.; DE AGUIAR, J.C.; DEL BEL, E.A.; BALLEJO, G. Anxiolytic effect of nitric oxide inhibitors microinjected into the dorsal central grey. **NeuroReport**, v. 5, p. 1929-1932, 1994.
- GUIX, F.X.; URIBESALGO, I.; COMA, M.; MUNOZ, F.J. The physiology and pathophysiology of nitric oxide in the brain. **Prog. Neurobiol.**, v. 76, p. 126-152, 2005.
- HAIBARA, A.S.; BONAGAMBA, L.G.; MACHADO, B.H. Sympathoexcitatory neurotransmission of the chemoreflex in the NTS of awake rats. **Am. J. Physiol.**, v. 276, p. 69-80, 1999.
- HARDY, S.G.; HOLMES, D.E. Prefrontal stimulus-produced hypotension in rat. **Exp. Brain Res.**, v. 73, p. 249-255, 1988.
- HARDY, S.G.; MACK, S.M. Brainstem mediation of prefrontal stimulus-produced hypotension. **Exp. Brain Res.**, v. 79, p. 393-399, 1990.
- HAWKINS, R.D.; SON, H.; ARANCIO, O. Nitric oxide as a retrograde messenger during long-term potentiation in hippocampus. **Prog. Brain Res.**, v. 118, p. 155-172, 1998.
- HEAD, G.A. The sympathetic nervous system in hypertension: assessment by blood pressure variability and ganglionic blockade. **J. Hypertens.**, v. 21, p. 1619-1621, 2003.
- HEAD, G.A.; McCARTY, R. Vagal and sympathetic components of the heart rate range and gain of the baroreceptor-heart rate reflex in conscious rats. **J. Autonomic Nerv. Syst.**, v. 21, p. 203-213, 1987.

- HENKE, P.G. Mucosal damage following electrical stimulation of the anterior cingulate cortex and pretreatment with atropine and cimetidina. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 19, p. 483-486, 1983.
- HEVEL, J.M.; WHITE, K.A.; MARLETTA, M.A. Purification of the inducible murine macrophage nitric oxide synthase. Identification as a flavoprotein. **J. Biol. Chem.**, v. 266, p. 22789-22791.
- HOCKMAN, C.H.; TALESNIK, J. Central nervous system modulation of baroreceptor input. **Am. J. Physiol.**, v. 221, p. 515-519, 1971.
- HOCKMAN, C.H.; TALESNIK, J.; LIVINGSTON, K.E. Central nervous system modulation of baroreceptor reflexes. **Am. J. Physiol.**, v. 217, p. 1681-1689, 1969.
- HOLLMANN, M.; HEINEMANN, S. Cloned glutamate receptors. **Annu. Rev. Neurosci.** v. 17, p. 31-108, 1994.
- HOSOYA, Y.; MATSUSHITA, M. Cells of origin of the descending afferents to the lateral hypothalamic area in the rat, studied with the horseradish peroxidase method. **Neurosci. Lett.**, v.18, p. 231-236, 1980.
- HURLEY-GUIS, K.M.; NEAFSEY, E.J. The medial frontal cortex and gastric motility: microstimulation results and their possible significance for the overall pattern of rat frontal and perietal cortex. **Brain Res.**, v. 365, p. 241-248, 1986.
- HURLEY, K.M.; HERBERT H.; MOGA, M.M.; SAPER, C.B. Efferent projections of the infralimbic cortex of the rat. **J. Comp. Neurol.**, v. 8, p. 249-276, 1991.
- IMAKI, T.; SHIBASAKI, T.; HOTTA, M.; DEMURA, H. Intracerebroventricular administration of corticotropin-releasing factor induces c-fos mRNA expression

in brain regions related to stress responses: comparison with pattern of c-fos mRNA induction after stress. **Brain Res.**, v. 9, p. 114-125, 1993.

INOUE, M.; MAEDA, M.; TAKAO, S. Regional differentiation of blood flow responses to microinjection of sodium nitroprusside into the nucleus tractus solitarius of anesthetized rats. **J. Auton. Nerv. Syst.**, v. 14, p. 172-178, 1997.

IWATA, J.; LEDOUX, J.E.; MEELEY, M.P.; ARNERIC, S.; REIS, D.J. Intrinsic neurons in the amygdaloid field projected to by the medial geniculate body mediate emotional responses conditioned to acoustic stimuli. **Brain Res.**, v. 24, p. 195-214, 1986 (a).

IWATA, J.; LEDOUX, J.E.; REIS, D.J. Destruction of intrinsic neurons in the lateral hypothalamus disrupts the classical conditioning of autonomic but not behavioral emotional responses in the rat. **Brain Res.**, v. 12, p. 61-66, 1986 (b).

KEMP, J.A.; MCKERNAN, R.M. NMDA receptor pathways as drug targets. **Nat. Neurosci.**, v. 5, p. 1039-1042, 2002.

KNOWLES, R.G.; MONCADA, S. Nitric oxide synthases in mammals. **Biochem. J.**, v. 298, p. 249-258, 1994.

KRETZ, R. Local cobalt injection: a method to discriminate presynaptic from postsynaptic neural activity. **J. Neurosci. Methods.**, v. 11, p. 129-135, 1984.

KRETTEK, J.E.; PRICE, J.L. The cortical projections of the mediodorsal nucleus and adjacent thalamic nuclei in the rat. **J. Comp. Neurol.** v.171, p. 157-191, 1977.

- KNUEPFER, M.M.; PRINTZ, M.P.; STOCK, G. Increased sensitivity to arousal in spontaneously hypertensive rats is partially dependent upon the amygdala. **Clin. Exp. Hypertens.**, v. 13, p. 505-523, 1991.
- KORNER, P.I.; SHAW, J.; WEST, M.J.; OLIVER, J.R. Central nervous system control of baroreceptor reflexes in the rabbit. **Circulat. Res.**, v. 31, p. 637-652, 1972.
- LAHLOU, S. Mechanisms underlying the cardiovascular responses to spinal dopamine receptor stimulation by apomorphine in anesthetized rats. **Neurosci. Lett.**, v. 2, p.187-912, 003.
- LANCASTER, J.R. A tutorial on the diffusibility and reactivity of free nitric oxide. **Nitric Oxide**, v. 1, p. 18-30, 1997.
- LANFRANCHI, P.A.; SOMERS, V.K. Arterial baroreflex function and cardiovascular variability: interactions and implications. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 283, p. 815-826, 2002.
- LAWRENCE, A.J.; JARROTT, B. Neurochemical modulation of cardiovascular control in the nucleus tractus solitarius. **Prog. Neurobiol.**, v. 48, p. 21-53, 1996.
- LEDOUX, J.E.; SAKAGUCHI, A.; REIS, D.J. Subcortical efferent projections of the medial geniculate nucleus mediate emotional responses conditioned to acoustic stimuli. **J. Neurosci.**, v. 4, p. 683-698, 1984.
- LEDOUX, J.E.; IWATA, J.; CICCHETTI, P.; REIS, D.J. Different projections of the central amygdaloid nucleus mediate emotional responses conditioned to acoustic stimuli. **J. Neurosci.**, v. 8, p. 2527-2529, 1988.

- LEHMANN, J.; NAGY, J.I.; ATMADJA, S.; FIBIGER, H.C. The nucleus basalis magnocellularis: the origin of a cholinergic projection to the neocortex of the rat. **Neuroscience.**, v. 5, p. 1161-1174, 1980.
- LEONARD, C. M. The prefrontal cortex of the rat. I. Cortical projection of the mediodorsal nucleus. II. Efferent connections. **Brain Res.** v. 12, p. 321-343, 1969.
- LEONARD, C.M. The connections of the dorsomedial nuclei. **Brain. Behav. Evol.**, v. 6, p. 524-541, 1972.
- LIU, C.Y.; XIE, D.P.; LIU, J.Z. Microinjection of glutamate into dorsal motor nucleus of the vagus excites gallbladder motility through NMDA receptor - nitric oxide - cGMP pathway. **Neurogastroenterol Motil.**, v. 16, p. 347-353, 2004.
- LOEWY, A.D. Central autonomic pathways. In: **Central Regulation of Autonomic Functions.**, p. 89. Ed: A.D. Loewy and K. M. Spyer. Oxford University Press: New York, 1989.
- MARTASEK, P.; LIU, Q.; LIU, J.; ROMAN, L.J.; GROSS, S.S.; SESSA, W.C.; MASTERS, B.S. Characterization of bovine endothelial nitric oxide synthase expressed in E. coli. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 219, p. 359-365, 1996.
- McDONALD, A.J.; MASCAGNI, F.; GUO, L. Projections of the medial and lateral prefrontal cortices to the amygdala: a Phaseolus vulgaris leucoagglutinin study in the rat. **Neuroscience**, v. 71, p. 55-75, 1996.
- MICHELINI, L.C. Endogenous vasopressin and the central control of heart rate during dynamic exercise. **Braz. J. Méd. Biol. Res.**, v. 31, p. 1185-95, 1998.

- MOGHADDAM, B. Stress preferentially increases extraneuronal levels of excitatory amino acids in the prefrontal cortex: comparison to hippocampus and basal ganglia. **J. Neurochem.**, v. 60, p.1650-1657, 1993.
- MOORE, P.K.; HANDY, R.L. Selective inhibitors of neuronal nitric oxide synthase-- is no NOS really good NOS for the nervous system? **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 18, p. 204-211, 1997.
- MORIGUCHI, S.; OHZURU, N.; KOGA, N.; HONDA, K.; SAITO, R.; TAKANO, Y.; KAMIYA, H. Central administration of a nitric oxide synthase inhibitor causes pressor responses via the sympathetic nervous system and the renin-angiotensin system in Wistar rats. **Neurosci. Lett.**, v. 245, p. 109-112, 1998.
- MORRISSON, J.H.; MOLLIVER, M.E.; GRZANNA, R.; COYLE, J.T. Noradrenergic innervation patterns in three regions of medial prefrontal cortex: an immunofluorescence characterization. **Brain Res. Bull.**, v. 4, p. 849-857, 1979.
- NEAFSEY, E.J. Prefrontal cortical control of the autonomic nervous system: anatomical and physiological observations. **Prog. Brain Res.**, v. 85, p. 147-165, 1990.
- NICOLLE, M.M.; BAXTER, M.G. Glutamate receptor binding in the frontal cortex and dorsal striatum of aged rats with impaired attentional set-shifting. **Eur. J. Neurosci.**, v. 18, p. 3335-3342, 2003.
- NOSAKA, S.; MURATA, K.; INUI, K.; MURASE, S. Arterial baroreflex inhibition by midbrain periaqueductal grey in anaesthetized rats. **Pflugers Arch**, v. 424, p. 266-275, 1993.

- NOSAKA, S. Modifications of arterial baroreflexes: obligatory roles in cardiovascular regulation in stress and poststress recovery. **Jpn. J. Physiol.**, v. 46, p. 271-288, 1996.
- NOSAKA, S.; MURATA, K. Somatosensory inhibition of vagal baroreflex bradycardia: afferent nervous mechanisms. **Am. J. Physiol.**, v. 257, p. 829-838, 1989.
- NOSAKA, S.; MURASE, S.; MURATA, K. Arterial baroreflex inhibition by gastric distension in rats: mediation by splanchnic afferents. **Am. J. Physiol.**, v. 260, p. 985-994, 1991.
- OWENS, N.C.; SARTOR, D.M.; VERBERNE, A.J.M. Medial prefrontal cortex depressor response: role of the solitary tract nucleus in rat. **Neuroscience**, v. 89, p. 1331-1346, 1999.
- OWENS, N.C.; VERBERNE, A.J.M. Medial prefrontal depressor response: involvement of the rostral and caudal ventrolateral medulla in the rat. **J. Autonomic Nerv. Syst.**, v. 78, p. 86-93, 2000.
- OWENS, N.C.; VERBERNE, A.J.M. Regional haemodynamic responses to activation of the medial prefrontal cortex depressor region. **Brain Res.**, v. 919, p. 221-231, 2001.
- PAXINOS, G.; WATSON, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates**. 2.ed. Sydney, Academic Press, 1986.
- PIRCH, J. H.; TURCO, K.; RUCKER, H. K. A role for acetylcholine in conditioning-related responses of rat frontal cortex neurons: microiontophoretic evidence. **Brain Res.**, v. 586, p. 19-26, 1992.

PRAST, H.; TRAN, M.H.; FISCHER, H.; PHILIPPU, A. Nitric oxide-induced release of acetylcholine in the nucleus accumbens: role of cyclic GMP, glutamate, and GABA. **J. Neurochem.**, v. 71, p. 266-273, 1998.

REIS, D.J.; LEDOUX, J.E. Some central neural mechanisms governing resting and behaviorally coupled control of blood pressure. **Circulation**, v.76, p.12-19, 1987.

RESSTEL, L.B.M.; FERNANDES K.B.P.; CORRÊA, F.M.A. Medial prefrontal cortex modulation of the baroreflex parasympathetic component in the rat. **Brain Res.**, v. 1015, p. 136-144, 2004.

RESSTEL, L.B.M., FERNANDES K.B.P, CORRÊA, F.M.A. Alfa-adrenergic and muscarinic cholinergic receptors are not involved in the modulation of the parasympathetic baroreflex by the medial prefrontal cortex in rats. **Life Sci.**, v. 77, p. 1441-1451, 2005.

ROOM, P.; RUSSCHEN, F.T.; GROENEWEGEN, H.J.; LOHMAN, A.H.M. Efferent connections of the prelimbic (area 32) and infralimbico (area 25) cortices: an anterograde tracing study in the cat. **J. Comp. Neurol.**, v. 89, p. 40-55, 1985.

ROOZENDAAL, B.; KOOLHAAS, J.M.; BOHUS B. Central amygdala lesions affect behavioral and autonomic balance during stress in rats. **Physiol. Behav.**, v. 50, p. 777-781, 1991 (a).

ROOZENDAAL, B.; KOOLHAAS, J.M.; BOHUS B. Attenuated cardiovascular, neuroendocrine, and behavioral responses after a single footshock in central amygdaloid lesioned male rats. **Physiol. Behav.**, v. 50 (4), p. 771-781, 1991 (b).

ROSE, J.E.; WOOLSEY, C.N. The orbitofrontal cortex and its connections with the mediodorsal nucleus in rabbit, sheep and cat. **Research Publications of the Association of Nervous and Mental Disease**, v. 27, p. 210-232, 1948.

SAPER, C.B. Reciprocal parabrachial-cortical connections in the rat. **Brain. Res.**, v. 242, p. 33-40, 1982.

SARTER, M.; MARKOWITSCH, H.J. Collateral innervation of the medial and lateral prefrontal cortex by amygdaloid, thalamic, and brain-stem neurons. **J. Comp. Neurol.** v. 224, p. 445-460, 1984.

SCHLOR, K.H.; STUMPF, H.; STOCK, G. Baroreceptor reflex during arousal induced by electrical stimulation of the amygdala or by natural stimuli. **J. Auton. Nerv. Syst.**, v. 10, p. 157-165, 1984.

SESACK, S.R.; DEUTCH, A.Y.; ROTH, R.H.; BUNNEY, B.S. Topographical organization of the efferent projections of the medial prefrontal cortex in the rat: an anterograde tract-tracing study with Phaseolus vulgaris leucoagglutinin. **J. Comp. Neurol.**, v. 290, p. 213-242, 1989.

SCHWABER, J.S.; KAPP, B.S.; HIGGENS, G.A.; RAPP, P.R. Amygdaloid and basal forebrain direct connections with the nucleus solitary tract and dorsal motor nucleus. **J. Neurosci.**, v.2, p.1424-1438, 1982.

SMOLENSKI, A.; BURKHARDT, A.M.; EIGENTHALER, M.; BUTT, E.; GAMBARYAN, S.; LOHMANN, S.M.; WALTER, U. Functional analysis of cGMP-dependent protein kinases I and II as mediators of NO/cGMP effects. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.**, v. 358, p. 134-139.

- SPYER, K.M. The central nervous organization of reflex circulatory control. In: Loewy, A.D.; Spyer, K.M. eds. **Central regulation of autonomic functions**; New York, Oxford University Press; 1990.
- SU, D.F.; CERUTTI, C.; BARRES, C.; JULIEN, C.; VINCENT, M.; PAULTRE, C.; SASSARD, J. Arterial baroreflex control of heart period is not related to blood pressure variability in conscious hypertensive and normotensive rats. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**, v. 19, p. 767-776, 1992.
- TAKAGISHI, M.; CHIBA, T. Efferent projections of the infralimbic (area 25) region of the medial prefrontal cortex in the rat: an anterograde tracer PHA-L study. **Brain Res.**, v. 566, p. 26-39, 1991.
- TAVARES, R.T.; ANTUNES-RODRIGUES, J.; CORRÊA, F.M.A. Pressor effects of electrical stimulation of the medial prefrontal cortex in unanesthetized rats. **J. Neurosci. Res.**, v. 77, p. 613-620, 2004.
- VAN DER KOOY, D.; KODA, L.Y.; MCGINTY, J.F.; GENFER, C.R.; BLOOM, F.E. The organization of projections from the cortex, amygdala and hypothalamus to the nucleus of the solitary tract in rat. **J. Comp. Neurol.**, v. 224, p.1-24, 1984.
- VERBERNE, A.J.M.; LEWIS, S.J.; WORLAND, P.J.; BEART, P.M.; JARROT, B.; CHRISTIE, M.J.; LOUIS, W.J. Medial prefrontal cortical lesion modulate baroreflex sensitivity in the rat. **Brain Res.**, v. 426, p. 243-249, 1987.
- VERBERNE, A.J.M.; LEWIS, S.J.; JARROT, B.; LOUIS, W.J. Medial prefrontal cortical lesion and baroreflex heart rate reflex sensitivity in the spontaneously hypertensive rat. **J. Hypertens.**, v. 6, p. 123-127, 1988.

- VERBERNE, A.J.M. Medullary synpathoexcitatory neurons are inhibited by action of the medial prefrontal cortex in rat. **Am. J. Physiol.**, v. 270, p. 713-719, 1996.
- VERBERNE, A.J.M. AND OWENS N.C. Cortical modulation of the cardiovascular system. **Prog. Neurobiol.**, v. 54, p. 149-168, 1998.
- VERTES, R.P. Differential projections of the infralimbic and prelimbic cortex in the rat. **Synapse**, v. 51, p. 32-58, 2004.
- VIARD, E.; SAPRU, H.N. Cardiovascular responses to activation of metabotropic glutamate receptors in the nTS of the rat. **Brain Res.**, v. 952, p. 308-321, 2002.
- VINCENT, S.R.; KIMURA, H. Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain. **Neurosci.**, v. 46, p. 755-784, 1992.
- WANG, S.C.; BORISON, H.L. An analysis of the carotid sinus cardiovascular reflex mechanism. **Am. J. Physiol.**, v. 150, p. 712-721, 1947.
- WANG, X.; ROBINSON, P. J. Cyclic GMP-dependent protein kinase and cellular signaling in the nervous system. **J. Neurochem.**, v. 68, p. 443-456, 1997.
- WOOD, J.; GARTHWAITE, J. Models of the diffusional spread of nitric oxide: implications for neural nitric oxide signalling and its pharmacological properties. **Neuropharmacology**, v. 33, p. 1235-1244, 1994.
- ZHANG, X.; ABDEL-RAHMAN, A.A.; WOOLLES, W.R. Selective sensitization by L-glutamate of baroreflex-mediated bradycardia following microinjection into the rostral ventrolateral medulla. **Brain Res.**, v. 520, p. 141-150, 1990.

ZHANG, H.Q.; FAST, W.; MARLETTA, M.A.; MARTASEK, P.; SILVERMAN, R.B.
Potent and selective inhibition of neuronal nitric oxide synthase by N omega-propyl-L-arginine. **J. Med. Chem.**, v. 40, p. 3869-3870, 1997.

ZILLES, K.; WREE, A. Cortex: area and laminar structure. In: **The Rat Nervous System**, p. 649-685. Ed. G. Paxinos. Academic Press: New York, 1985.

APÊNDICE

Tabelas

Tabela 1. Média \pm erro padrão dos valores de pressão arterial (Δ PAM, mmHg) induzidos pela administração de L-glu no vCPFM de ratos não anestesiados nas deferentes áreas que o compõem e em diferentes doses. One-way ANOVA (doses de 9, 27, 81 e 150 nmol) and teste t de Student (dose de 300 nmol).

Dose/ área	infralimbico	prélimbico	dorsal penduncular	p/ F ou t [#]
9 nmol/ 0,2 μ l	0,9 \pm 0,5	1,4 \pm 0,1	1,1 \pm 0,7	0,9/ 0,1
27 nmol/ 0,2 μ l	9,6 \pm 1,2	9,8 \pm 2,2	12,3 \pm 3,1	0,6/ 0,4
81 nmol/ 0,2 μ l	17,3 \pm 2,4	18,2 \pm 1,8	19,6 \pm 1,4	0,8/ 0,2
150 nmol/ 0,2 μ l	24 \pm 4,7	22,1 \pm 2,4	20,3 \pm 3,6	0,8/ 0,1
300 nmol/ 0,2 μ l	21,3 \pm 5,7	23 \pm 2,7	xxxxxxxxxxxxxxx	0,8/ 0,2 [#]

Tabela 2. Média \pm erro padrão dos valores de freqüência cardíaca (Δ FC, bpm) induzidos pela administração de L-glu no vCPFM de ratos não anestesiados nas deferentes áreas que o compõem e em diferentes doses. One-way ANOVA (doses de 9, 27, 81 e 150 nmol) and teste t de Student (dose de 300 nmol).

Dose/ área	infralimbico	prélimbico	dorsal penduncular	p/ F ou t [#]
9 nmol/ 0,2 μ l	3,5 \pm 0,8	7,5 \pm 2,5	5 \pm 1,1	0,9/ 0,1
27 nmol/ 0,2 μ l	20,3 \pm 4,3	19,5 \pm 5,7	10 \pm 4,3	0,6/ 0,4
81 nmol/ 0,2 μ l	27,6 \pm 5,5	32 \pm 4,8	31,7 \pm 15,8	0,8/ 0,2
150 nmol/ 0,2 μ l	43,5 \pm 10	45 \pm 6,2	20,3 \pm 9,1	0,8/ 0,1
300 nmol/ 0,2 μ l	41,6 \pm 6,7	35 \pm 9,1	xxxxxxxxxxxxxxx	0,8/ 0,2 [#]

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)