

Universidade de São Paulo

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Programa de Pós-Graduação em Fisiologia

**Mecanismos angiotensinérgicos envolvidos na  
modulação do componente simpato-excitatório do  
quimiorreflexo no Bulbo Rostral Ventrolateral e no  
Núcleo do Trato Solitário de ratos.**

**TESE DE DOUTORADO**

Luciano Gonçalves Fernandes

**Ribeirão Preto**

**2006**

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

Luciano Gonçalves Fernandes

**Mecanismos angiotensinérgicos envolvidos na  
modulação do componente simpato-excitatório do  
quimiorreflexo no Bulbo Rostral Ventrolateral e no  
Núcleo do Trato Solitário de ratos.**

Tese de doutorado apresentada ao programa de Pós-graduação do Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Benedito H. Machado

*“ Nunca cessaremos de explorar, e o fim de toda nossa exploração será chegar onde começamos, e conhecer o lugar pela primeira vez.”*

(T.S. Elliot, “Little Gidding”)



**AGRADECIMENTOS:**

- Aos meus pais, Luiz Carlos e Zoraide, por todo o apoio e dedicação;
- Aos meus irmãos Sandro, Cristina e Fernando, pelo companherismo;
- Aos meus grande amigos: Renato, Jalile, Giovani, Luis Felipe e Carlos Eduardo, convívio e pela amizade verdadeira;
- Ao Prof. Dr. Benedito H. Machado, pelos ensinamentos proferidos ao longo destes anos;
- Aos professores constituíntes da banca: Prof. Dr. Fernando Morgan de Aguiar Corrêa, Prof. Dra. Lisete Compnagno Michelini, Prof. Dra. Maria Cristina de Oliveria Salgado e Prof. Dr. Marco Antônio P. Fontes, pelas sugestões que, em muito, melhoraram o trabalho apresentado;
- Aos companheiros de laboratório: Leni Gomes Heck Bonagamba, Mauro de Oliveira, Jaci A. Castania, Carlos Alberto Aguiar, Josiane de Campos Cruz, Valdir Braga, Alex Lopes Bracciali, Daniel Zoccal, Vagner Roberto Antunes, Gisella Pajolla, KarinWeissheimer, Erica Granjeiro, Renato Soriano, por todo o auxílio e pelas discussões acerca do presente trabalho;
- Aos Bioteristas Leonardo Fidelis Filho e Eduardo Gomes, pela atenção e cuidado com os animais de experimentação;
- Ao Rubens Fernando de Melo, pela confecção das lâminas histológicas do presente estudo;
- À Elisa, Fernando, Cláudia e Carlos, membros da secrearia do departamento, por toda a boa vontade à transposição dos entraves burocráticos;
- Aos animais por serem puros e se doarem à pesquisa científica.

## Índice

<b>I – RESUMO .....</b>	<b>6</b>
<b>II – ABSTRACT .....</b>	<b>9</b>
<b>III– INTRODUÇÃO.....</b>	<b>12</b>
<b>IV – OBJETIVOS.....</b>	<b>24</b>
<b>V – MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>26</b>
<b>VI - PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS.....</b>	<b>39</b>
<b>VII – RESULTADOS.....</b>	<b>46</b>
<b>VIII– DISCUSSÃO.....</b>	<b>154</b>
<b>IX – BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>172</b>
<b>X - APÊNDICE .....</b>	<b>187</b>
<b>XI – PUBLICAÇÃO.....</b>	<b>209</b>

**I – RESUMO**

A ativação do quimiorreflexo promove, dentre outras respostas, aumento da atividade eferente simpática que se traduz em aumento da pressão arterial. Vários estudos na literatura mostram que diversas áreas do sistema nervoso central, como o núcleo do trato solitário (NTS) e o bulbo rostral-ventrolateral (RVLM) estão envolvidas na neurotransmissão e/ou neuromodulação da resposta simpato-excitatória do quimiorreflexo. Estudos de nosso laboratório têm demonstrado que a resposta pressora à ativação do quimiorreflexo foi ser bloqueada pelo antagonismo de receptores do neurotransmissor L-Glutamato no NTS ou no RVLM. Diversos estudos têm demonstrado que a angiotensina participa da neurotransmissão excitatória dos núcleos que fazem parte das vias neurais do quimiorreflexo. No presente estudo avaliamos a participação de mecanismos angiotensinérgicos na neuromodulação do componente simpato-excitatório do quimiorreflexo no NTS e no RVLM, utilizando diferentes abordagens metodológicas: 1) Estudos de microinjeções do Sartran (antagonista dos receptores de angiotensina) no RVLM de animais acordados, onde observamos que o bloqueio bilateral dos receptores de angiotensina do RVLM atenuou a resposta pressora à ativação do quimiorreflexo em animais acordados, mostrando uma participação destes receptores na neuromodulação da via simpato-excitatória do quimiorreflexo no RVLM. Observamos também que o bloqueio bilateral dos receptores de angiotensina do RVLM não promoveu queda da pressão arterial basal em animais acordados; Este conjunto de resultados nos permite concluir que a angiotensina e seus receptores participam da neuromodulação da resposta simpato-excitatória do quimiorreflexo no RVLM; 2) estudos eletrofisiológicos em neurônios do NTS dissociados mecanicamente, onde documentamos que a aplicação exógena de angiotensina II promove aumento, redução ou ausência de alteração tanto na

amplitude quanto na frequência das correntes excitatórias e inibitórias pós-sinápticas espontâneas; e 3) experimentos eletrofisiológicos em neurônios do NTS contidos em fatias horizontais do tronco cerebral, os quais sugerem que a aplicação exógena de angiotensina II promove três padrões de respostas eletrofisiológicas para os eventos excitatórios espontâneos e para eventos excitatórios evocados pela estimulação elétrica do Trato Solitário: excitação, inibição ou ausência de alteração. Os resultados dos experimentos de eletrofisiologia documentarem a presença e diferentes padrões de respostas à ativação dos receptores de angiotensina no NTS, nos permitindo sugerir que a angiotensina pode promover uma grande diversidade de efeitos nos neurônios do NTS. 4) Experimentos em animais acordados sugerem que os receptores de angiotensina do NTS não participam da resposta simpatoexcitatória do quimiorreflexo em ratos acordados, pois o bloqueio dos receptores de angiotensina nesse núcleo não alterou a resposta pressora do quimiorreflexo.

**II – ABSTRACT**

Chemoreflex activation in awake rats produces an increase in the sympathetic efferent activity that in turn causes a rise in arterial pressure. Several studies showed that RVLM and NTS are involved in the neurotransmission or neuromodulation of the sympathoexcitatory response to chemoreflex activation. Studies from our laboratory showed that the pressor response to chemoreflex activation was not blocked by glutamatergic antagonism in the NTS or RVLM. Moreover, several studies suggest that angiotensin play a role on the excitatory neurotransmission in several nuclei involved in the chemoreflex pathways. In the present study we evaluated the involvement of angiotensinergic modulatory mechanisms in the NTS and RVLM on the sympathoexcitatory component to chemoreflex activation, using different experimental approaches: 1) Bilateral micronection of sarthran into the RVLM of awake animals attenuates the pressor response to chemoreflex activation, showing that the angiotensin receptors of the RVLM are involved on the neuromodulation of the sympathoexcitatory component to chemoreflex activation; 2) Patch-clamp experiments performed in mechanically dissociated commissural NTS neurons have shown that Angiotensin II application produces increase, decrease or no change in the amplitude or frequency on the spontaneous EPSC or ISPC; 3) Patch-clamp experiments performed in horizontal slices from the commissural NTS have shown that angiotensin II application to commissural NTS neurons produces increase, decrease, or no change in the frequency of spontaneous EPSCs and on the amplitude of evoked EPSC to the solitary tract stimulation. 4) Our data suggest also that the angiotensin receptors of the NTS are not involved in the neuromodulation of the sympathoexcitatory response of the chemoreflex, since the

bilateral blockade of these receptors with Sarthran did not change the pressor response to chemoreflex activation.

Our data allow us to suggest that angiotensin receptors located in the RVLM are involved in the neuromodulation of the sympathoexcitatory component to chemoreflex activation, whereas the role of these receptors located into the NTS seems not to be important to chemoreflex pathways, even though the patch-clamp results have shown several kind of neuronal responses secondary to angiotensin II application to commissural NTS neurons.



### **III- INTRODUÇÃO**

A regulação do sistema cardiovascular nos mamíferos envolve diversos mecanismos fisiológicos, os quais aumentam a oferta de sangue para os tecidos em atividade e realizam a redistribuição do sangue frente a situações que podem variar do repouso até casos extremos, como o exercício físico intenso. Esta regulação tem como objetivo preservar um fluxo sanguíneo adequado para todos os tecidos, particularmente para o cérebro e para o coração. Os ajustes circulatórios são feitos alterando-se o débito cardíaco, o diâmetro dos vasos de resistência (arteríolas) ou alterando a quantidade de sangue armazenada nos vasos de capacitância (veias). Esta regulação pode ser feita por meio de hormônios lançados na corrente sanguínea, como a vasopressina e a angiotensina, ou mecanismos neurais. Os mecanismos neurais de controle do sistema cardiovascular caracterizam-se por promoverem ajustes rápidos e envolvem a participação de sensores periféricos, os quais transmitem as informações para regiões específicas do sistema nervoso central, onde ocorre neurotransmissão e/ou integração destas informações, ocorrendo assim, alterações nas atividades eferentes simpática e parassimpática. Dentre os mecanismos neurais mais importantes para o controle da função cardiovascular destacam-se o barorreflexo, o reflexo cárdio-pulmonar e o quimiorreflexo.

O quimiorreflexo consiste em um importante mecanismo neural envolvido no controle cardiovascular e respiratório. Os quimiorreceptores periféricos, localizados nos corpos carotídeos, são estruturas especializadas em detectar alterações nas pressões parciais de oxigênio e gás carbônico bem como variações no pH (Biscoe e cols., 1967; 1969; Biscoe e Duchon, 1990). Os quimiorreceptores constituem-se de dois tipos celulares distintos: as células quimiossensíveis propriamente ditas (células do tipo I) e as

células de sustentação (células do tipo II). As células quimiossensíveis, quando estimuladas, deflagram potenciais de ação que se propagam pelo nervo do seio carotídeo em direção ao sistema nervoso central (González e cols., 1995). Estas aferências realizam a sua primeira sinapse no núcleo do trato solitário [(NTS) (Mifflin, 1992, Ciriello e cols., 1994)].

A ativação do quimiorreflexo por injeção intravenosa de cianeto de potássio (KCN), ocorre essencialmente por estimulação dos quimiorreceptores periféricos (Franchini e Krieger, 1993; Haibara e cols., 1995). As respostas cardiovasculares induzidas pela administração de KCN resultam da ativação da via simpato-excitatória, resultando em uma resposta pressora, a qual é bloqueada por administração intravenosa de prazosin (antagonista  $\alpha$ -1 adrenérgico), bem como ativação da via parassimpato-excitatória, que por sua vez resulta em bradicardia, a qual é bloqueada com a administração de metil-atropina, um antagonista de receptor colinérgico (Franchini e Krieger, 1993; Haibara; 1996).

A via parassimpato-excitatória do quimiorreflexo, provavelmente, faz-se presente por uma projeção do NTS para o núcleo ambíguo (NA) e neurônios deste enviam projeções para o coração, que são as responsáveis pela bradicardia característica da ativação do quimiorreflexo (Haibara e cols., 1995); Enquanto que a via simpato-excitatória do quimiorreflexo depende da ativação de projeções excitatórias diretas e/ou indiretas do NTS para a região rostro-ventrolateral do bulbo (RVLM). Nesta região do bulbo localizam-se os neurônios pré-motores simpáticos, os quais emitem projeções excitatórias para os neurônios pré-ganglionares simpáticos localizados na coluna intermédio-lateral da medula espinal (CIL) (Guyenet, 1990).

A ativação do quimiorreflexo em animais não-anestesiados, além das respostas cardiovasculares de aumento da pressão arterial e bradicardia, apresenta também uma resposta ventilatória de taquipnéia e um importante componente comportamental de exploração do ambiente (Haibara e cols., 1995). No que tange às respostas cardiovasculares, Haibara e cols. (1995), realizaram estudos que evidenciaram os mecanismos envolvidos nas respostas cardiovasculares do quimiorreflexo: 1) a bradicardia do quimiorreflexo foi bloqueada com a administração intravenosa de metil-atropina, mostrando que esta resposta é essencialmente mediada pelo parassimpático; 2) a resposta pressora do quimiorreflexo foi praticamente bloqueada pela administração de prazosin, evidenciando que esta resposta é essencialmente simpática. Neste mesmo estudo, observaram ainda que a bradicardia não era secundária à elevação da pressão arterial (PA), pois esta não sofreu alteração após o bloqueio da resposta pressora com prazosin. Estudos de Haibara e cols. (1995) mostraram, ainda, que a microinjeção de AP-5 (antagonista de receptores de NMDA) no NTS de ratos acordados reduziu, de forma concentração-dependente, a bradicardia em resposta à ativação do quimiorreflexo, indicando que o componente parassimpato-excitatório do quimiorreflexo é mediado por receptores NMDA no NTS. Entretanto, não ocorreram alterações na resposta pressora do quimiorreflexo com a microinjeção de AP-5 no NTS, sugerindo que o componente simpato-excitatório do quimiorreflexo seria mediado por outros subtipos de receptores que não os NMDA. Em estudos subseqüentes, Haibara e cols. (1999) mostraram que a microinjeção de DNQX (antagonista de receptores não-NMDA) no NTS de ratos acordados promoveu uma significativa redução na magnitude da resposta pressora do quimiorreflexo, a despeito de um aumento na linha de base da pressão arterial. Uma

possibilidade, sugerida pelos autores, para a redução da resposta pressora do quimiorreflexo nestes experimentos, foi o aumento na linha de base da PA após a microinjeção do DNQX, visto que esta resposta foi apenas atenuada e não abolida pela microinjeção de DNQX. Portanto, o componente simpato-excitatório do quimiorreflexo não seria mediado por receptores não-NMDA. Neste mesmo estudo, Haibara e cols. (1999) realizaram a microinjeção de ácido quinurênico (antagonista não-seletivo de receptores de aminoácido excitatório) ou de MCPG (antagonista de receptores metabotrópicos) no NTS de ratos acordados e mostraram que a resposta pressora do quimiorreflexo não foi bloqueada, sugerindo que os receptores de aminoácido excitatório (AAE) não estariam efetivamente envolvidos na neurotransmissão do componente simpato-excitatório do quimiorreflexo no NTS.

Em estudos subseqüentes de nosso laboratório, consideramos que a neurotransmissão do componente simpato-excitatório do quimiorreflexo seria mediada por outros tipos de neurotransmissores que não o L-glutamato. Neste sentido, Zhang e cols. (2000) estudaram a participação de receptores NK<sub>1</sub> de substância P no componente simpato-excitatório do quimiorreflexo e mostraram que a microinjeção de WIN (antagonista de receptores NK-1 de substância P) no NTS não alterou a resposta pressora do quimiorreflexo. Estudos de Paula e Machado (2001) avaliaram o envolvimento dos receptores purinérgicos A<sub>1</sub> de adenosina no componente simpato-excitatório do quimiorreflexo, e mostraram que a microinjeção de seu antagonista (DPCPX) no NTS de ratos acordados também não bloqueou a resposta pressora do quimiorreflexo. Estudos de Pimentel e cols. (2003), mostraram que a microinjeção de glicina no NTS não causa alteração no componente simpato-excitatório do quimiorreflexo, assim como estudos de

Callera e cols. (1999) mostraram que a microinjeção de agonistas GABA<sub>A</sub> (muscimol) ou GABA<sub>B</sub> (baclofen) também não promoveram alterações significativas no componente simpato-excitatório do quimiorreflexo. Além disso, Callera e cols. (1997) avaliaram a participação dos receptores serotoninérgicos 5HT<sub>3</sub> nas respostas cardiovasculares do quimiorreflexo, por meio da microinjeção de 2-metil-serotonina (agonista 5HT<sub>3</sub>) no NTS de ratos acordados e mostraram que este procedimento causou significativa redução na bradicardia do quimiorreflexo, mas também não alterou o componente simpato-excitatório do quimiorreflexo.

Diversos estudos têm mostrado que a angiotensina II participa na regulação central da função cardiovascular em diversas regiões do sistema nervoso central (Casto e Phillips, 1984; Diz e cols., 1984; Rettig e cols., 1986; Phillips, 1987; Michelini e Bonagamba, 1990, Sangaleti e cols., 2004) e seus receptores têm sido identificados em diversas regiões do SNC (Mendelsohn e cols., 1984 e 1988). Healy e cols. (1989) mostraram que o NTS contém alta densidade de receptores AT<sub>1</sub> de angiotensina II tanto pré-sinápticamente, nas aferências vagais e do nervo do seio carotídeo, quanto em interneurônios. Do ponto de vista funcional, estudos de Paton e Kasparov (1999 e 2000) mostraram que a microinjeção de baixas concentrações de angiotensina II no NTS de ratos potencializa a neurotransmissão do quimiorreflexo no NTS. Além disso, em estudos subsequentes (Kasparov e Paton, 1999) evidenciaram que a angiotensina poderia potencializar as transmissões sinápticas excitatórias em subpopulações neuronais do NTS que fazem parte das vias neurais do quimiorreflexo, mostrando assim uma participação neuromodulatória da angiotensina nas sinapses das vias neurais do quimiorreflexo. Sob o ponto de vista eletrofisiológico, embora existam poucos estudos relacionados aos efeitos

celulares da angiotensina II nas áreas envolvidas com a neurotransmissão do componente simpato-excitatório do quimiorreflexo, podemos destacar ao menos dois importantes estudos neste campo: estudos de Barnes e cols. (2003) mostraram que a aplicação de angiotensina II em fatias horizontais do NTS, promove despolarização da membrana, redução da resistência da membrana neuronal, potenciação da amplitude dos potenciais excitatórios pós-sinápticos (PEPS) evocados em resposta à ativação do TS, redução da latência dos PEPS, além de promover salvas de potenciais de ação de alta frequência. Desta forma, caso a angiotensina II seja liberada nas sinapses pertencentes às vias neurais da via simpato-excitatória do quimiorreflexo, poderíamos sugerir a participação da mesma na neurotransmissão neste nível de integração das informações aferentes dos quimiorreceptores periféricos. Estudos de Kasparov e Paton (1999) realizaram estudos em fatias coronais do tronco cerebral onde evidenciaram que a aplicação de angiotensina II promove potenciação das vias neurais relacionadas aos reflexos cardiovasculares, observaram ainda que a angiotensina II promove, em neurônios do NTS, diversos efeitos celulares relacionados à excitabilidade destas células. Este efeito também foi observado no estudo de Barnes e cols. (2003).

No que diz respeito ao controle cardiovascular, a angiotensina desempenha uma importante função na regulação fisiológica do tônus vascular e da pressão arterial, bem como em condições patológicas como a hipertensão arterial. No entanto, os mecanismos centrais pelos quais a angiotensina exerce suas ações pressoras ainda não foram bem esclarecidos (Kooner e cols., 1997). A existência de um sistema renina-angiotensina (SRA) cerebral já é bem conhecido e todos os componentes deste sistema são encontrados no cérebro (Unger e cols., 1988; Phillips e Summers, 1998). Existem ainda

evidências de que o SRA cerebral contribui para o desenvolvimento da hipertensão (Phillips e Summers, 1998). Estudos anteriores têm mostrado que a resposta pressora à administração intravenosa de angiotensina é significativamente atenuada após o bloqueio ganglionar com hexametônio (Fuji e Vanter, 1985), sugerindo a angiotensina II possui ações centralmente mediadas e que o sistema nervoso simpático contribui para a ação pressora da angiotensina II. No que concerne às ações centrais da angiotensina II, Gutkind e cols. (1988) evidenciaram que a densidade de receptores AT<sub>1</sub> no NTS de animais espontaneamente hipertensos é maior do que a densidade destes receptores em animais normotensos e, a este respeito, um grande número de trabalhos tem relatado que o desenvolvimento de hipertensão em modelos animais geneticamente modificados, está relacionado ao aumento da concentração de angiotensina cerebral (Phillips e cols., 1977; Campbell e cols., 1995; Moroshita e cols., 1995; Teruya e cols., 1995). Weiss e cols. (2001) mostraram que a administração intravenosa de antagonista de receptores AT<sub>1</sub> de angiotensina II (telmisartan) promove redução significativa da resposta pressora à microinjeção de angiotensina II intracérebro-ventricular em ratos acordados e a análise do fluido cérebro-espinhal evidenciou que o antagonista AT<sub>1</sub> atravessa a barreira hematoencefálica. Este resultado é confirmado por estudos de autorradiografia *in vitro*, que mostram que o losartan, administrado por via intravenosa, atravessa a barreira hematoencefálica e atua nos receptores AT<sub>1</sub> no sistema nervoso central (SNC) (Song e cols., 1991; Zhuo e cols., 1994).

Uma outra região bulbar que tem despertado interesse no estudo da resposta simpato-excitatória do quimiorreflexo é o bulbo ventrolateral rostral (RVLM), já que existem evidências que sugerem uma projeção direta do NTS para o RVLM (Ross e cols.,



1984; Urbanski e Sapru, 1988; Aicher e cols., 1996; Guyenet e Koshiya, 1992). Estudos de Sasaki e Sampney (1990) e Ito e Sved (1996 e 2000) mostraram que a microinjeção bilateral de sarile ou sartran (antagonistas não seletivos de receptores de angiotensina) no RVLM de ratos anestesiados, promoveu significativa redução da atividade eferente simpática para níveis semelhantes àqueles observados após a inibição do sistema nervoso simpático com a injeção intravenosa do bloqueador ganglionar clorisondamina, sugerindo que a angiotensina exerceria uma excitação tônica sobre os neurônios do RVLM e, conseqüentemente, uma importante função na manutenção da atividade eferente simpática. Estudos de Lima e cols. (1996) evidenciaram que a resposta pressora promovida pela microinjeção de angiotensina I no RVLM de ratos anestesiados foi significativamente reduzida pela microinjeção de A-779 [(antagonista seletivo de receptores de angiotensina (1-7)]. Estudos de Fontes e cols. (1997) mostraram que a microinjeção de angiotensina no RVLM de ratos acordados promoveu resposta pressora que foi bloqueada pela microinjeção prévia de sartran ou A-779 e, também, que a microinjeção destes antagonistas causou redução da pressão arterial média basal, mostrando assim que a angiotensina pode influenciar a atividade dos neurônios vasomotores do RVLM. Hirooka e cols. (1997) estudaram a participação dos subtipos de receptores de angiotensina nas respostas cardiovasculares promovidas pela microinjeção de angiotensina II e III no RVLM de coelhos anestesiados e mostraram que a resposta pressora promovida pela microinjeção de angiotensina II é mediada via receptores AT<sub>1</sub>. Tagawa e cols. (1999) mostraram ainda que a redução da pressão arterial média após o bloqueio dos receptores de angiotensina do RVLM com sarile, ocorre por meio de um mecanismo que é independente de sistemas gabaérgicos e glutamatérgicos.

Uma possibilidade interessante para a neurotransmissão do componente simpato-excitatório do quimiorreflexo que avaliamos neste estudo foi a participação da angiotensina e seus receptores, pois a ativação do quimiorreflexo, com KCN, em ratos acordados promove, além das resposta pressora e bradicárdica, um importante componente comportamental (Franchini e Krieger, 1993), que parece ser consequência da estimulação de áreas hipotalâmicas relacionadas com as respostas de defesa (Marshall, 1994). Considerando-se que a estimulação química ou elétrica destas áreas hipotalâmicas, relacionadas com as reações de defesa, aumenta a atividade simpática (Hilton, 1966; Silva-Carvalho e cols., 1993; 1995) pode-se sugerir que a resposta pressora à ativação do quimiorreflexo dependeria, ao menos em parte, de estimulação de áreas hipotalâmicas. Além disso, o núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN), que faz parte do sistema parvocelular, implicado em uma variedade de funções fisiológicas, recebe projeções diretas do NTS (Kannah e cols., 1989; Dampney, 1994). Existem consideráveis evidências de que o PVN é um sítio de integração entre as informações autonômicas, endócrinas e cardiovasculares (Martin e cols, 1991; Martin e Haywood 1992 e 1993). Estudos neuroanatômicos e eletrofisiológicos têm indicado que o PVN conecta-se reciprocamente com áreas do sistema nervoso central envolvidas no controle das funções cardiovasculares (Swanson e Sawchenko, 1983; Kannah e cols., 1989; Luitten e cols., 1985; Martin e cols, 1991). Estudos de nosso laboratório (Olivan e cols., 2001) demonstraram que o PVN exerce uma função importante nas respostas cardiovasculares do quimiorreflexo, visto que a lesão eletrolítica bilateral deste núcleo quase aboliu a resposta pressora do quimiorreflexo em ratos acordados. Anteriormente, estudos de Ciriello e Caralesu (1980) demonstraram que a lesão bilateral do PVN reduz os níveis

basais de pressão arterial média em ratos espontaneamente hipertensos SHR. Estudos de Silva-Carvalho e cols. (1995) e Rocha e cols. (2003) sugeriram que o hipotálamo poderia exercer uma ação facilitatória sobre as vias neurais do quimiorreflexo, devido à ativação de receptores de angiotensina nos neurônios quimiossensíveis do NTS. O PVN pode, ainda, alterar a atividade simpática eferente através de uma projeção direta para o RVLM. Estudos neuroanatômicos (Luiten e cols., 1984; Dampney, 1994; Shafton e cols., 1998) demonstram a existência de uma via que se projeta do PVN para o RVLM e, além disso, estudos funcionais (Yang e Coote, 1998) demonstram que a estimulação do PVN altera a atividade dos neurônios vasomotores retículo-espinhais do RVLM, aumentando a atividade eferente simpática.

Os neurônios do RVLM projetam-se densamente para os neurônios pré-ganglionares simpáticos da CIL (Dampney, 1994) e, portanto, as projeções PVN-RVLM podem contribuir para a modulação da atividade eferente simpática, fato que pode ser ainda mais relevante ao processamento do componente simpato-excitatório do quimiorreflexo. No que concerne à participação da angiotensina II nestas vias neurais oriundas do PVN que podem alterar a atividade eferente simpática, Tagawa e Dampney (1999) demonstraram que estas importantes projeções do PVN para o RVLM são, provavelmente, angiotensinérgicas, dado que a resposta pressora promovida pela microinjeção de bicuculina no PVN pode ser bloqueada pela micronejeção de antagonista AT<sub>1</sub> no RVLM ipsilateral. Ainda, projeções angiotensinérgicas oriundas de núcleos hipotalâmicos seriam importantes para a neuromodulação das respostas cardiovasculares do quimiorreflexo no NTS, dado que a ativação destes receptores do NTS parece exercer um efeito excitatório sobre as respostas cardiovasculares do quimiorreflexo (Rocha e

cols., 2003). Estas evidências, em conjunto com experimentos do nosso laboratório (Olivan e cols., 2001) mostrando o envolvimento do PVN nas respostas cardiovasculares do quimiorreflexo, levaram-nos a sugerir a possível participação de um componente angiotensinérgico na resposta pressora do quimiorreflexo. Embora existam evidências de que a angiotensina é um neuromodulador das respostas cardiovasculares no NTS e RVLM, existem também muitas evidências que apontam para a co-localização de neurotransmissores nos neurônios cardiovasculares do SNC (Dampney, 1994). Desta forma, neste estudo, realizamos experimentos para investigar a importância dos receptores de angiotensina II do RVLM e do NTS para o componente simpato-excitatório do quimiorreflexo.

#### **IV – OBJETIVOS**

- *Estudar as respostas cardiovasculares promovidas pela microinjeção de angiotensina II no NTS e no RVLM de ratos não-anestesiados.*
- *Avaliar a possível participação dos receptores de angiotensina II do NTS e do RVLM sobre o componente simpato-excitatório do quimiorreflexo em ratos não-anestesiados.*
- *Avaliar, utilizando-se de registros eletrofisiológicos de neurônios isolados e em fatias horizontais do tronco cerebral, os efeitos da angiotensina II sobre as neurotransmissões glutamatérgicas e GABAérgicas em neurônios do NTS comissural.*

## **V – MATERIAL E MÉTODOS**

## **A – Estudos em animais acordados:**

### **1-Animais:**

Neste trabalho utilizamos ratos Wistar com peso padronizado entre 290 e 310 gramas. Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central do Campus da USP de Ribeirão Preto e mantidos em caixas individuais, em ambiente climatizado com temperatura média de 22°C, ciclo de claro e escuro de 12 horas, alimentados com ração peletizada e água *ad libitum*. Todos os procedimentos cirúrgicos e experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP durante a reunião ordinária de 23 de Maio de 2003.

### **2 - Canulação de artéria e veia femoral:**

No dia anterior aos experimentos, realizamos as canulações de uma artéria e de uma veia femoral. As cânulas utilizadas foram confeccionadas com tubos de polietileno PE-10 (Clay Adams, Parsipanny, NJ, EUA) com comprimento de 4 a 5 cm, soldado com outro tubo de polietileno PE-50, com comprimento médio de 19 cm. Previamente à canulação, as cânulas de polietileno foram preenchidas com solução fisiológica e em seguida tiveram uma das suas extremidades livres obstruídas com um pino metálico. Após ser realizada anestesia com tribromoetanol [1mg/100g de peso, via i.p., (Aldrich Chemical Co. Inc., Milwaukee, EUA)], uma das cânulas foi dirigida para a aorta



abdominal, tendo-se como acesso a artéria femoral, ao passo que a extremidade da outra cânula foi acomodada no interior da veia femoral. Uma vez implantadas, as cânulas foram posicionadas no subcutâneo do animal e exteriorizadas na região interescapular e, então, fixadas por meio de fios de sutura. A cânula posicionada na artéria foi utilizada para registro da pressão arterial pulsátil e da frequência cardíaca, com derivações eletrônicas para registro da pressão arterial média. A cânula venosa, por sua vez, foi utilizada para a administração sistêmica de drogas.

### ***3- Estimulação dos quimiorreceptores periféricos:***

No dia seguinte ao da canulação da artéria e da veia femoral, realizamos o protocolo de estimulação dos quimiorreceptores periféricos, usando uma solução de cianeto de potássio (KCN) a concentração única de 40 µg/0,1 mL/rato, a qual foi administrada através da cânula previamente implantada na veia femoral acoplada a uma cânula extensora constituída de um tubo de polietileno PE-50 com volume interno de aproximadamente 0,2 mL. O uso desta cânula visou conferir ao animal o mínimo estresse possível, pois nos possibilitou administrar drogas sem que fosse necessário um contato demasiadamente íntimo com o mesmo. A eficiência da cânula venosa foi testada com a injeção de fenilefrina, um vasoconstrictor.

O KCN é uma droga capaz de estimular o quimiorreflexo e isto se dá devido a sua interferência na utilização de oxigênio pelos tecidos, pois inibe a ação da enzima citocromo-oxidase da cadeia respiratória citocromática. Desta feita, produz-se um déficit energético celular associado à indisponibilidade de oxigênio, promovendo hipóxia

citotóxica, levando portanto, à ativação dos quimiorreceptores periféricos (Biscoe e cols., 1969).

***4-Implante de cânulas guia dirigidas para os núcleo do trato solitário e para o bulbo rostro-ventro-lateral:***

Com o auxílio de um aparelho estereotáxico (David-Kopf, Tujunga, CA, EUA), foram implantadas cânulas-guia em direção ao NTS e ao RVLM, por meio das quais microinjeções foram realizadas. As cânulas de aço inoxidável, que confeccionamos a partir de agulhas hipodérmicas (25 x 0,7 mm), possuem o comprimento de 15 mm, as quais foram fixadas no suporte da torre do estereotáxico. Após ser anestesiado com tribromoetanol, o animal teve a região superior da cabeça tricotomizada sendo então acomodado no aparelho estereotáxico e, por meio de duas barras auriculares, a cabeça do animal foi fixada. Em seguida, realizamos um botão anestésico na região superior da cabeça (região do escalpo) utilizando-se de lidocaína com vasoconstritor, afim de minimizar o sangramento no local da incisão. Realizamos, então, assepsia criteriosa da pele utilizando-se de solução de álcool iodado e, logo após, foi realizada uma incisão abrangendo-se a pele e tecido celular subcutâneo, expondo a região superior do crânio exatamente subjacente à incisão, a qual foi tratada com solução fisiológica e água oxigenada, afim de realizar completa limpeza da área. A torre do estereotáxico foi posicionada em angulação zero e a cabeça do animal ajustada até que os pontos Bregma e Lâmbda estivessem localizados no mesmo plano horizontal. Em seguida, realizamos as leituras dos parâmetros ântero-posterior (AP), lateral (L) e dorso-ventral (DV), tomando-se como referência o bregma ou o lâmbda, dependendo do núcleo. Com auxílio das

informações de um atlas estereotáxico (Paxinos e Watson, 1986), determinamos os pontos de introdução de cânulas guia e nestes foram realizadas trepanações na calota craniana utilizando-se de broca odontológica esférica acoplada a um motor de baixa rotação. Através dos orifícios produzidos pelas trepanações, introduzimos as cânulas guia, atentando-se para que a extremidade inferior da cânula estivesse localizada 1 mm acima do limite dorsal da área a ser estudada. A localização da extremidade das cânulas foi obtida a partir de parâmetros previamente estabelecidos em nosso laboratório para o RVLM (-3,2 AP;  $\pm$ 1,8 L; -6,5 DV mm em relação ao  $\lambda$ ) e para o NTS (-14,5 AP;  $\pm$ 0,5 L; -7,9 DV mm em relação ao bregma). Na seqüência, a cânula foi fixada utilizando-se de resina acrílica (metacrilato) que, por sua vez, foi fixada no crânio por dois diminutos parafusos de aço inoxidável. Em seguida à completa fixação das cânulas guia, retiramos a torre do estereotáxico. Atentando-se para evitar a obstrução das cânulas guia, introduzimos um mandril de aço inoxidável (do mesmo comprimento da cânula-guia) no interior de cada cânula, sendo então, o animal retirado do estereotáxico e acomodado novamente em caixas individuais. Como medida profilática, administramos após a cirurgia, 0,2 mL de Pentabiótico veterinário [160.000 U.I. /rato, via IM, (Fort-Dodge, Campinas, SP, Brasil)].

##### ***5- Microinjeções de drogas no NTS e no RVLM:***

As drogas foram diluídas em fluido cerebro-espinal artificial (aCSF) e microinjetadas no NTS e no RVLM, utilizando-se de uma seringa Hamilton de 1  $\mu$ L conectada a uma cânula injetora (33 Gauge, Small Parts, Miami Lakes, FL, EUA) por

meio de um tubo de polietileno PE-10. A cânula injetora utilizada foi de 1.5 a 1.7 mm mais longa que a cânula guia no caso do RVLM e de 1,0 a 1,5 mm maior que a cânula-guia no caso do NTS, com o intuito de que as microinjeções fossem realizadas exatamente no sítio pretendido. O volume microinjetado foi sempre de 50 nL e o pH da solução foi ajustado com bicarbonato de sódio para valores próximos do fisiológico (7,4).

#### ***6- Registro da pressão arterial e frequência cardíaca:***

Os registros de pressão arterial e frequência cardíaca foram realizados em animais não-anestesiados no dia seguinte ao das canulações da artéria e da veia femoral. Realizamos este registros por meio de uma cânula arterial conectada a um transdutor de pressão (Statham P23DB), acoplado a um polígrafo de 8 canais Narcotrace (Narco Biosystems INC, Austin, Tx, USA), possibilitando desta forma, o registro da pressão arterial média (PAM), da pressão arterial pulsátil (PAP) e da frequência cardíaca (FC), sendo que esta última foi obtida por meio de um biotacômetro (Narco Bio-Systems Inc, Austin, TX, EUA) acionado a partir de pulsos de pressão arterial.

#### ***7- Drogas e soluções utilizadas:***

- aCSF (Veículo)
- Tiopental sódico (Anestésico – Abbott, EUA).

- Tribromoetanol (Anestésico - Aldrich Chemical Co. Inc., Milwaukee, EUA)
- Fenilefrina (Agonista  $\alpha_1$  adrenérgico-Sigma. St. Louis. Mo, EUA).
- Cianeto de Potássio (KCN-Merck, Darmstadt, Alemanha)
- [Sar<sup>1</sup>-Thr<sup>8</sup>]Ang II (Sartran-Antagonistas não-específicos dos receptores de angiotensina II - Sigma. St. Louis. Mo, EUA).
- angiotensina II (Sigma. St. Louis. Mo, EUA).

### **8 - Histologia:**

Ao término dos protocolos experimentais foram realizadas microinjeções do corante Azul de Evans (em concentração de 2%) nos mesmos sítios de microinjeção de Angiotensina II ou de seus antagonistas, tendo por finalidade determinar os sítios de microinjeção no NTS e no RVLM. Posteriormente, os animais foram anestesiados com Tiopental sódico e então submetidos a uma toracotomia a fim de expor o coração do animal. Através de punção cardíaca, o animal foi perfundido com solução salina (em concentração de 0,9 %) seguida de solução de formalina 10% (tamponada). Com o intuito de otimizar a perfusão cerebral, procedemos o bloqueio da aorta descendente com auxílio de uma pinça hemostática, bem como secção da veia cava cranial. Em seguida a um tempo de perfusão satisfatório, realizamos a retirada do cérebro do animal, o qual foi fixado em solução de formol 10 % por um período de 48 horas. A seguir a região foi incluída em um bloco de parafina e, com auxílio de um micrótomo, seccionado transversalmente em fatias de 15 $\mu$ m de espessura. Os cortes histológicos receberam coloração pelo método de Nissl (cresil-violeta) com posterior visualização em

microscópio óptico. Através da coloração histológica e da microscopia óptica avaliamos se o sítio de microinjeção pretendido foi realmente atingido. Com efeito, apenas os animais que apresentaram cortes histológicos, onde a microscopia óptica assegurou que o núcleo pretendido foi atingido, foram considerados na análise de resultados.

### **B – Estudos em fatias horizontais do tronco cerebral e neurônios isolados:**

#### ***1 – Fatias horizontais do bulbo dorso medial contendo o NTS comissural:***

Para estes experimentos, as fatias horizontais do bulbo dorsomedial foram realizadas para identificação eletrofisiológica dos neurônios de segunda-ordem do NTS, conforme descrito por Doyle e cols. (2004). Os animais foram anestesiados com um coquetel anestésico contendo Ketamina (55,5 mg / mL), Xilazina (5,5 mg / mL) e Acepromazina (1,1 mg / mL). Após atingido o plano anestésico (ausência total de resposta aos estímulos nociceptivos), os animais foram decapitados, aproximadamente ao nível da terceira ou quarta vértebra cervical, com o auxílio de uma tesoura cirúrgica. Em seguida procedemos uma craniotomia na linha média da estrutura dorsal da caixa craniana utilizando-se de uma pequena tesoura cirúrgica oftálmica. O cérebro e o tronco encefálico foram rapidamente removidos e transferidos para um recipiente contendo solução de fluido aCSF, cuja composição (em mM) foi de: 125 NaCl ; 3 KCl ; 1,2 MgSO<sub>4</sub>; 2 CaCl<sub>2</sub>; 25NaHCO<sub>3</sub>; 1,2KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; e 10 glicose. Esta solução tem a osmolaridade situada entre 305 a 310 mOsm/L e pH próximo de 7,4 quando equilibrada

com mistura carbogênica (95% O<sub>2</sub> - 5% CO<sub>2</sub>) por, pelo menos, 3 a 5 minutos. O tempo desta operação não excedeu 2 minutos. O tronco encefálico, juntamente com o cérebro e o cerebelo, permaneceu submerso no ACSF a 0°C durante 5 minutos. A seguir, o cérebro e o cerebelo foram cuidadosamente removidos com o auxílio de uma lâmina de aço inoxidável. O tronco encefálico, com o óbex localizado centralmente, foi gentilmente dissecado utilizando-se de duas pinças oftálmicas, atentando-se para a remoção completa das meninges e vasos sanguíneos. Em seguida a base rostral do tronco encefálico foi fixado (com éster de cianoacrilato) em um suporte metálico para amostras, sendo que a superfície ventral do tronco cerebral permaneceu em contato com o suporte. Este, por sua vez, foi fixado na plataforma acessória do vibrátomo e o conjunto mergulhado em ACSF resfriado a 0°C contido em câmara deste aparelho. O vibrátomo proporcionou a obtenção de fatias do tronco encefálico de 140 a 160 µm de espessura (para fatias que foram utilizadas para a dispersão mecânica) ou de 250 µm (para fatias que foram utilizadas em experimentos de registro em fatias horizontais do tronco cerebral). Após a secção, cada fatia foi imediatamente transferida (com a ajuda de uma pipeta Pasteur plástica de diâmetro apropriado) para uma câmara contendo ACSF a 32°C e continuamente aerado com mistura carbogênica. A câmara de incubação foi constituída de um béquer de 600 ml, como descrito por Sakmann & Stuart (1995). As fatias assim obtidas foram mantidas na câmara de incubação durante um período de 60 a 120 minutos, após os quais foram submetidos à dispersão mecânica e, em seguida, foram realizados os registros eletrofisiológicos.

## ***2 – Dissociação mecânica:***

As fatias horizontais no tronco cerebral, contendo a porção comissural do NTS destinadas à dispersão mecânica, foram transferidas para uma placa de petri plástica de 35 mm de diâmetro (Falcon 1008; Becton Dickson, Franklin Lajes, NJ) preenchida com “solução padrão” cuja a composição é dada a seguir (em mM): 150 NaCl; 5 KCl; 1 MgCl<sub>2</sub>; 2 CaCl<sub>2</sub>; 10 HEPES; e 10 glicose (pH foi ajustado para 7,4 com Tris-OH). O aparato de dispersão constituiu-se de uma micropipeta de vidro, estirada com efeito a produzir extremidades muito finas, sendo então, submetidas ao polimento ígneo. O tamanho final da extremidade da micropipeta de vidro situou-se entre 100 – 120 µm (diâmetro externo). Esta pipeta foi adaptada, através de um micromanipulador, a um motor vibratório, o qual fornecia frequência vibratória à micropipeta de 30 – 60 Hz, com excursões de 100 – 300 µm. O micromanipulador permitiu que a micropipeta pudesse ser movida lentamente no intuito de dispersar a pequena área desejada. O NTS comissural pode ser identificado com auxílio de um lupa estereoscópica e, assim, a extremidade oscilante da micropipeta foi posicionada na superfície dorsal no NTS comissural na fatia horizontal do tronco cerebral. Após a remoção da fatia horizontal do tronco cerebral, a placa de petri contendo os neurônios dispersos permaneceu em repouso por 20 minutos para que os neurônios, suspensos na solução, decantassem e aderissem ao fundo plástico da placa de petri, fornecendo assim, estrutura estável necessária aos registros eletrofisiológicos.



### **3 - Eletrofisiologia:**

Para os registros eletrofisiológicos, modalidade voltage-clamp em neurônios dispersos, os mesmos foram visualizados através de um microscópio dotado de um sistema óptico de contraste de fase (TE2000S; Nikon, Tokio, Japão). Os registros de voltage-clamp foram realizados utilizando-se de um amplificador Axoclamp 2A e do programa pClamp 8 (Axon instruments/ Foster City, CA, EUA). Vale salientar que os registros eletrofisiológicos foram obtidos utilizando-se da técnica de *Nystatin perforated patch*, como descrito por Horn and Marty (1988). O microeletrodo foi preenchido com solução interna, contendo (em mM): 50 KCl; 100 gluconato de potássio; e 10 HEPES; e o pH da solução foi ajustado em 7,2 com Tris-OH. A concentração final de nistatina na solução interna foi de 450 mg / mL. Os neurônios dispersos da maneira acima descrita possuem botões pré-sinápticos intactos, como indicado pela presença dos correntes excitatórias e inibitórias pós-sinápticas (CEPS e CIPS, respectivamente - como descrito em Jin e cols., 2004). Os neurônios foram clampeados em uma voltagem situada entre -55 e -60 mV, as amostras de correntes foram coletadas cada a 20  $\mu$ sec e registradas em um computador de aquisição de dados. Os dados foram analisados “off-line” utilizando do programas pClamp 8 e MiniAnalysis (Synaptosoft, Decatur, GA, EUA).

Para os experimentos que envolviam o registro de neurônios contidos em fatias do tronco cerebral, as fatias horizontais foram realizadas de forma a permitir a identificação eletrofisiológica dos neurônios de segunda-ordem (Doyle e cols., 2004). Os neurônios foram visualizados no NTS comissural utilizando-se um sistema de aquisição de imagens

de rápida atualização de imagens digitais em conjunto com iluminação infra-vermelha e óptica de contraste de interferência diferencial (lentes de imersão com aumento de 40 vezes) acoplados ao microscópio Axioskop FS2 (Zeiss, Thornwood, NJ). A aquisição de imagens foi realizada através de uma câmera sensível à iluminação infra-vermelha (AxioCam, Zeiss, Thornwood, NJ). Os registros eletrofisiológicos foram realizados em modalidade voltage-clamp e configuração whole-cell (Axoclamp 2A, Axon Instruments, Foster City, CA). As micropipetas de registro (2.5 –3.5 M $\Omega$ ) foram preenchidas com solução interna, que continha ( em mM): 10 NaCl, 40 KCl, 90 K gluconate, 11 EGTA, 1 CaCl<sub>2</sub>, 2 MgCl<sub>2</sub>, 10 HEPES, 2 Na<sub>2</sub>ATP, and 0.2 Na<sub>2</sub>GTP, pH 7.3 (295 mOsm) e as células foram clampeadas em – 60 mV. A solução de perfusão foi composta (em mM) de: 125 NaCl ; 3 KCl ; 1,2 MgSO<sub>4</sub>; 2 CaCl<sub>2</sub>; 25NaHCO<sub>3</sub>; 1,2KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; e 10 glicose, sendo esta solução mantida a 32°C e em velocidade de perfusão de 4 mL por minuto. Os dados foram filtrados a 3 kHz e amostrados a 50–100 kHz utilizando-se do programa pClamp 8 (Axon Instruments). Um eletrodo bipolar concêntrico (200  $\mu$ m de diâmetro; Frederick Haer, Bowdoinham, ME) foi posicionado no trato solitário (TS) no intuito de fornecer estímulos elétricos aos axônios aferentes. Ainda, este eletrodo foi posicionado em distância compreendida entre 1 e 3 mm do neurônio a ser registrado e, com isso, minimizando a possibilidade de estimulação direta focal de axônios não contidos no TS (Doyle e cols. 2004), ou de corpos celulares locais (Titz e Keller, 1997). Os neurônios de segunda-ordem podem ser identificados segundo o padrão de “Jitter” (< 150  $\mu$ s) conforme descrito por Doyle e Andresen (2001) e Doyle e cols. (2004). O “jitter” é considerado como o desvio padrão da latência entre o estímulo do trato solitário e o início da corrente excitatória pós-sináptica evocada. Para a análise do Jitter, um trem de 5

estímulos do TS a cada 6 segundos foram gerados com auxílio de um estimulador programável isolado (Master-8, AMPI, Jerusalém, Israel), sendo que o intervalo entre os estímulos de um mesmo trem foi de 100 ms. As latências sinápticas foram mensuradas entre o artefato de estímulo do ST e o início da corrente evocada.

#### ***4 - Análise estatística dos resultados:***

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. Os dados obtidos foram submetidos ao teste-t de Student ou ANOVA “one-way” para medidas repetidas. Para os experimentos eletrofisiológicos relacionados aos eventos espontâneos excitatórios e inibitórios em neurônios isolados e em fatias do tronco cerebral utilizamos o teste Kolmogorov-Smirnov. O nível de significância foi fixado em 0,05.

**VI - PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS**

**A – Experimentos em animais acordados:**

***1- Curva concentração-resposta à microinjeção de diferentes concentrações de angiotensina II no NTS ou no RVLM de ratos acordados:***

Quatro dias após o implante das cânulas-guia em direção ao NTS e ao RVLM, realizamos microinjeções de concentrações crescentes de angiotensina II nas diferentes áreas a serem estudadas com a finalidade de obter uma curva concentração-resposta. Inicialmente, realizamos a identificação funcional do sítio pretendido com l-glutamato, feito isso, após o retorno das variáveis cardiovasculares aos níveis basais, realizamos as microinjeções de concentrações crescentes de angiotensina II no NTS ou no RVLM de ratos acordados. Ao final dos experimentos, realizamos controle de volume com a microinjeção do veículo (aCSF) no mesmo volume utilizado para as microinjeções de angiotensina II no NTS ou no RVLM. Cada animal recebeu apenas 3 concentrações de angiotensina II, a fim de reduzir os danos teciduais promovidos por múltiplas microinjeções.

***2 – Avaliação da ocorrência de taquifilaxia na resposta pressora à microinjeção de angiotensina II no RLVM de ratos acordados:***

Quatro ou cinco dias depois do implante de cânulas-guia em direção ao bulbo rostral ventro-lateral e no dia seguinte à cateterização da artéria femoral para registro da frequência cardíaca, realizamos a microinjeção de angiotensina II no RVLM de ratos acordados. Este protocolo foi elaborado com a finalidade avaliar se a resposta pressora produzida pela microinjeção de angiotensina II no RVLM de ratos acordados está sujeita ao fenômeno de taquifilaxia, pois caso isso ocorresse, os estudos subseqüentes poderiam se tornar inviáveis. Para isso, realizamos microinjeções deste peptídeo no RVLM em intervalos de tempo decrescentes, isto é: 1 hora, 30 minutos, 15 minutos, 10 minutos e 5 minutos de intervalo em relação à concentração precedente. A concentração de angiotensina II utilizada para tal foi 10 mM.

***3 – Padronização da concentração do antagonista de angiotensina (Sartran) no bloqueio das respostas cardiovasculares à microinjeção de angiotensina II no NTS ou no RVLM:***

Neste protocolo, após a ambientação do animal à sala de registro e estabilização dos registros cardiovasculares, realizamos a identificação funcional do sítio de microinjeção pretendido (NTS ou RVLM) através da microinjeção da concentração de angiotensina II padronizada anteriormente (curva concentração-resposta). Com este procedimento obtivemos as respostas-controle. Após o retorno da pressão arterial e da

frequência cardíaca aos seus valores basais, realizamos a microinjeção do antagonista de receptores de angiotensina, Sartran, e então realizamos a microinjeção de angiotensina II (na concentração estabelecida no protocolo anterior) 5, 10, 15 e 60 minutos após o bloqueio dos receptores de angiotensina II no NTS ou no RVLM.

#### ***4- Efeito do bloqueio dos receptores de angiotensinérgicos no NTS e no RVLM sobre as respostas cardiovasculares do quimiorreflexo:***

Após a ambientação do animal à sala de registro, realizamos a ativação do quimiorreflexo com KCN na concentração única de 40µg/ 0,1mL, por via intravenosa e obtivemos respostas controle. As ativações controle do quimiorreflexo foram realizadas até que tivéssemos duas respostas subsequentes semelhantes e a última resposta foi tomada como dado para a análise estatística. Após um período de tempo não inferior a 15 minutos, realizamos a identificação funcional do sítio pretendido com microinjeções de angiotensina II nas concentrações estabelecidas no protocolo 1 para os diferentes sítios pretendidos. Após a estabilização dos registros, administramos o antagonista de receptores angiotensinérgicos Sartran e realizamos novamente ativações do quimiorreflexo aos 5, 10, 15, 30 e 60 minutos após a microinjeção de Sartran. As respostas obtidas foram comparadas com as respostas controle por meio de testes estatísticos descritos nos métodos.

**B – Experimento em neurônios do NTS comissural isolados mecanicamente:**

***6 - Avaliação do efeito farmacológico da angiotensina sobre a neurotransmissão glutamatérgica e GABAérgica em sinapses dos neurônios dispersados mecanicamente do NTS comissural:***

Neste protocolo experimental, avaliamos o efeito da aplicação exógena de angiotensina II (1 e 3  $\mu\text{M}$ ) na frequência da liberação de GABA e glutamato pelos terminais pré-sinápticos em neurônios do NTS comissural. Avaliamos ainda a amplitude das correntes excitatórias (eCEPS) e inibitórias (eCIPS) pós-sinápticas espontâneas promovidas pela ação dos neurotransmissores Glutamato e GABA, respectivamente, na membrana pós-sináptica. Vale ressaltar que a aplicação exógena de angiotensina II foi realizada nas proximidades da célula registrada através do sistema de tubo em Y, como descrito por Murase e cols. (1979) que, por sua vez, possibilita a troca da solução de perfusão que circunda a célula em cerca de 20 msec.



**C – Experimentos em neurônios em fatias horizontais do NTS:**

***7 - Avaliação do efeito farmacológico da angiotensina II sobre neurotransmissão glutamatérgica em sinapses dos neurônios contidos em fatias horizontais do NTS comissural:***

Realizamos o registro eletrofisiológico de neurônios do NTS comissural contidos em fatias horizontais do NTS comissural e, nestes, avaliamos o efeito da aplicação exógena de angiotensina II (1  $\mu$ M) na frequência da liberação espontânea de Glutamato pelos terminais pré-sinápticos que fazem sinapses em neurônios do NTS comissural. Avaliamos ainda a amplitude das correntes excitatórias espontâneas (eCEPS) promovidas pela ação do neurotransmissor Glutamato na membrana pós-sináptica.

***8 - Avaliação do efeito farmacológico da angiotensina II sobre as correntes excitatórias pós-sinápticas evocadas pela estimulação elétrica do trato solitário em neurônios contidos em fatias horizontais do NTS comissural:***

Ainda em experimentos que envolviam o registro eletrofisiológico de neurônios contidos em fatias horizontais do NTS comissural, realizamos a estimulação elétrica do TS através de um eletrodo bipolar concêntrico. Este estímulo constituiu-se de um trem de 5 estímulos elétricos ao trato solitário a cada 6 segundos, sendo que o intervalo entre os estímulos de um mesmo trem foi de 100 ms. Com efeito às estimulações elétricas do TS,

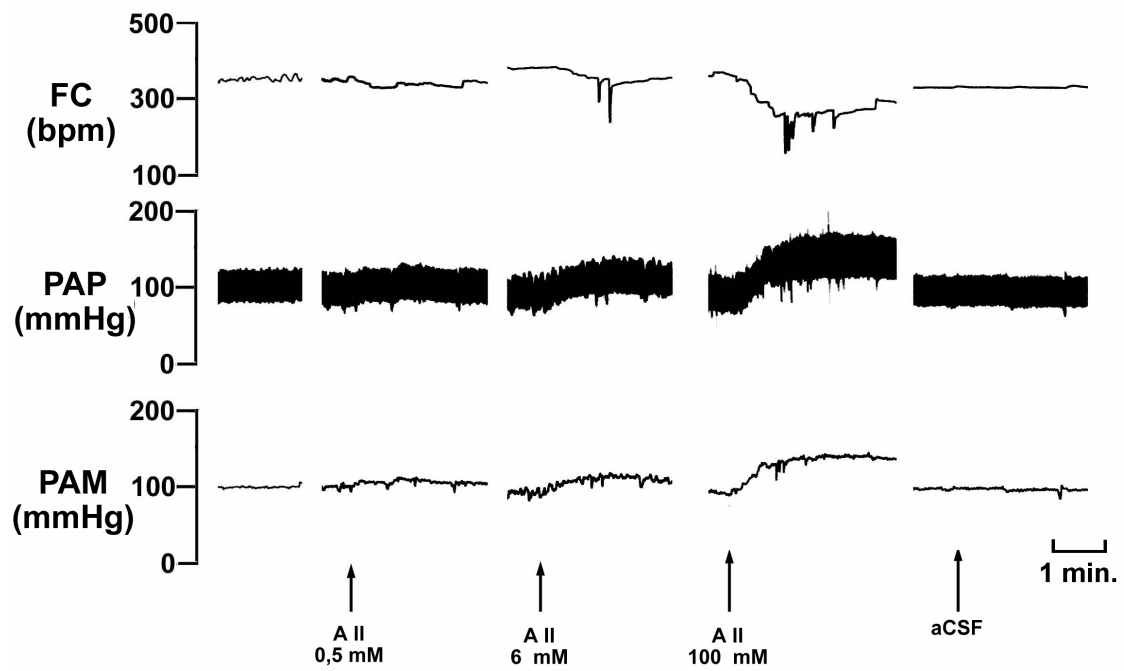
observamos correntes pós-sinápticas evocadas nos neurônios do NTS comissural. Este procedimento foi realizado antes e depois da perfusão da fatia do NTS com angiotensina II (1  $\mu$ M).

**VII – RESULTADOS**

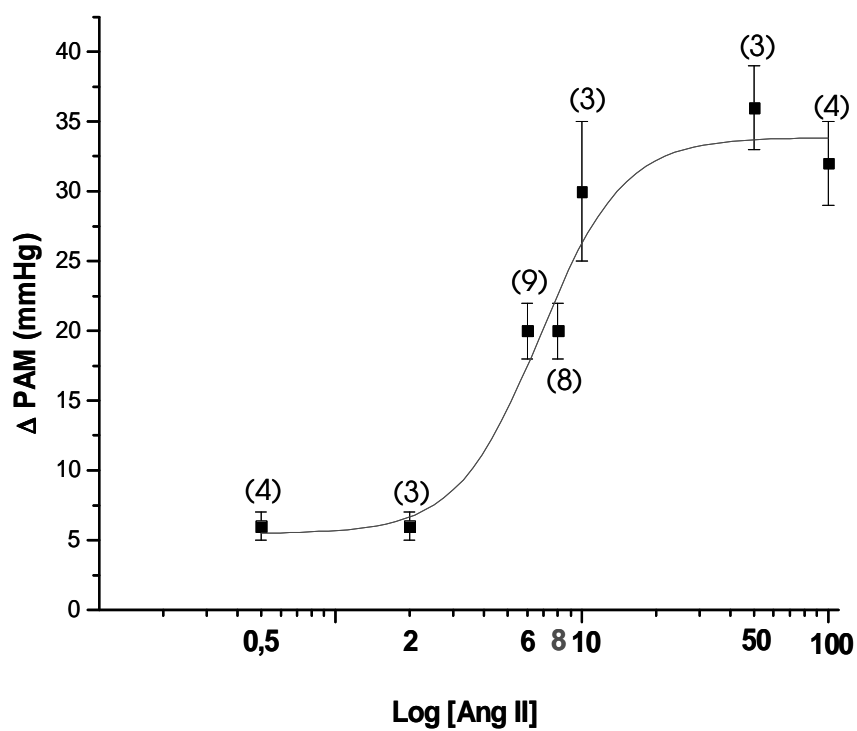
**A – Experimentos em animais acordados:**

***1 - Curva concentração-resposta à microinjeção de diferentes concentrações de Angiotensina II no RVLM de ratos acordados:***

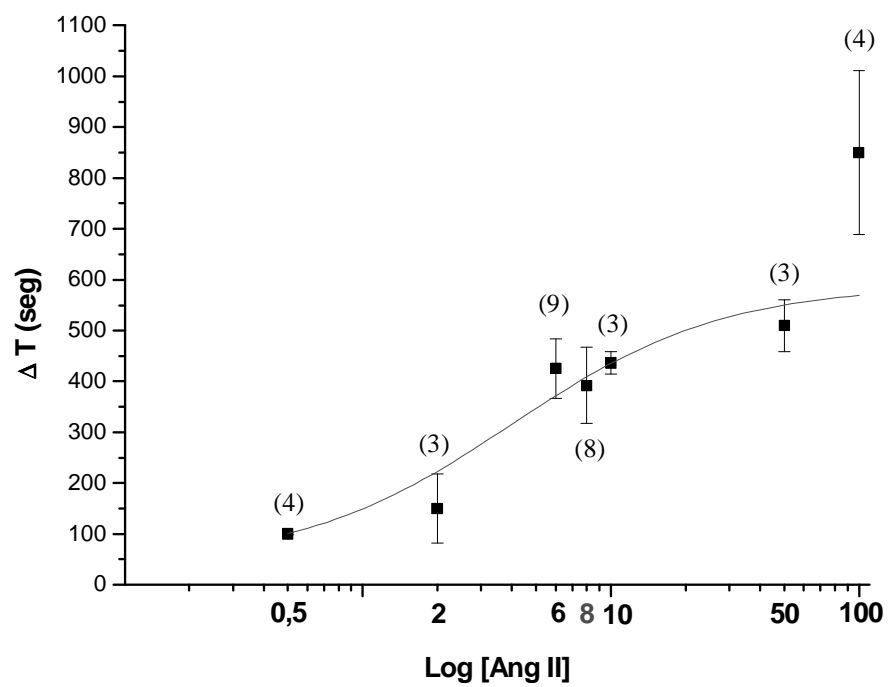
Este protocolo foi realizado a fim de se estabelecer a concentração efetiva de angiotensina II que causa 50% do efeito máximo em termos de magnitude de resposta pressora. Com isso, as concentrações utilizadas foram de 0,5; 2; 6; 8; 10; 50 e 100 mM. Cada animal recebeu apenas três microinjeções de diferentes concentrações de angiotensina II e estas foram realizadas em sequência aleatória. A figura 1 apresenta os traçados obtidos em um rato representativo do grupo, mostrando as alterações cardiovasculares, concentração-dependentes à microinjeção de angiotensina II no RVLM. As respostas pressoras seguiram um padrão concentração-dependente:  $+6 \pm 1$ ;  $+6 \pm 1$ ;  $+20 \pm 2$ ;  $+20 \pm 2$ ;  $+30 \pm 5$ ;  $+36 \pm 3$  e  $+32 \pm 3$  mmHg nas concentrações de 0,5, 2, 6, 8, 10, 50 e 100 mM respectivamente, como apresentado na figura 2, sendo que a concentração que causa 50% do efeito máximo foi a de 8 mM. É importante ressaltar que a microinjeção de 50 nL do veículo (aCSF) no RVLM promoveu resposta pressora insignificante ( $+2 \pm 1$  mmHg). O número de animais que recebeu cada uma das concentrações variou de 3 a 9. A figura 3 expressa a duração da resposta pressora à microinjeção de angiotensina II no RVLM de ratos acordados ( $100 \pm 20$ ;  $150 \pm 68$ ;  $425 \pm 58$ ;  $392 \pm 75$ ;  $436 \pm 22$ ;  $510 \pm 52$  e  $850 \pm 161$  segundos para as concentrações de 0,5; 2; 6; 8; 10; 50 e 100 mM respectivamente). Os dados referentes ao presente experimento encontram-se nas tabelas 1 e 2do apêndice.



**Figura 1:** Traçados de um animal representativo do grupo, mostrando as alterações cardiovasculares, na frequência cardíaca (FC), pressão arterial pulsátil (PAP) e pressão arterial média (PAM), concentração-dependentes em resposta à microinjeção de angiotensina II (A II) no RVLM.



**Figura 2** Alterações concentração-dependentes na pressão arterial média (PAM) em resposta à microinjeção de diferentes concentrações de angiotensina II (0,5; 2; 6; 8; 10; 50 e 100 mM) no RVLN de ratos acordados. Entre parênteses estão apresentados os números de animais que receberam cada uma das concentrações.



**Figura 3:** Alterações concentração-dependentes na duração ( $\Delta t$ ) da resposta pressora à microinjeção de diferentes concentrações de angiotensina II (0,5; 2; 6; 8; 10; 50 e 100 mM) no RVLN de ratos acordados. Entre parênteses estão apresentados os números de animais que receberam cada uma das concentrações.

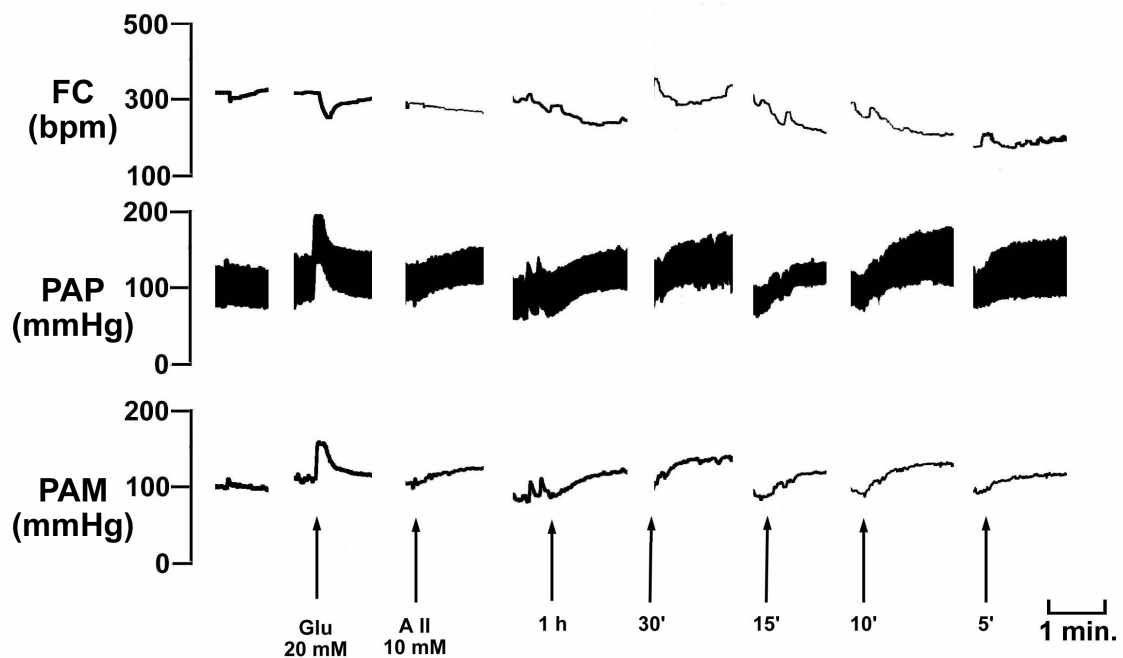
***2 – Avaliação da ocorrência de taquifilaxia na resposta pressora à microinjeção de angiotensina II no RLVM de ratos acordados:***

Para avaliarmos se sucessivas microinjeções de angiotensina II no RLVM de ratos acordados promoveria ou não taquifilaxia, realizamos microinjeções deste peptídeo em intervalos decrescentes de tempo. Com isso, estabelecemos os tempos de 60, 30, 15, 10 e 5 minutos. A figura 4 ilustra um traçado de um animal representativo deste grupo, onde podemos evidenciar a ausência de taquifilaxia. Como podemos observar na figura 5, as microinjeções sucessivas de angiotensina II no RLVM de ratos acordados, em intervalos decrescentes, não promoveu redução da magnitude das respostas pressoras à microinjeção deste peptídeo, visto que as respostas nos tempos de 60, 30, 15 e 10 ( $+30\pm 3$ ;  $+27\pm 3$ ;  $+25\pm 2$  e  $+26\pm 2$  mmHg, respectivamente) não foram significativamente diferentes da resposta pressora controle ( $+24\pm 2$  mmHg). Após o intervalo de 5 minutos, observamos uma redução significativa da magnitude da resposta pressora ( $+17\pm 2$  mmHg) à microinjeção de angiotensina II. Esta redução ocorreu porque o nível da pressão arterial ainda encontrava-se elevado devido à microinjeção precedente.

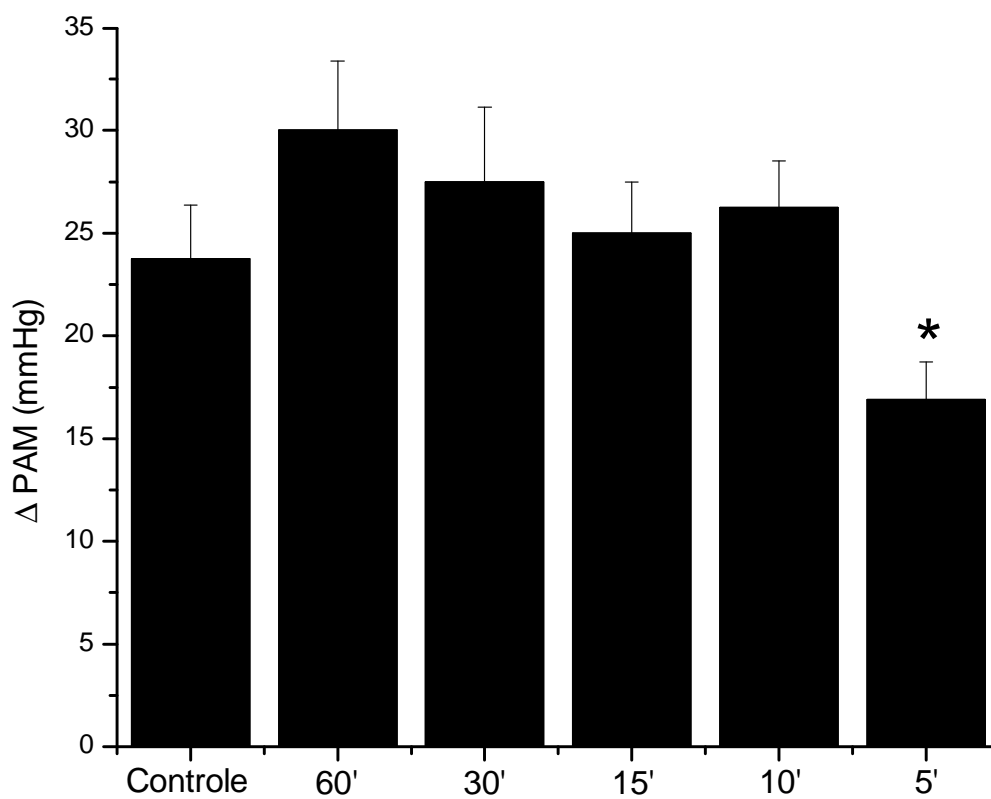
Ao avaliar o tempo de duração destas respostas pressoras, observamos um padrão semelhante aos resultados referentes à magnitude da resposta pressora, pois as microinjeções a intervalos de tempo de 60, 30, 15 e 5 minutos ( $540\pm 109$ ,  $432\pm 60$ ,  $441\pm 64$  e  $290\pm 45$  segundos, respectivamente) não alteraram significativamente o tempo de duração da resposta pressora em relação à resposta controle ( $456\pm 71$  segundos), como mostrado na figura 6. Neste protocolo utilizamos um total de 35 animais, dos quais 8 foram considerados positivos na análise histológica. Para que o animal fosse considerado



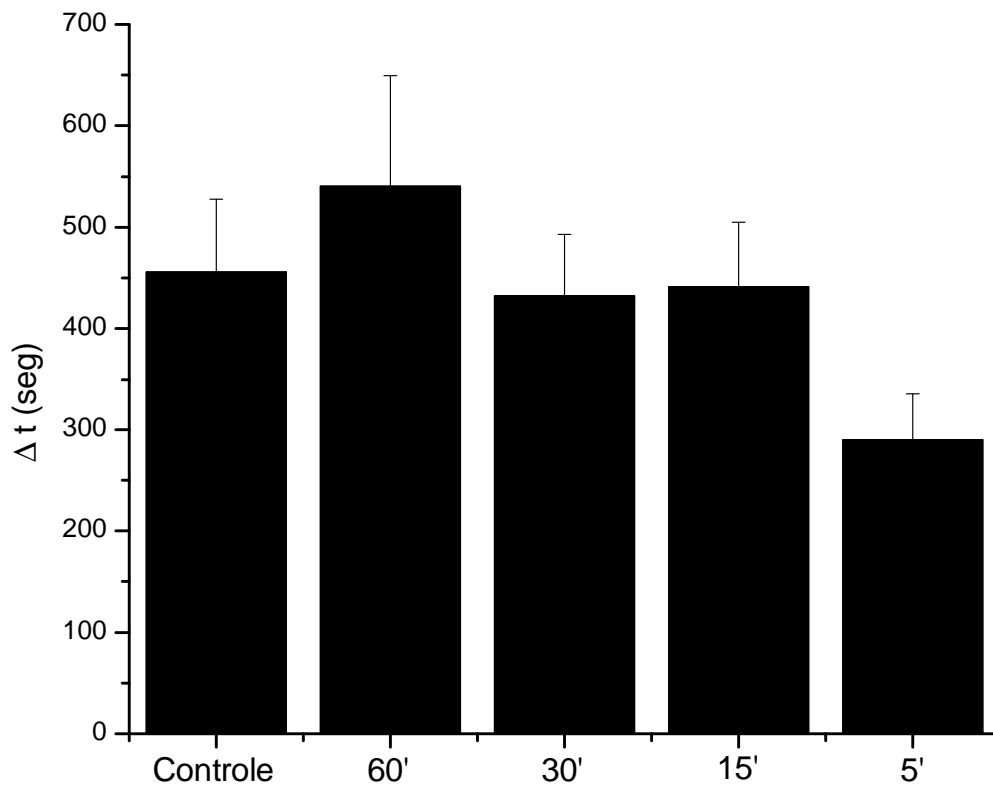
positivo e, portanto, incluído no grupo, este deveria apresentar o trajeto das microinjetoras com o centro da microinjeção no RVLM, tendo-se como referenciais, o aspecto caudal do núcleo facial e o centro da microinjeção estar situado ventralmente ao núcleo ambíguo. Os resultados referentes ao presente experimento encontram-se na tabela 3 do apêndice.



**Figura 4:** Traçados de um animal representativo do grupo, mostrando as alterações cardiovasculares na frequência cardíaca (FC), pressão arterial pulsátil (PAP) e na pressão arterial média (PAM) bem como a ausência de taquifilaxia em resposta à microinjeções de angiotensina II (AII -10 mM) no RVLM.



**Figura 5:** Alteração na pressão arterial ( $\Delta$  PAM) em resposta à microinjeções consecutivas de angiotensina II (10 mM) a intervalos de tempo decrescentes em relação à microinjeção precedente. (\*) Diferente em relação ao controle ( $p < 0,05$ ).



**Figura 6:** Duração ( $\Delta T$ ) das respostas pressoras às microinjeções consecutivas de angiotensina II (10 mM) a intervalos decrescentes (n=8).

***3 – Padronização da concentração efetiva do antagonista não-seletivo de angiotensina (Sartran) no bloqueio das respostas cardiovasculares à microinjeção de angiotensina II no RVLM de ratos acordados:***

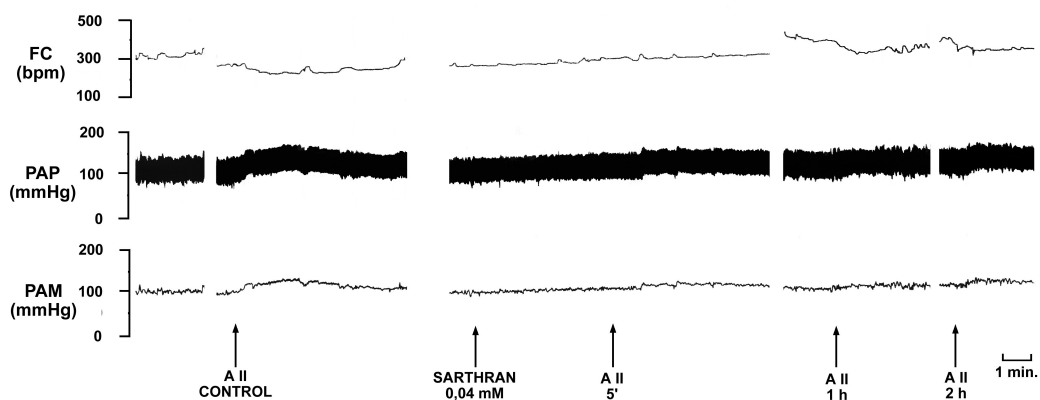
Observamos que a microinjeção de angiotensina II no RVLM de ratos acordados, produziu uma resposta pressora ( $+19\pm 2$  mmHg) que não foi atenuada pela microinjeção da solução 20 mM de Sartran ( $+11\pm 1$  mmHg), bem como não houve alteração significativa 1 ou 2 horas após a microinjeção do antagonista ( $+17\pm 2$  e  $+15\pm 2$  mmHg, respectivamente), como expresso na figura 8. Apesar da atenuação da resposta a análise estatística não evidenciou diferença significativa. A duração da resposta pressora também não foi significativamente reduzida pela prévia microinjeção do Sartran, ( $195\pm 29$ ;  $304\pm 53$ ;  $380\pm 46$  segundos, respectivamente) em relação à resposta controle ( $369\pm 54$  segundos). Os valores relativos à análise da duração da resposta pressora estão apresentados na figura 9.

Como não conseguimos bloqueio significativo da resposta pressora a microinjeção de angiotensina II no RVLM de ratos acordados com a microinjeção de 20 mM do antagonista, decidimos realizar protocolo semelhante, porém microinjetando 50 nL de uma solução de 40 mM do antagonista. Com efeito, observamos que a microinjeção desta concentração do Sartran promoveu redução da magnitude da resposta pressora à microinjeção de angiotensina II aos 5 minutos, 1 e 2 horas após a microinjeção do Sartran 40 mM ( $+6\pm 1$  ;  $+5\pm 1$  e  $+6\pm 1$  mmHg respectivamente) em relação a resposta controle ( $+19\pm 2$  mmHg) (Figura 10). Efeito semelhante foi observado na duração desta resposta pressora (Figura 11), onde a microinjeção do sartran reduziu significativamente

a duração da resposta pressora à microinjeção de angiotensina II aos 5 minutos, 1 e 2 horas após a microinjeção do Sartran 40 mM ( $140\pm 48$ ;  $108\pm 35$  e  $168\pm 51$  segundos) em relação a resposta controle ( $328\pm 35$  segundos). Como o bloqueio foi efetivo, a concentração de 40 mM passou a ser testada contra o quimiorreflexo. A figura 7 representa traçados de um animal representativo do grupo, mostrando as alterações na pressão arterial antes e após a microinjeção do Sartran na concentração de 40 mM.

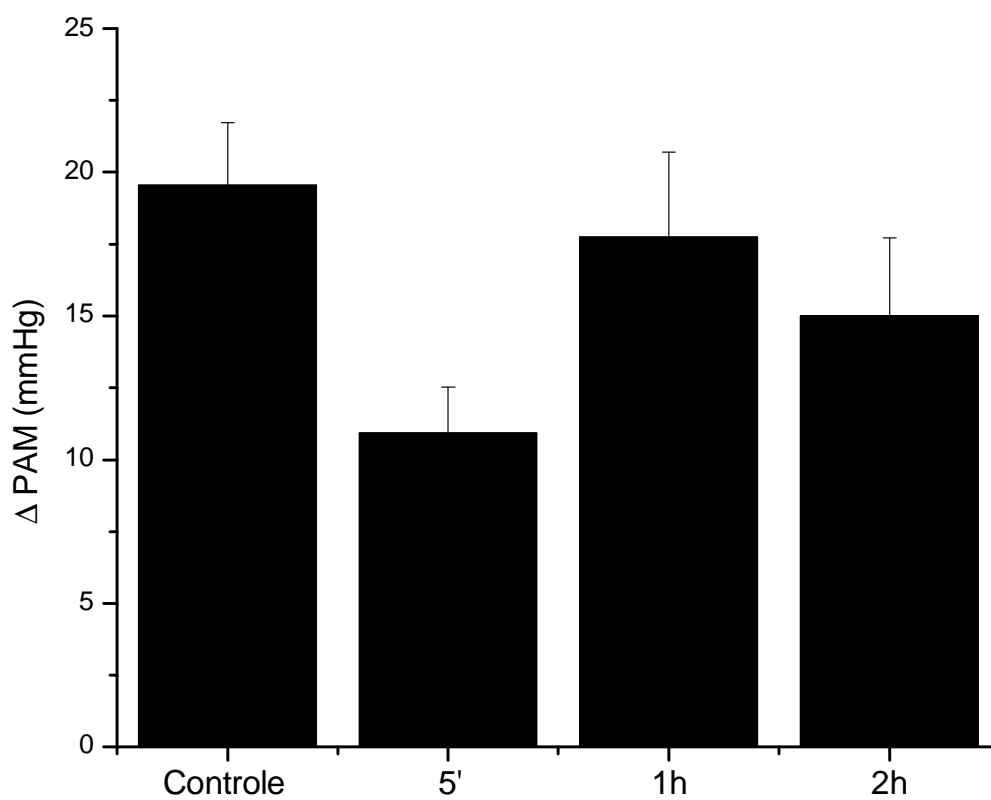
Observamos, entretanto, que microinjeções de angiotensina II realizadas involuntariamente no aspecto caudal do núcleo facial ( $n=5$ ), o qual se situa nos limites rostrais do RVLM também promoveu resposta pressora semelhante àquela observada quando da microinjeção de angiotensina II no RVLM, onde a magnitude da resposta pressora foi de  $16 \pm 4$  mmHg (Figura 12) e a sua duração de  $296 \pm 92$  segundos (Figura 13). Vale ressaltar que estas respostas não foram diferentes daquelas produzida pela microinjeção de angiotensina II no RVLM. Contudo, isso ainda não exclui a possibilidade de que o volume microinjetado no núcleo facial tenha se difundido para o RVLM ou que nesta região encontrem-se neurônios relacionados à atividade eferente simpática. Ainda, esta resposta parece ser específica da ativação de receptores de angiotensina, uma vez que a mesma foi atenuada pela prévia microinjeção do Sartran, cuja magnitude da resposta passou a ser de  $5 \pm 2$  mmHg e a sua duração de  $10 \pm 2$  segundos ( $n=5$ ). Estes animais com microinjeções de angiotensina II e Sartran no núcleo facial foram obtidos quando do desenvolvimento deste protocolo experimental (Estabelecimento da concentração efetiva do antagonista de angiotensina), logo a análise das respostas cardiovasculares à microinjeção de angiotensina II antes e após o Sartran foram procedidas da mesma forma que realizamos naqueles com microinjeções da

angiotensina e seu antagonista no RVLM. Na figura 14, apresentamos uma fotomicrografia do RVLM de um animal representativo do grupo, mostrando o sítio unilateral de microinjeção de angiotensina II e Sartran (40 mM). Na figura 15, mostramos fotomicrografia na qual observamos o sítio de microinjeção unilateral de angiotensina II e Sartran (40 mM) no Núcleo Facial de uma animal representativo do grupo. Os dados referentes aos presentes experimentos encontram-se apresentados nas tabelas 4 e 5 do apêndice.

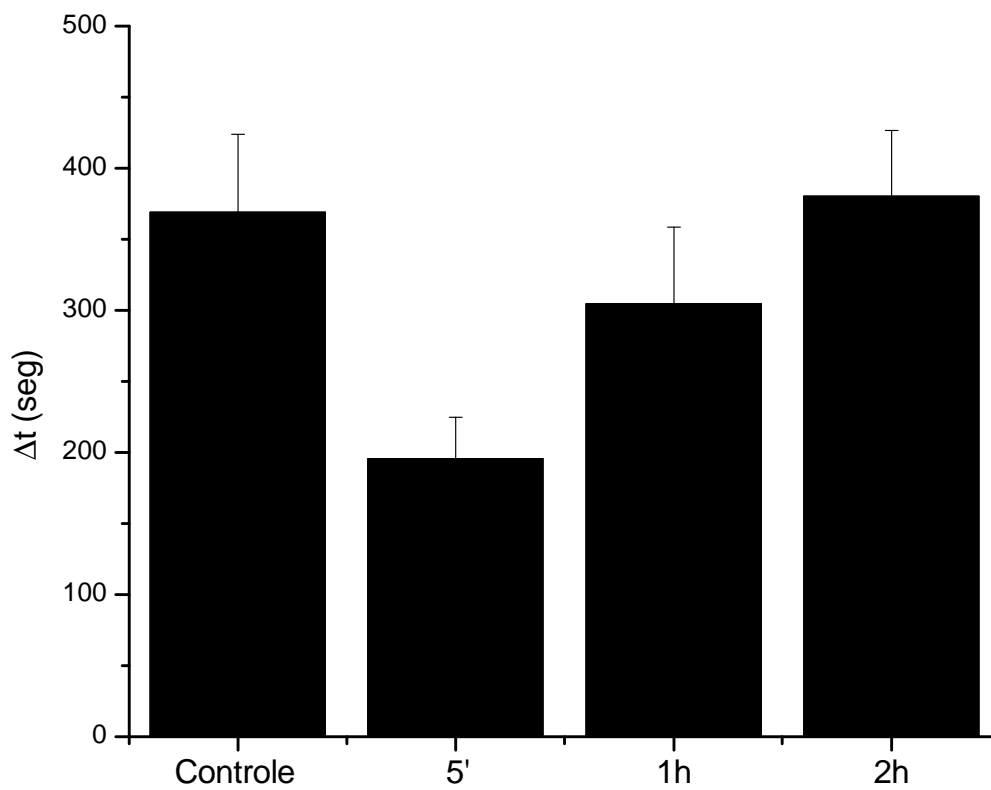


**Figura 7:** Traçados de um animal representativo do grupo, mostrando as respostas cardiovasculares, na frequência cardíaca (FC), na pressão arterial pulsátil (PAP) e na pressão arterial média (PAM), às microinjeções de angiotensina II no RVLM, antes e 5 min, 1 hora e 2 horas após a microinjeção de Sartran (40 mM).

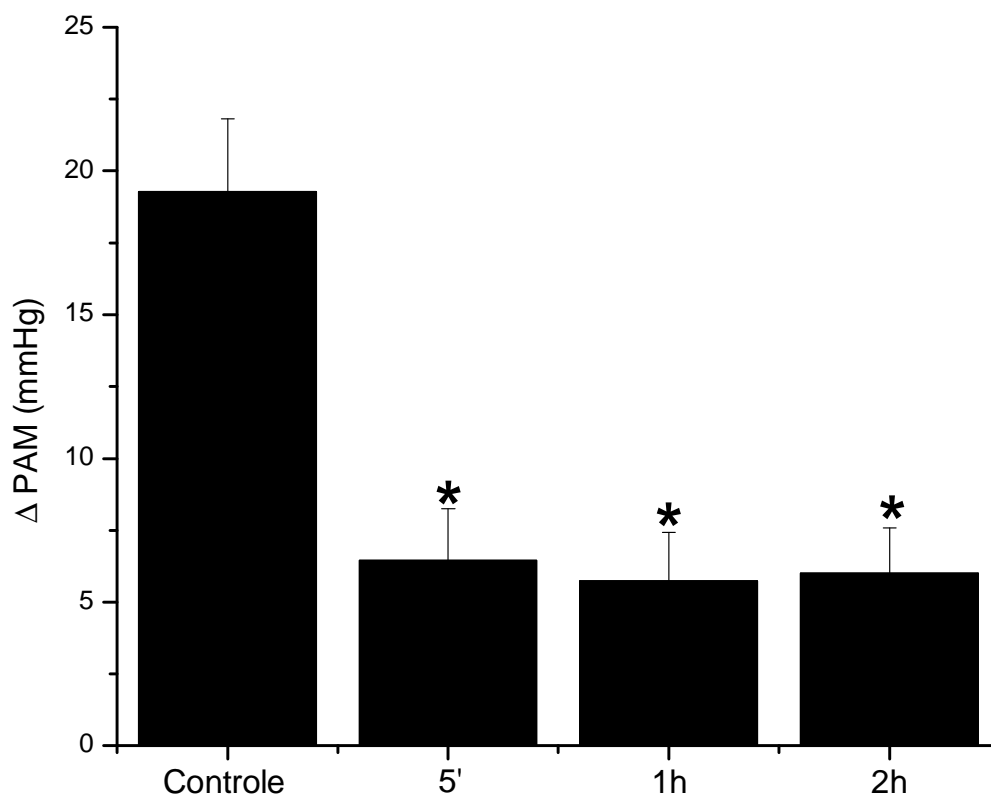




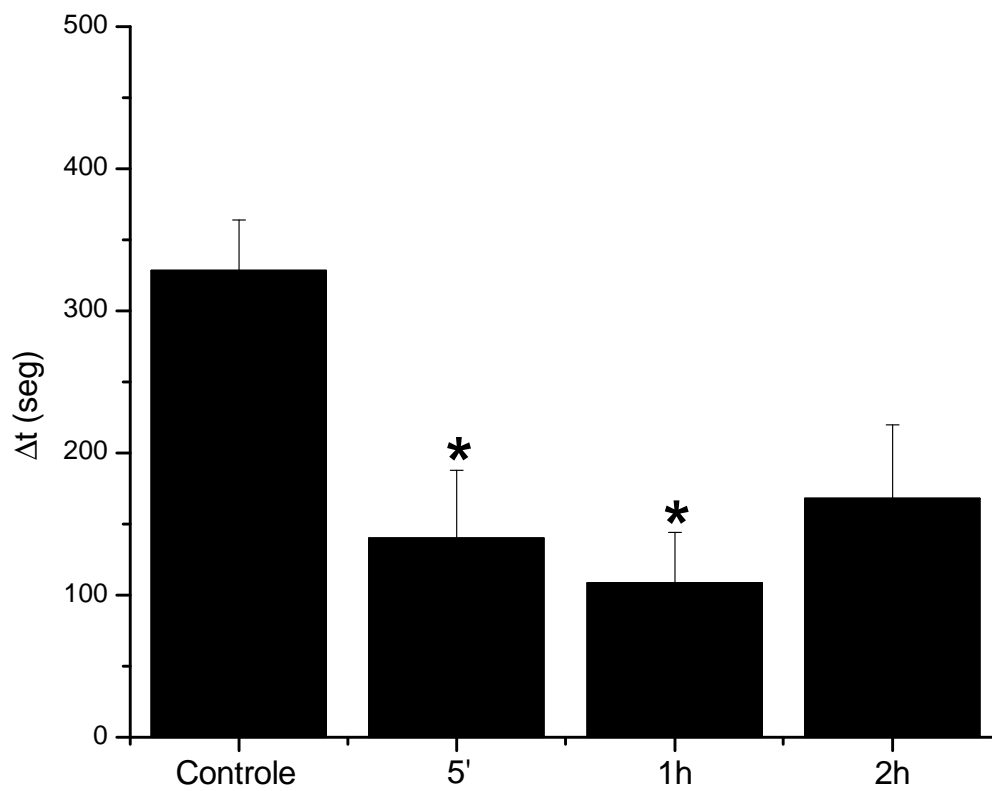
**Figura 8:** Resposta ( $\Delta$  PAM) pressora à microinjeção de angiotensina II no RVLM de ratos acordados, antes (CONT) e 5 min, 1h e 2 horas após a microinjeção de Sartran (20 mM) no RVLM, (n= 11).



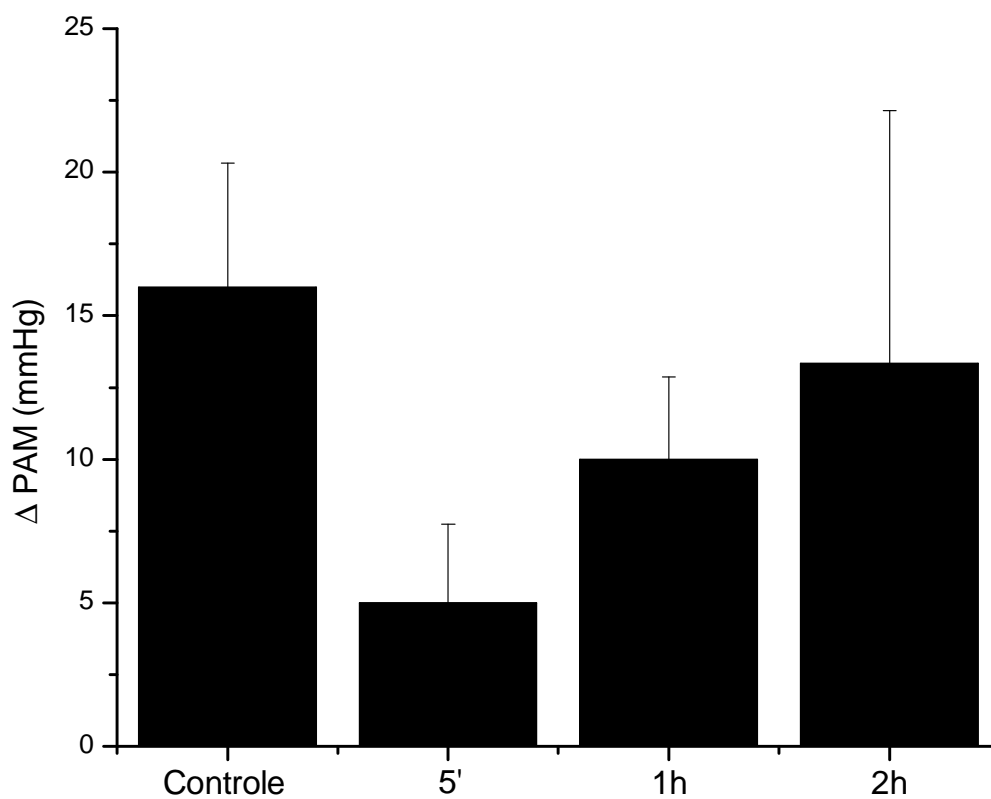
**Figura 9:** Duração das repostas pressoras às microinjeções de angiotensina II no RVLM de ratos acordados, antes (CONT) e 5 min, 1 h e 2 horas após a microinjeção de Sartran (20 mM) no RVLM, (n= 11).



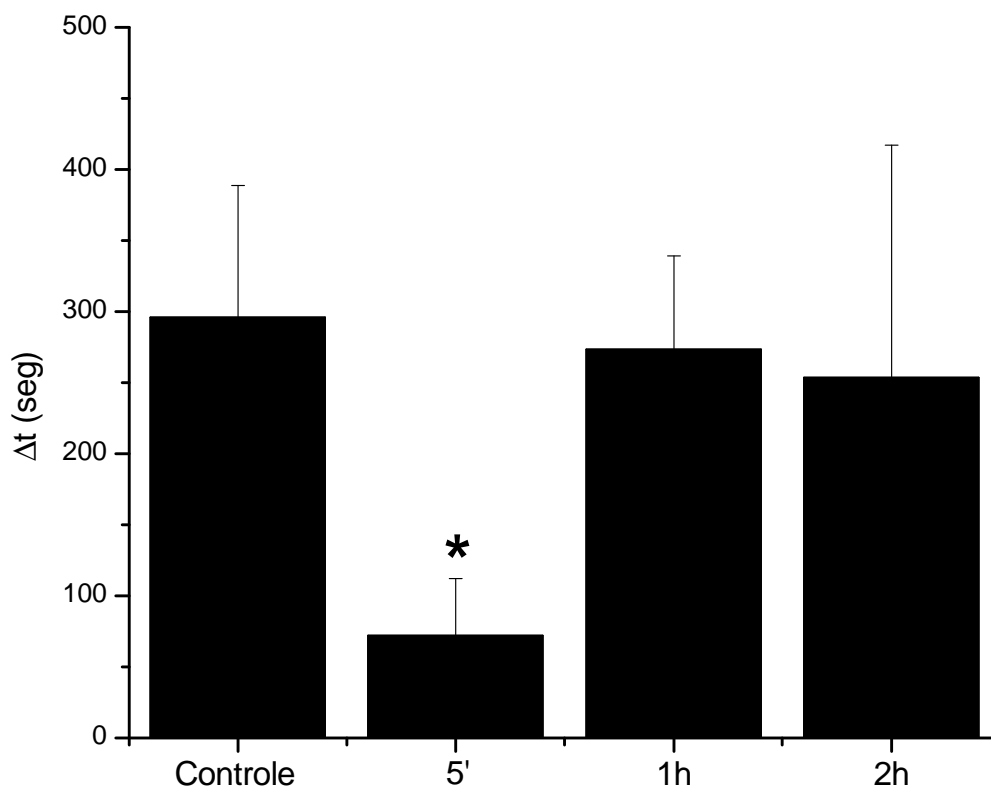
**Figura 10:** Repostas pressoras às microinjeções de angiotensina II no RVLM de ratos acordados, antes (CONT) e 5 min, 1 h e 2 horas após a microinjeção de Sartran (40 mM), (n= 7) no RVLM. (\*) Diferente do controle ( $p < 0,05$ ).



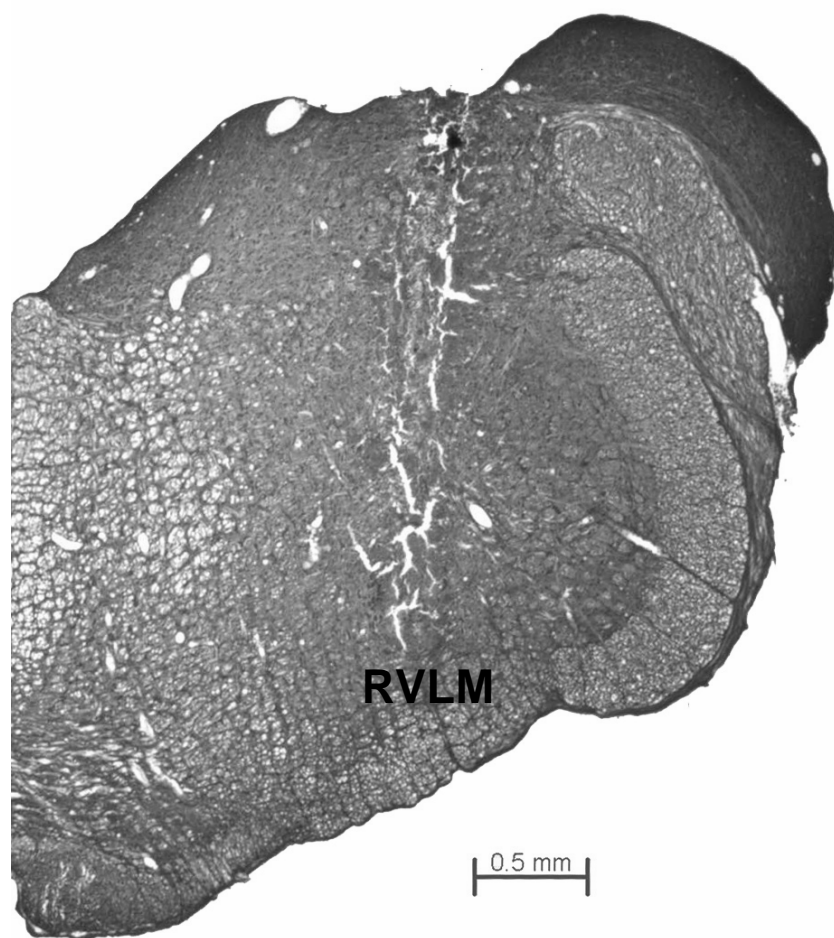
**Figura 11:** Duração das repostas pressoras às microinjeções de angiotensina II no RVLM de ratos acordados, antes (CONT) e 5 min, 1 h e 2 horas após a microinjeção de Sartran (40 mM) no RVLM, (n= 7).(\*) Diferente do controle (p<0,05).



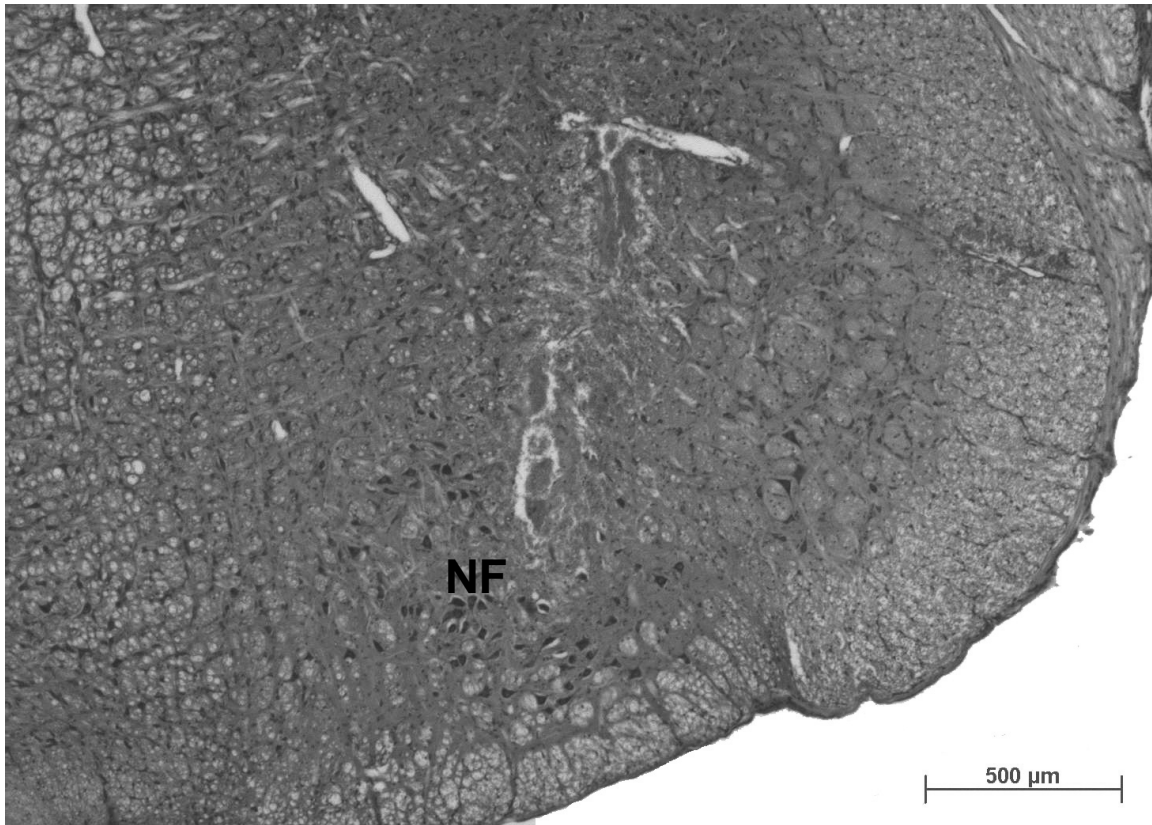
**Figura 12:** Repostas pressoras às microinjeções de angiotensina II nos aspectos mais caudais do núcleo facial de ratos acordados, antes (CONT) e 5 min, 1 h e 2 horas após a microinjeção de Sartran (40 mM) no núcleo facial, (n= 7).



**Figura 13:** Duração das repostas pressoras às microinjeções de angiotensina II nos aspectos mais caudais do núcleo facial de ratos acordados, antes (CONT) e 5 min, 1 h e 2 horas após a microinjeção de Sartran (40 mM) no núcleo facial (n= 7).(\*) Diferente do controle ( $p < 0,05$ ).



**Figura 14:** Fotomicrografia de uma secção transversal tronco cerebral de um rato, mostrando o trajeto e o sítio de microinjeção unilateral no RVLM (aumento de 30 x).



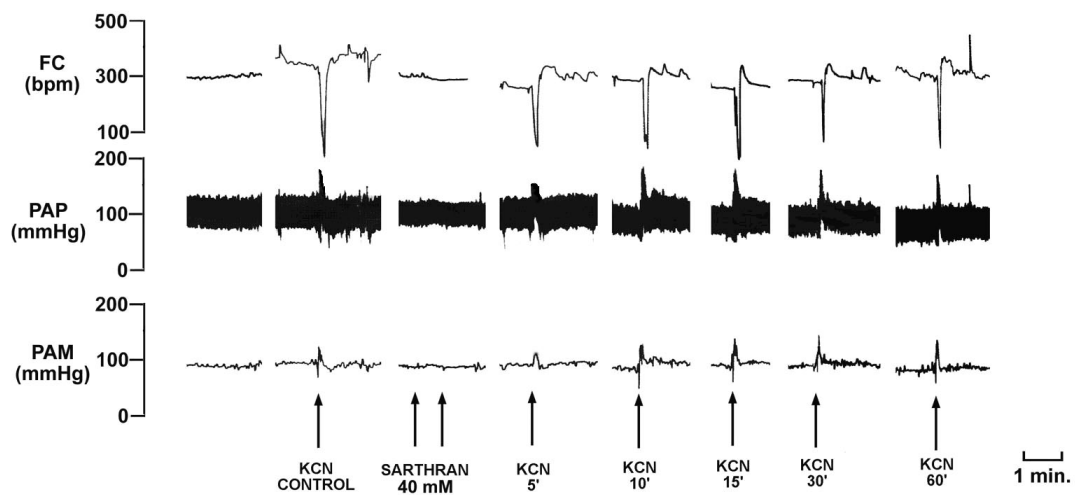
**Figura 15:** Fotomicrografia de uma secção transversal tronco cerebral de um rato, mostrando o trajeto e o sítio unilateral de microinjeção no núcleo facial (NF) realizada involuntariamente (aumento de 50 x).



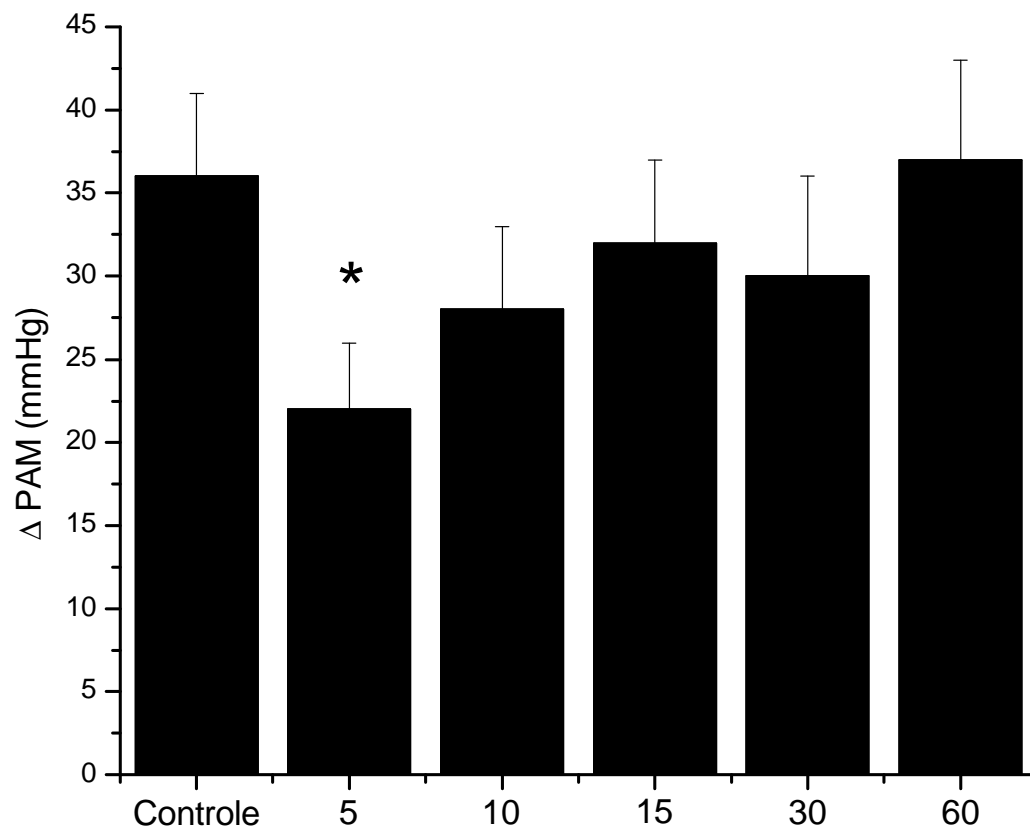
***4 – Efeito do Sartran, antagonista dos receptores de angiotensina, no RVLM bilateralmente sobre as respostas cardiovasculares do quimiorreflexo no rato acordado:***

A figura 16 ilustra um traçado representativo de um animal do grupo, mostrando as alterações na pressão arterial média, pressão arterial pulsátil e frequência cardíaca em resposta à ativação do quimiorreflexo, antes e após a microinjeção bilateral do Sartran no RVLM de ratos acordados. Na figura 17, observamos que a resposta pressora do quimiorreflexo foi significativamente alterada aos 5 minutos após a microinjeção bilateral de Sartran ( $+22 \pm 5$  mmHg), entretanto esta resposta não foi alterada aos 10, 15, 30 ou 60 minutos ( $28 \pm 5$ ;  $32 \pm 5$ ;  $30 \pm 6$  e  $37 \pm 6$  mmHg respectivamente) após a microinjeção bilateral do Sartran no RVLM, em relação à resposta controle ( $36 \pm 5$  mmHg). O tempo de duração da resposta pressora do quimiorreflexo não foi alterada aos 5, 10, 15, 30 e 60 minutos após a microinjeção bilateral do Sartran no RVLM ( $10 \pm 2$ ;  $10 \pm 3$ ;  $9 \pm 1$ ;  $12 \pm 6$  e  $14 \pm 6$  segundos, respectivamente) em comparação ao tempo de duração da resposta pressora controle ( $15 \pm 4$  segundos), como representado na figura 18. Na figura 19 apresentamos graficamente os níveis de pressão arterial basal antes e após a microinjeção bilateral de Sartran no RVLM ( $100 \pm 2$  vs  $106 \pm 9$  mmHg,  $n=8$ ). A figura 20 mostra a fotomicrografia do tronco cerebral de um animal do grupo, ilustrando os sítios de microinjeção bilateral do Sartran no RVLM. Vale, ainda ressaltar que a microinjeção bilateral do veículo (aCSF) não promoveu qualquer alteração na resposta pressora do quimiorreflexo aos 5, 10, 15, 30 e 60 ( $39 \pm 2$ ;  $37 \pm 2$ ;  $40 \pm 3$ ;  $30 \pm 3$  e  $36 \pm 1$  mmHg, respectivamente) minutos em relação à resposta pressora controle ( $36 \pm 3$  mmHg) . Os

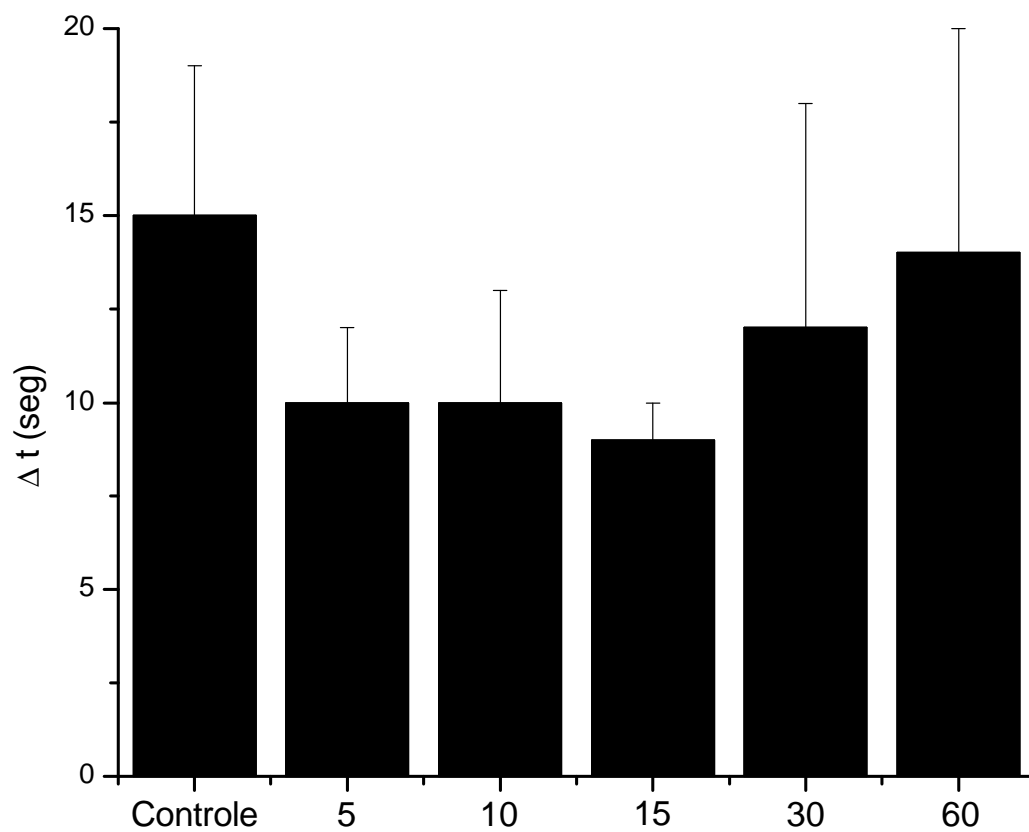
dados referentes aos presentes experimentos estão apresentados nas tabelas 6 e 7 do apêndice.



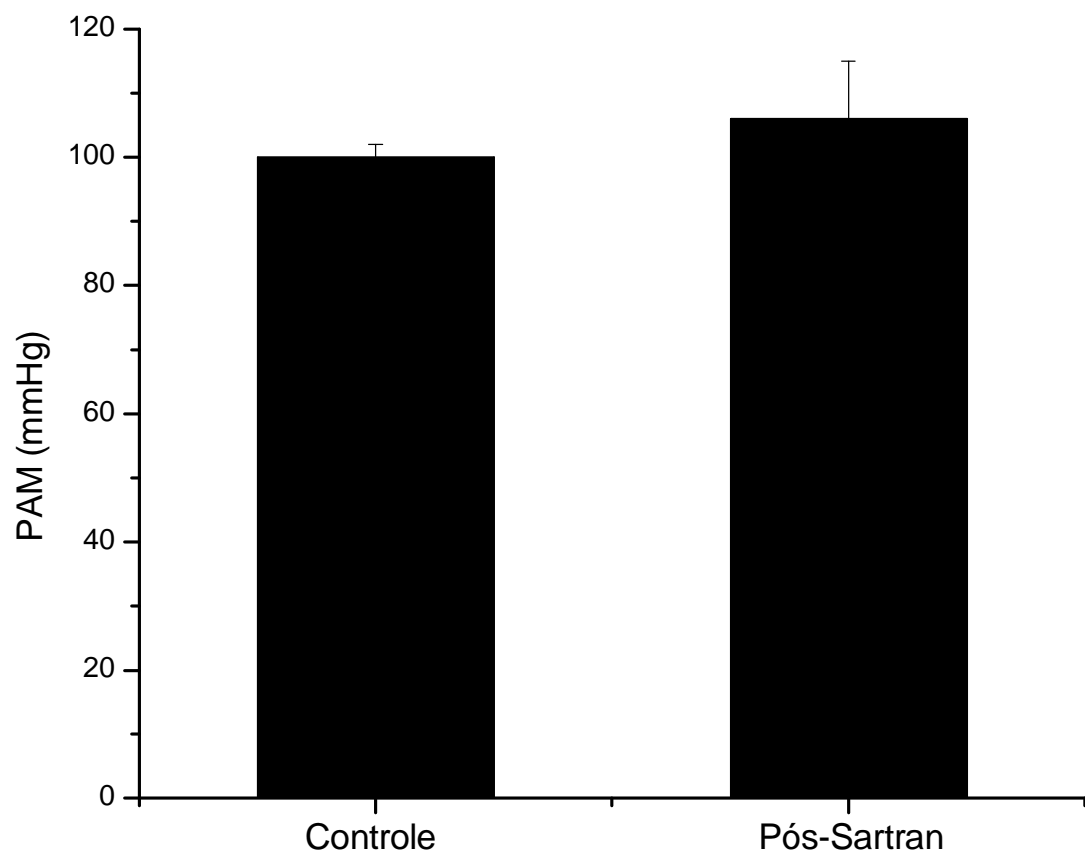
**Figura16:** Traçados de um animal representativo do grupo, mostrando as alterações na frequência cardíaca (FC), pressão arterial pulsátil (PAP) e pressão arterial média (PAM) em resposta à ativação do quimiorreflexo antes (KCN CONT) e aos 5, 10, 15, 30 e 60 minutos após a microinjeção bilateral do Sartran (SAR – 40 mM) no RVLM de ratos acordados (n=8).



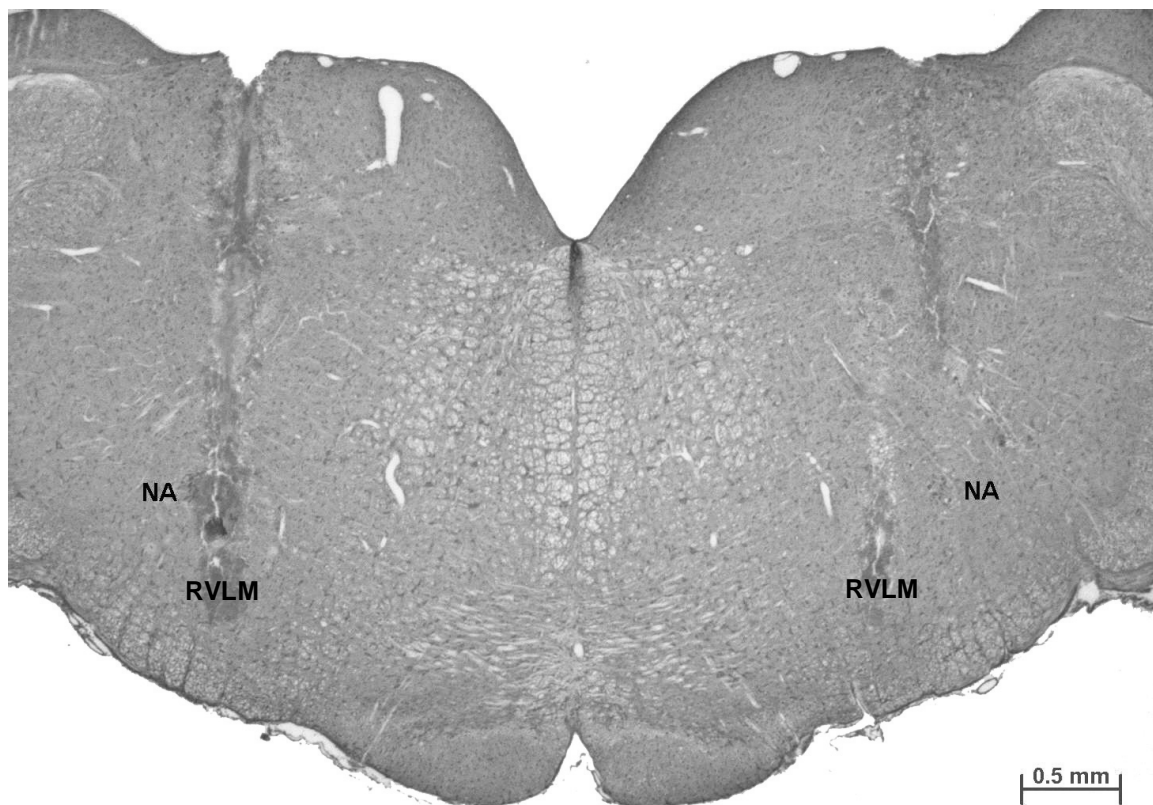
**Figura 17:** Resposta pressora ( $\Delta$ PAM) à ativação do quimiorreflexo antes (Controle) e aos 5, 10, 15, 30 e 60 minutos após a microinjeção bilateral do Sartran no RVLM de ratos acordados (40 mM, n=8;  $p < 0,05$ ).



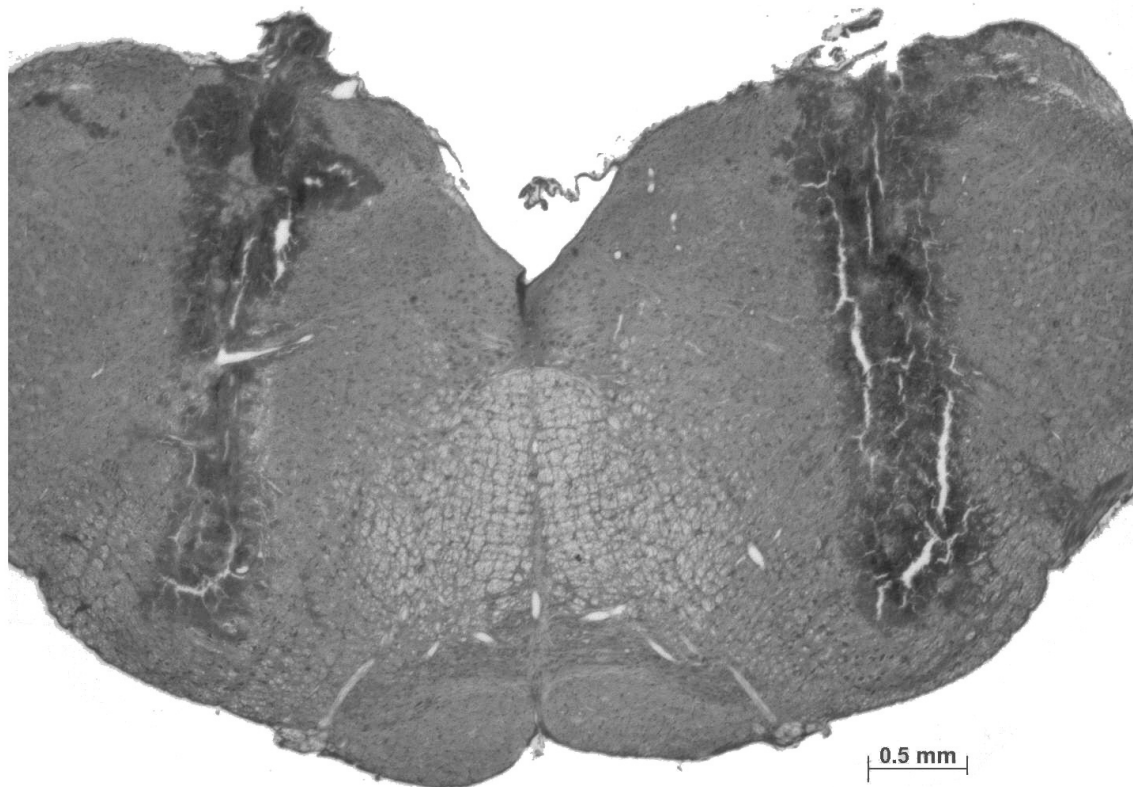
**Figura 18:** Duração da resposta pressora ( $\Delta t$ ) à ativação do quimiorreflexo antes (Controle) e 5, 10, 15, 30 e 60 minutos após a microinjeção de Sartran bilateralmente no RVLM de ratos acordados (40 mM, n=8).



**Figura 19:** Valores basais da pressão arterial média (PAM) antes (CONT) e após (PÓS SARTRAN) a microinjeção bilateral de Sartran no RVLM de ratos acordados (40 mM, n=8).



**Figura 20:** Fotomicrografia do tronco cerebral de um animal representativo do grupo, mostrando os sítios de microinjeção bilateral no RVLM (aumento = 40 x)



**Figura 21:** Fotomicrografia de uma secção transversal tronco cerebral de um rato, mostrando os trajetos e os sítios bilaterais de microinjeção no RVLm, mas que entretanto forma considerados negativos pela grande área de lesão e pela quantidade de sangue nos trajetos e sítios de microinjeção (aumento de 30 x).

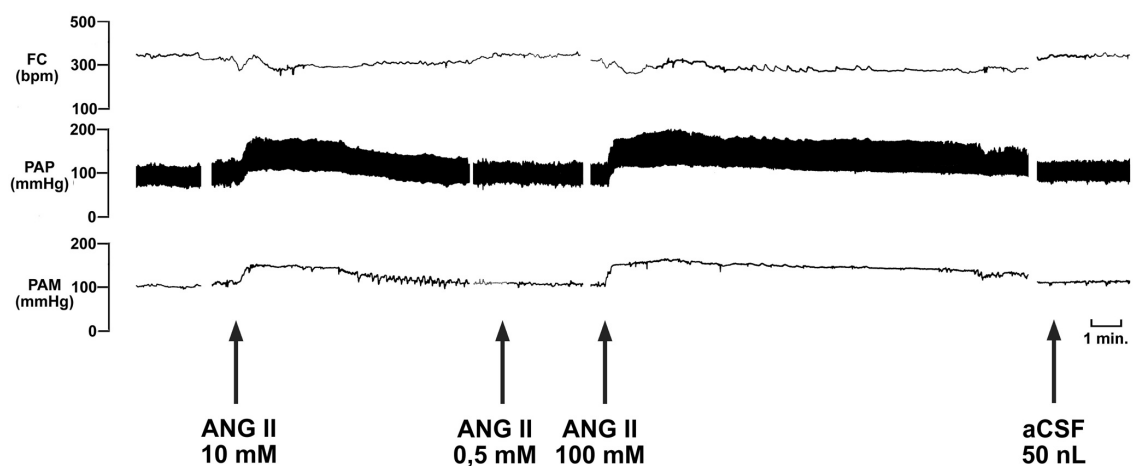


**5 - Curva concentração-resposta à microinjeção de diferentes concentrações de angiotensina II no NTS de ratos acordados:**

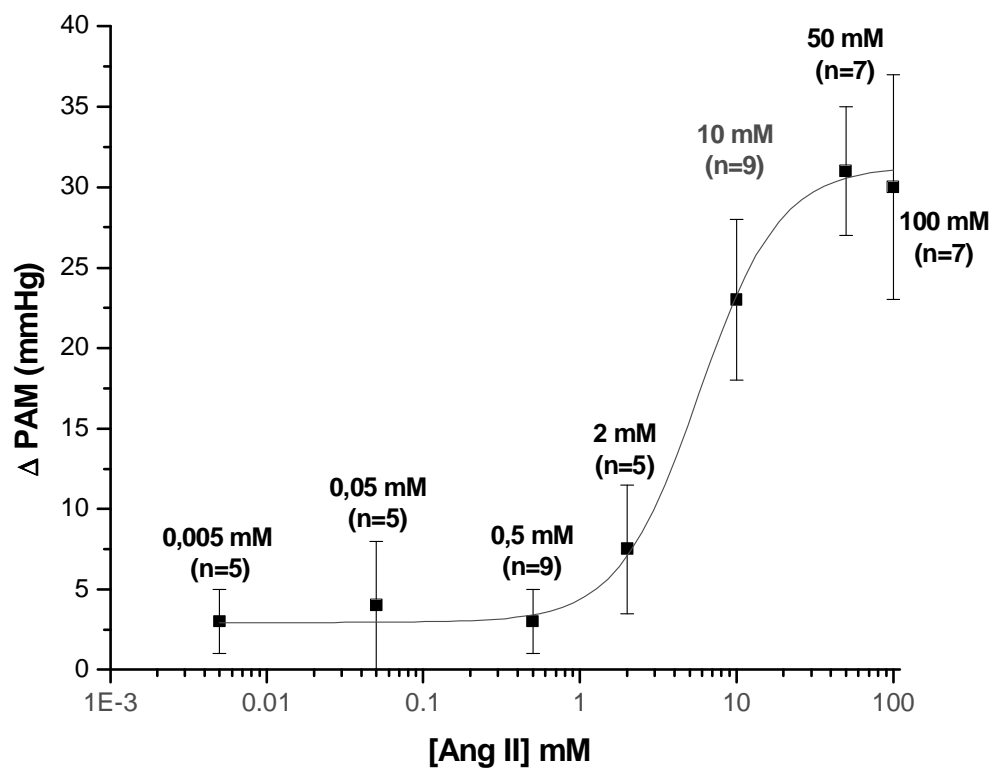
A figura 22 apresenta os traçados obtidos em um rato representativo do grupo, mostrando as alterações cardiovasculares, concentração-dependentes à microinjeção de angiotensina II no RVLN. As respostas pressoras seguiram um padrão concentração-dependente:  $+3\pm 12$ ;  $+4\pm 4$ ;  $+3\pm 2$  +  $7\pm 4$ ;  $+23\pm 6$ ;  $+31\pm 5$  e  $+30\pm 7$  mmHg nas concentrações de 0,005; 0,05; 0,5; 2, 10, 50 e 100 mM respectivamente, como apresentado na figura 23, sendo que a concentração que causa 50% do efeito máximo foi a de 10 mM. Vale ressaltar que a microinjeção de 50 nL do veículo (aCSF) no NTS não promoveu resposta pressora ( $0\pm 0$  mmHg). O número de animais que recebeu cada uma das concentrações variou de 5 a 9. A figura 24 expressa a duração da resposta pressora à microinjeção de angiotensina II no NTS de ratos acordados ( $57\pm 40$ ;  $40\pm 40$ ;  $60\pm 37$ ;  $277\pm 112$ ;  $296\pm 49$ ;  $796\pm 148$  e  $715\pm 218$  segundos para as concentrações de 0,005; 0,05; 0,5; 2,0; 10; 50 e 100 mM respectivamente). A figura 25 é uma fotomicrografia do tronco cerebral de um animal representativo do grupo, mostrando o sítio de microinjeção da angiotensina II em animais acordados.

Observamos ainda, que a microinjeção involuntária de angiotensina II em sítios adjacentes ao NTS, foi capaz de promover resposta pressora semelhante àquela obtida quando da microinjeção do peptídeo foi feita no NTS. Entretanto, após a análise histológica criteriosa, verificamos que as microinjeções realizadas em sítios adjacentes ao NTS foram feitas em regiões muito próximas deste núcleo. Desta forma, não podemos assegurar se a resposta pressora à microinjeção de angiotensina II fora do NTS é ou não

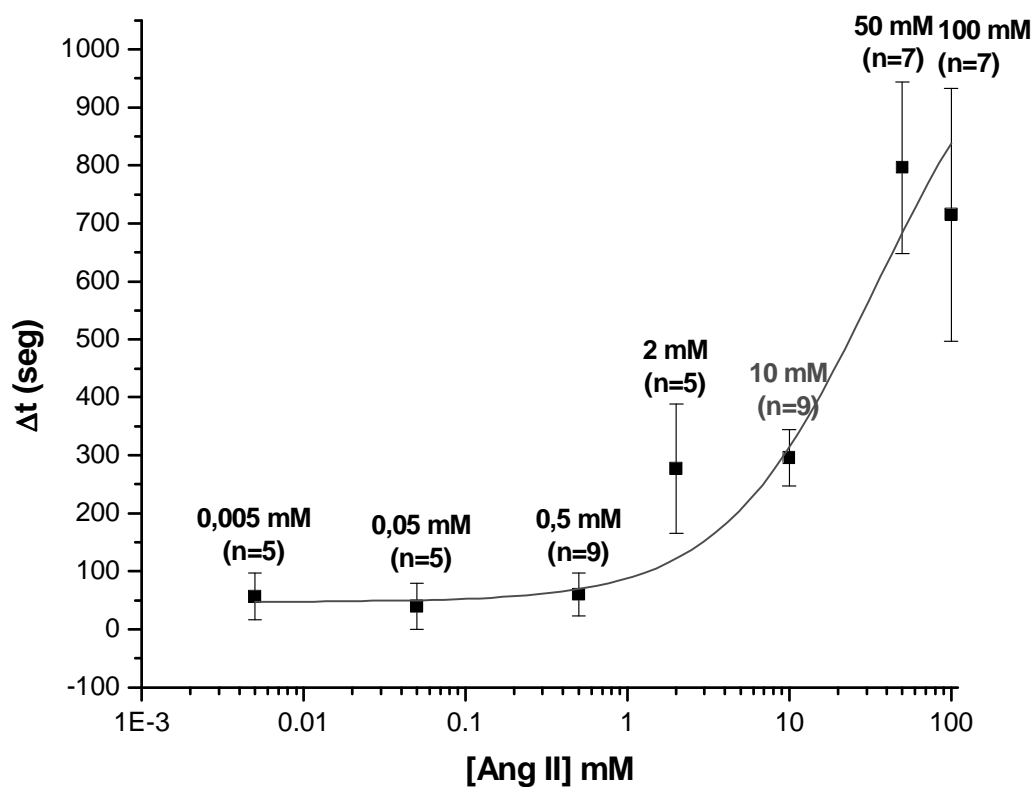
devida à difusão da solução microinjetada até o NTS, cuja ativação pela angiotensina II poderia ser responsável pela resposta pressora observada. Outra possibilidade seria a difusão da angiotensina II microinjetada para o fluido cérebro-espinal atingindo outros núcleos envolvidos com a via simpato-excitatória do quimiorreflexo. Na figura 26, mostramos uma curva concentração-resposta da resposta pressora à microinjeção de angiotensina II em sítios adjacentes ao NTS, em semelhança àquela representada na figura 23. Apresentamos ainda, na figura 27, a curva concentração-resposta relacionada ao tempo de duração da resposta pressora à microinjeção de angiotensina II em sítios adjacentes ao NTS e, na figura 28, ilustramos uma típica histologia do tronco cerebral de um animal cujo centro da microinjeção está fora do NTS mas que a microinjeção de angiotensina II promoveu resposta pressora semelhante àquela observada quando da microinjeção deste peptídeo no NTS. Os dados referentes ao presente experimento encontram-se nas tabelas 8 e 9 do apêndice.



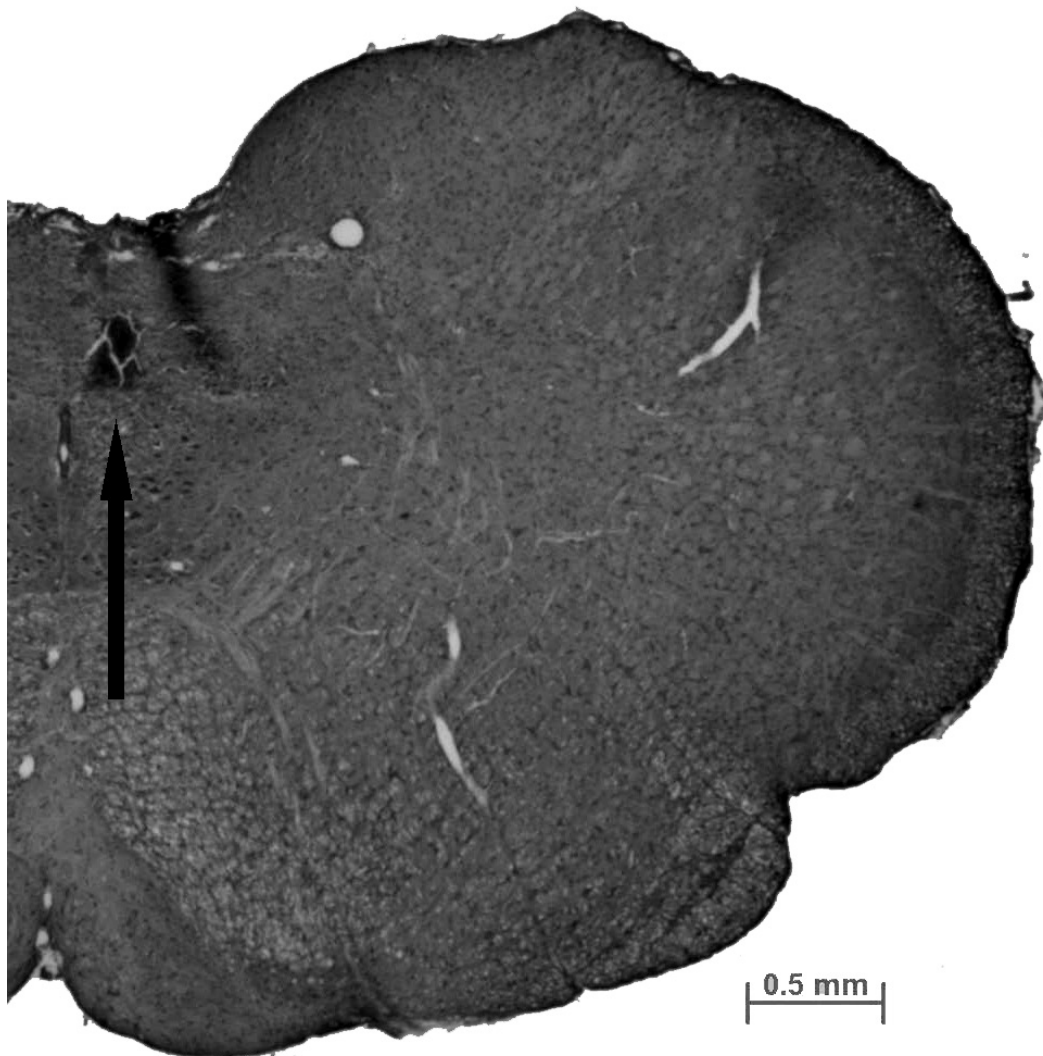
**Figura 22:** Traçados de um animal, representativo do grupo, mostrando as alterações concentração-dependentes na pressão arterial em resposta à microinjeção de angiotensina II (0,5; 10 e 100 mM) no NTS e a ausência de alterações em resposta à micronejeção de aCSF.



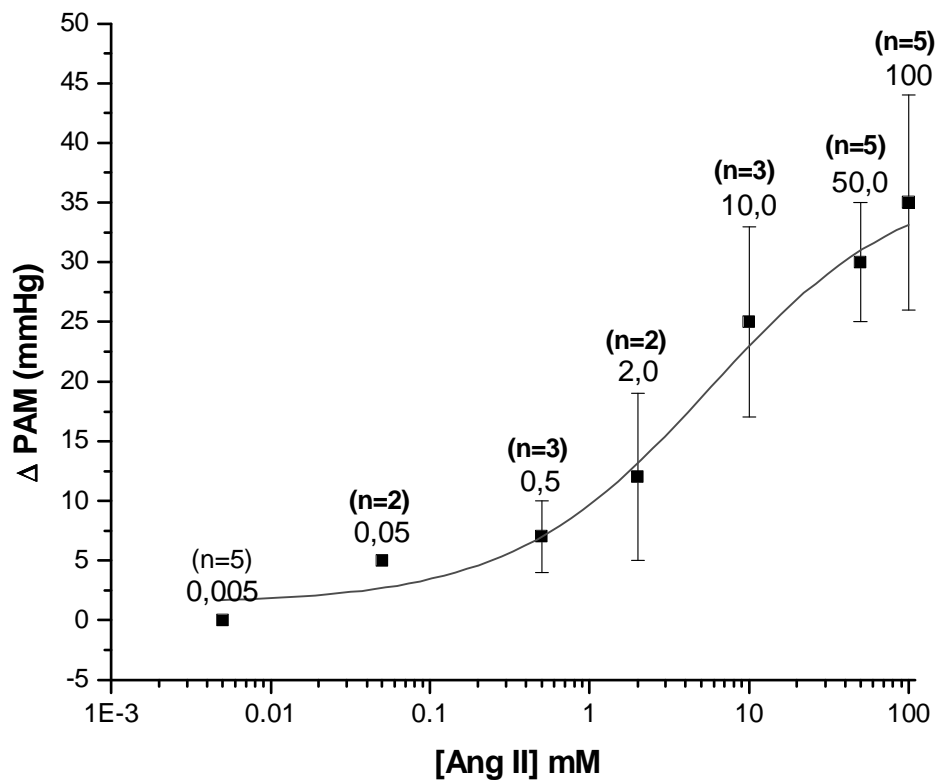
**Figura 23:** Alterações concentração-dependentes na resposta pressora ( $\Delta$ PAM) à microinjeção de diferentes concentrações de angiotensina II (0,005; 0,05; 0,5; 2,0; 10; 50 e 100 mM) no NTS de ratos acordados. Entre parênteses estão apresentados os números de animais que receberam cada uma das concentrações. 1E-3 corresponde a  $1 \times 10^{-3}$ .



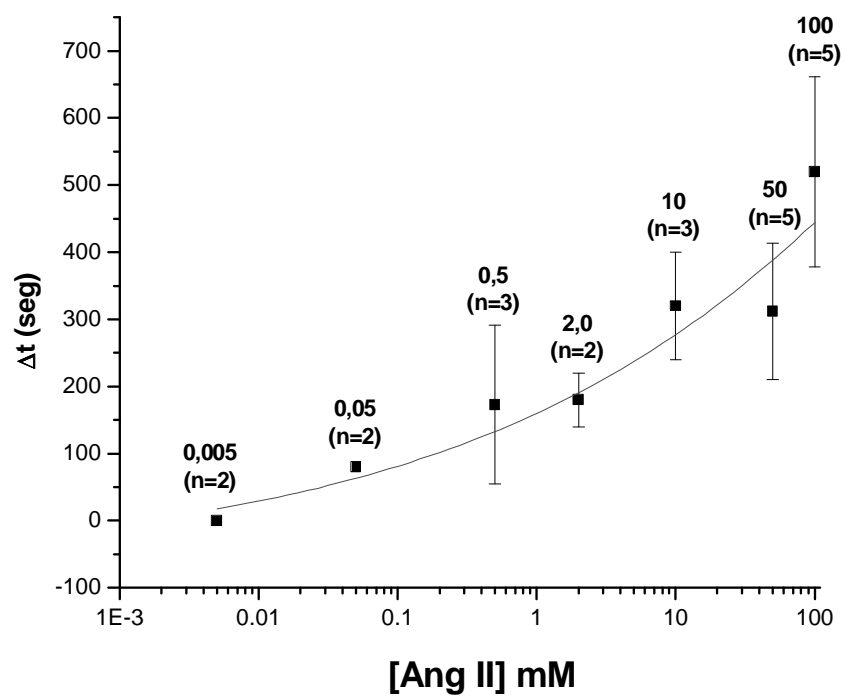
**Figura 24:** Alterações concentração-dependentes na duração da resposta pressora ( $\Delta t$ ) à microinjeção de diferentes concentrações de Angiotensina II (0,005; 0,05; 0,5; 2; 10; 50 e 100 mM) no NTS de ratos acordados. Entre parênteses estão apresentados os números de animais que receberam cada uma das concentrações. 1E-3 corresponde a  $1 \times 10^{-3}$ .



**Figura 25:** Fotomicrografia de uma secção transversal do tronco cerebral de um animal, representativo do grupo. A seta indica o sítio de microinjeção no NTS (Aumento de 40x).

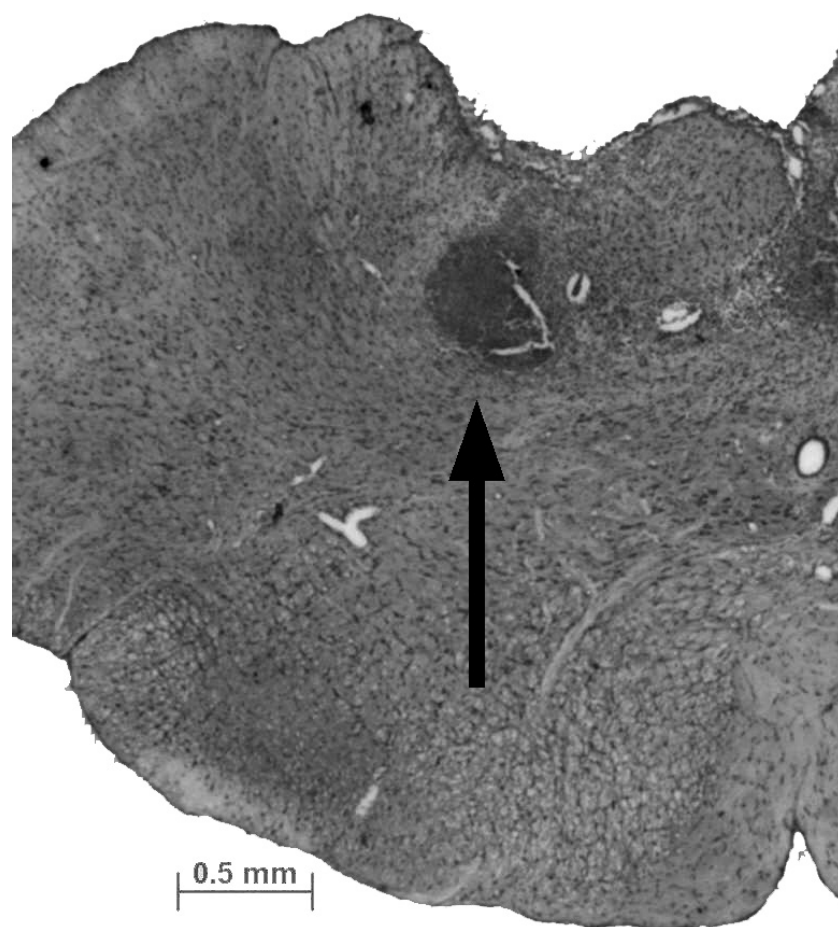


**Figura 26:** Curva concentração-resposta da alteração da pressão arterial ( $\Delta$  PAM) em resposta à microinjeção de angiotensina II fora do NTS. Entre parênteses estão apresentados os números de animais que receberam cada uma das concentrações. . 1E-3 corresponde a  $1 \times 10^{-3}$ .



**Figura 27:** Curva concentração-resposta da duração da resposta pressora ( $\Delta t$ ) à microinjeção de angiotensina II fora do NTS. Entre parênteses estão apresentados os números de animais que receberam cada uma das concentrações. 1E-3 corresponde a  $1 \times 10^{-3}$ .





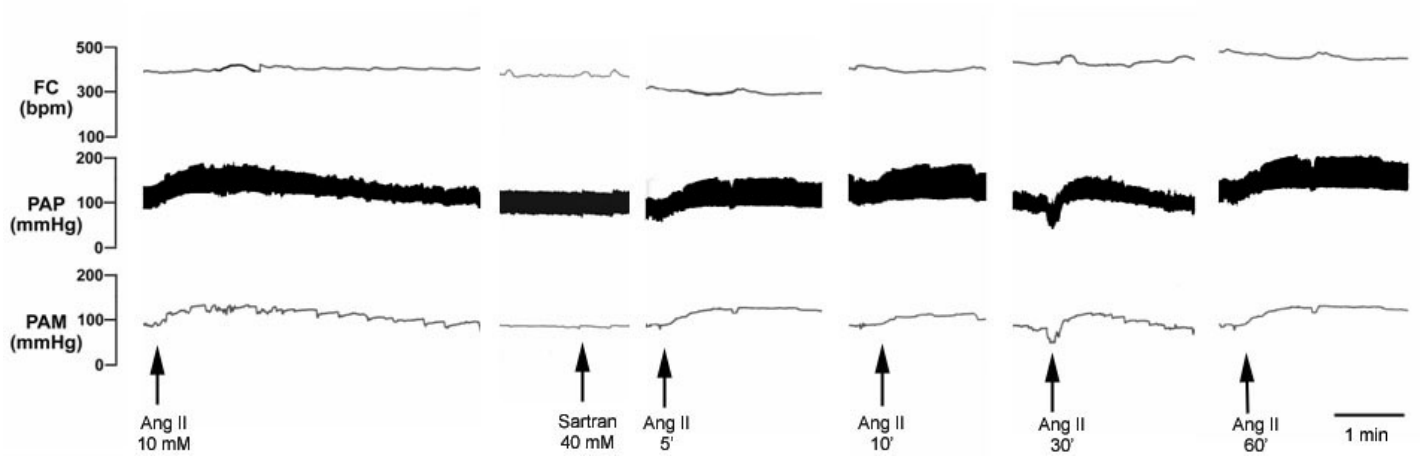
**Figura 28:** Fotomicrografia do tronco cerebral de um animal do grupo, mostrando o sítio de microinjeção fora do NTS. A seta indica o centro da microinjeção localizado lateral ao NTS (aumento de 40x).

***6 – Padronização da concentração efetiva do Sartran, antagonista dos receptores de angiotensina, no bloqueio das respostas cardiovasculares à microinjeção de angiotensina II no NTS de ratos acordados:***

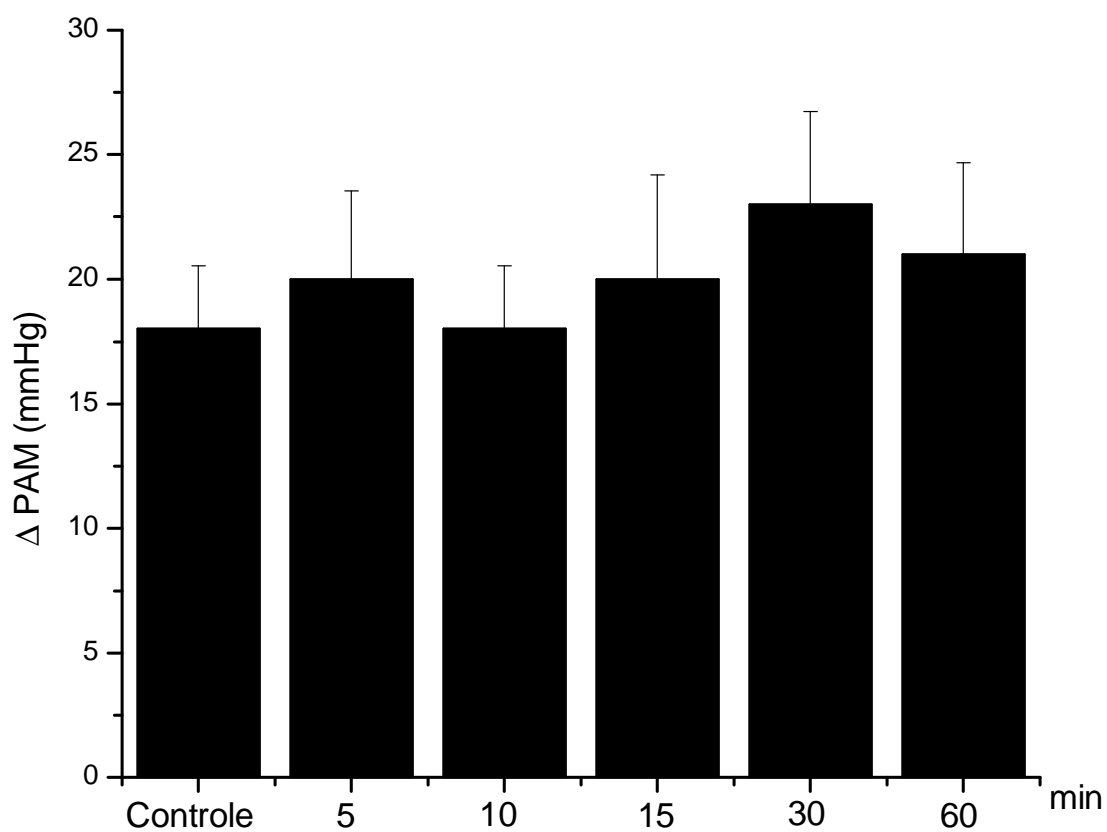
A figura 29 representa traçados de um animal representativo do grupo, mostrando as alterações na pressão arterial antes e após a microinjeção do Sartran na concentração de 40 mM. Observamos que a microinjeção de angiotensina II no NTS de ratos acordados, produziu uma resposta pressora ( $+18 \pm 3$  mmHg,  $n=5$ ) que não foi atenuada pela microinjeção de Sartran aos 5, 10, 15, 30 ou 60 minutos ( $+20 \pm 4$ ;  $+18 \pm 3$ ;  $+20 \pm 4$ ;  $+23 \pm 4$ ;  $+21 \pm 4$  mmHg, respectivamente), como expresso na figura 30. A duração da resposta pressora também não foi significativamente reduzida pela prévia microinjeção do Sartran, uma vez que a microinjeção deste antagonista não alterou o tempo de duração da resposta pressora à microinjeção de angiotensina II aos 5, 10, 15, 30 ou 60 após a microinjeção do antagonista ( $320 \pm 46$ ;  $344 \pm 20,14$ ;  $428 \pm 90,24$ ;  $384 \pm 62,73$  e  $356 \pm 41,18$  segundos, respectivamente) em relação à resposta controle ( $360 \pm 57$  segundos). Os valores relativos à análise da duração da resposta pressora estão apresentados na figura 31.

Como não conseguimos bloqueio significativo da resposta pressora a microinjeção de angiotensina II no NTS de ratos acordados com a microinjeção de 20 mM do antagonista, decidimos realizar protocolo semelhante, porém microinjetando 50 nL de uma solução de 40 mM do antagonista. Com efeito, observamos que a microinjeção desta concentração do Sartran promoveu redução da magnitude da resposta pressora à microinjeção de angiotensina II aos 5, 10, 15, 30 e 60 minutos, após a

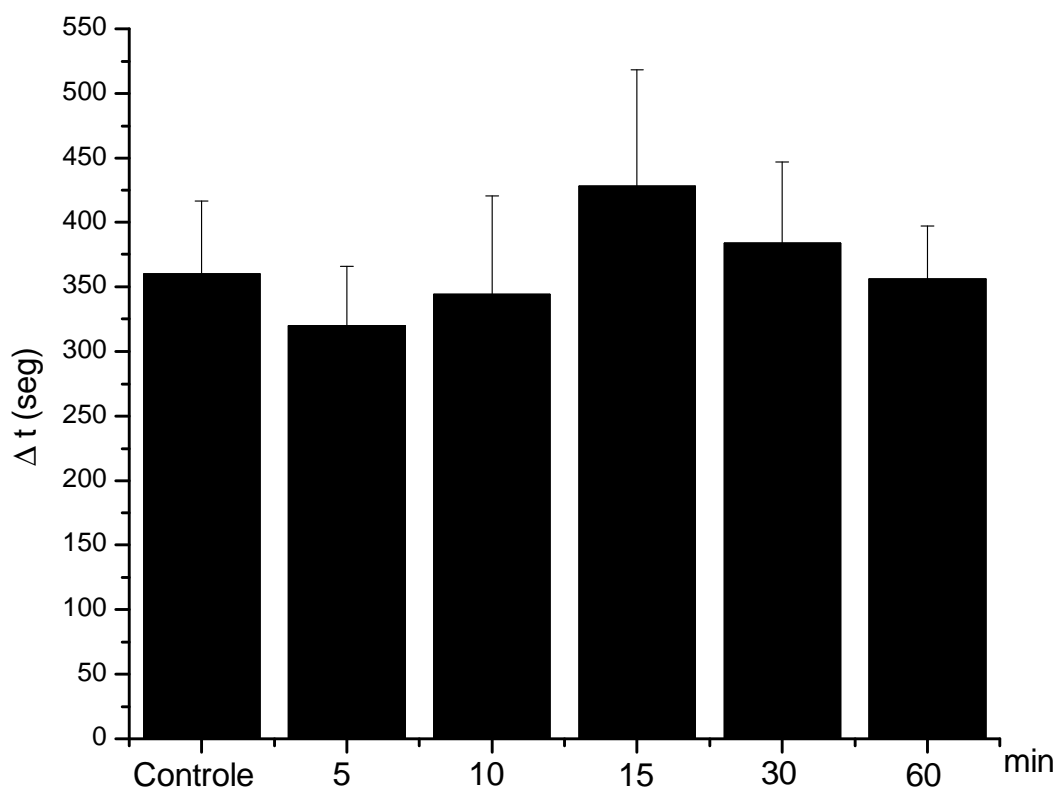
microinjeção do Sartran na concentração de 40 mM ( $+18 \pm 4$ ;  $+22 \pm 5$ ;  $+18 \pm 4$ ;  $+22 \pm 4$  e  $+23 \pm 4$  mmHg, respectivamente, n=10) em relação a resposta controle ( $+33 \pm 4$  mmHg) (Figura 32). Efeito semelhante foi observado na duração desta resposta pressora (Figura 33), onde a microinjeção do sartran reduziu significativamente a duração da resposta pressora à microinjeção de angiotensina II em todos os tempos avaliados ( $101 \pm 28$ .  $156 \pm 58$ ;  $251 \pm 94$ ;  $126 \pm 48$  e  $145 \pm 49$  segundos, respectivamente, n=10) em relação a resposta controle ( $340 \pm 76$  segundos). Como o bloqueio foi efetivo, a concentração de 40 mM passou a ser testada contra o quimiorreflexo. Vale ainda ressaltar que a microinjeção do veículo (aCSF) não atenuou a resposta pressora à microinjeção de Angiotensina no NTS de animais acordados ( $+26 \pm 2$  vs.  $+27 \pm 2$ ;  $+30 \pm 2$ ;  $+30 \pm 3$ ;  $+27 \pm 3$  e  $+32 \pm 4$  mmHg, n=5). Os dados referentes ao presente experimento encontram-se nas tabelas 10, 11 e 12 do apêndice.



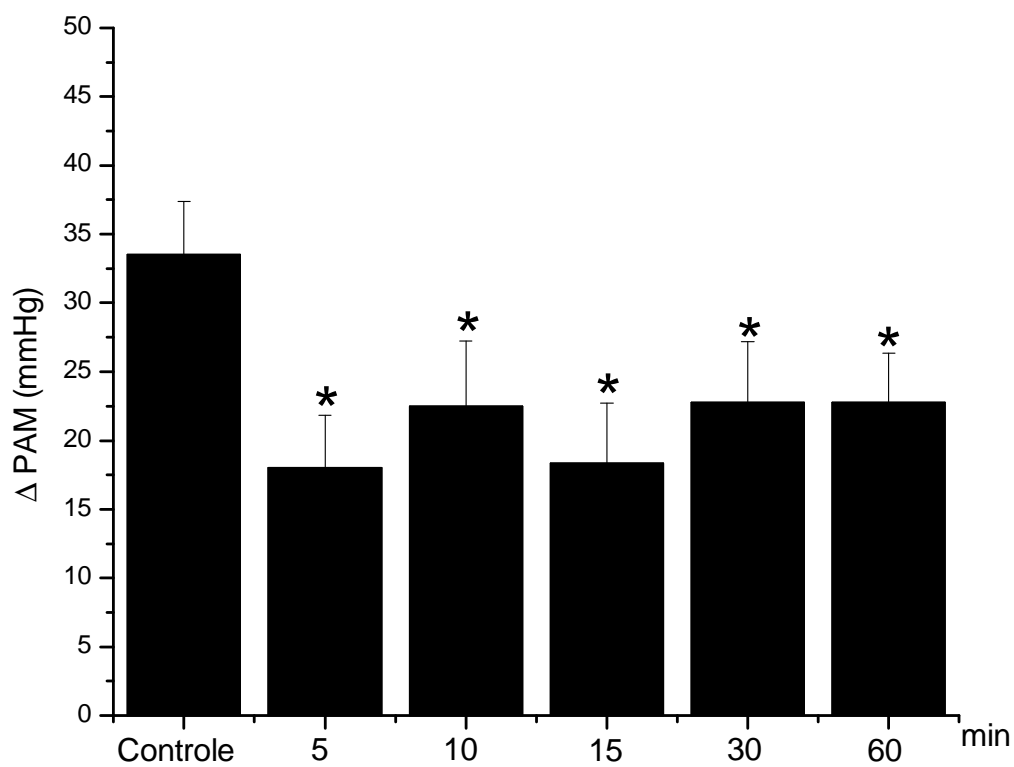
**Figura 29:** Traçados de um animal representativo do grupo, mostrando as respostas cardiovasculares na frequência cardíaca (FC), pressão arterial pulsátil (PAP) e na pressão arterial média em resposta às microinjeções de angiotensina II no NTS, antes e aos 5, 10, 15, 30 e 60 min após a microinjeção de Sartran (40 mM).



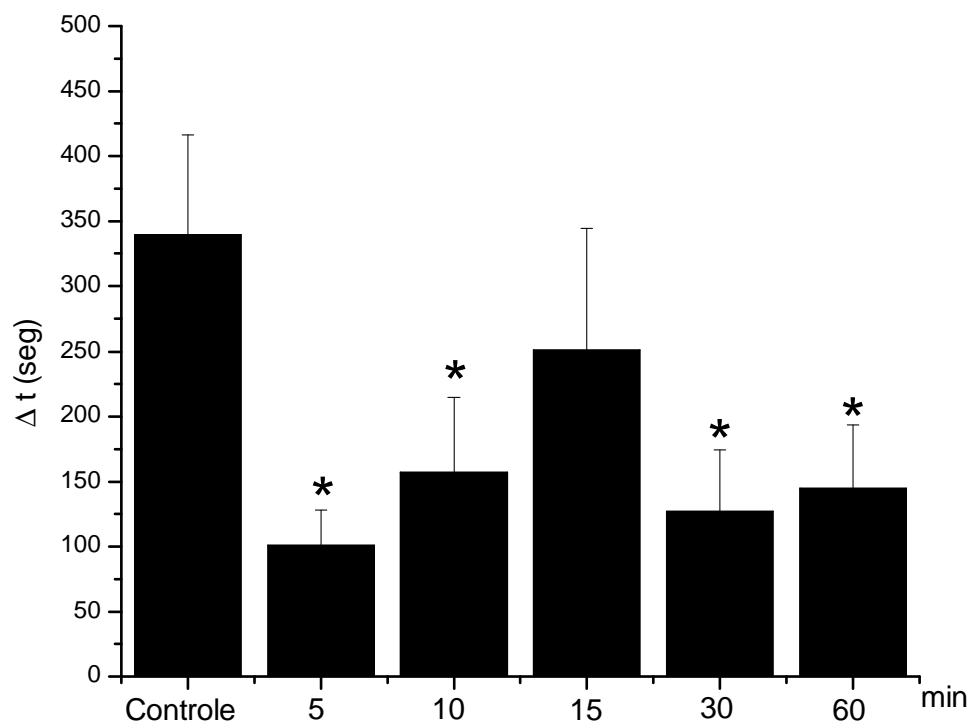
**Figura 30:** Resposta ( $\Delta$  PAM) pressora à microinjeção de angiotensina II no NTS de ratos acordados, antes (controle) e 5, 10, 15, 30 e 60 min após a microinjeção de Sartran (20 mM) no NTS, (n= 5).



**Figura 31:** Duração das repostas pressoras às microinjeções de angiotensina II no NTS de ratos acordados, antes (controle) e 5, 10, 15, 30 e 60 min após a microinjeção de Sartran (20 mM) no NTS, (n= 5).



**Figura 32:** Repostas pressoras às microinjeções de angiotensina II no NTS de ratos acordados, antes (controle) e 5, 10, 15, 30 e 60 minutos após a microinjeção de Sartran (40 mM), (n= 10) no NTS. (\*) Diferente do controle (p<0,05).

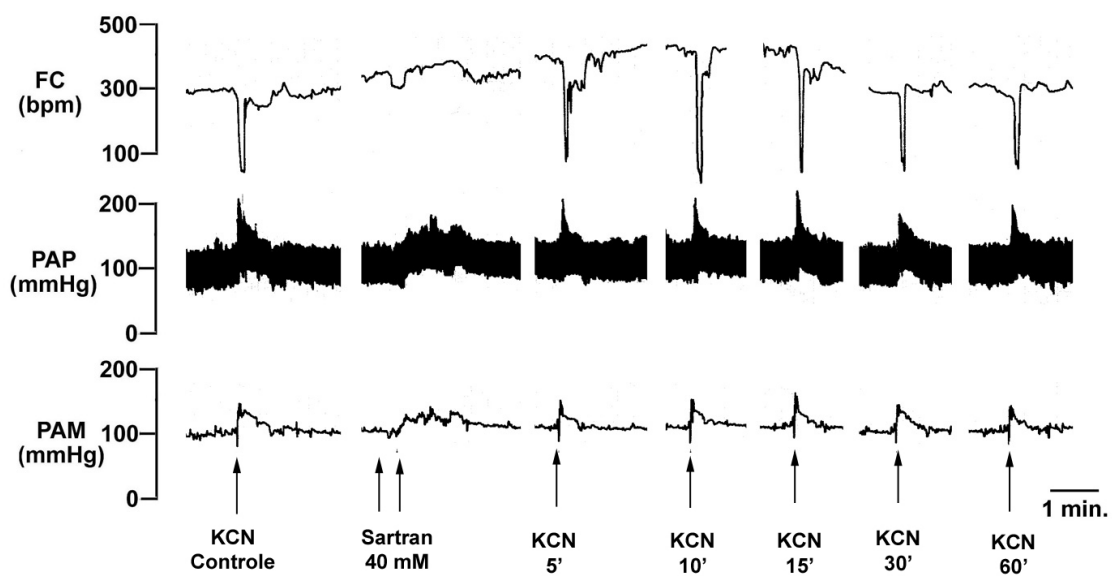


**Figura 33:** Duração das repostas pressoras às microinjeções de angiotensina II no RVLM de ratos acordados, antes (controle) e 5, 10, 15, 30 e 60 minutos após a microinjeção de Sartran (40 mM) no NTS, (n= 7).(\*) Diferente do controle (p<0,05).

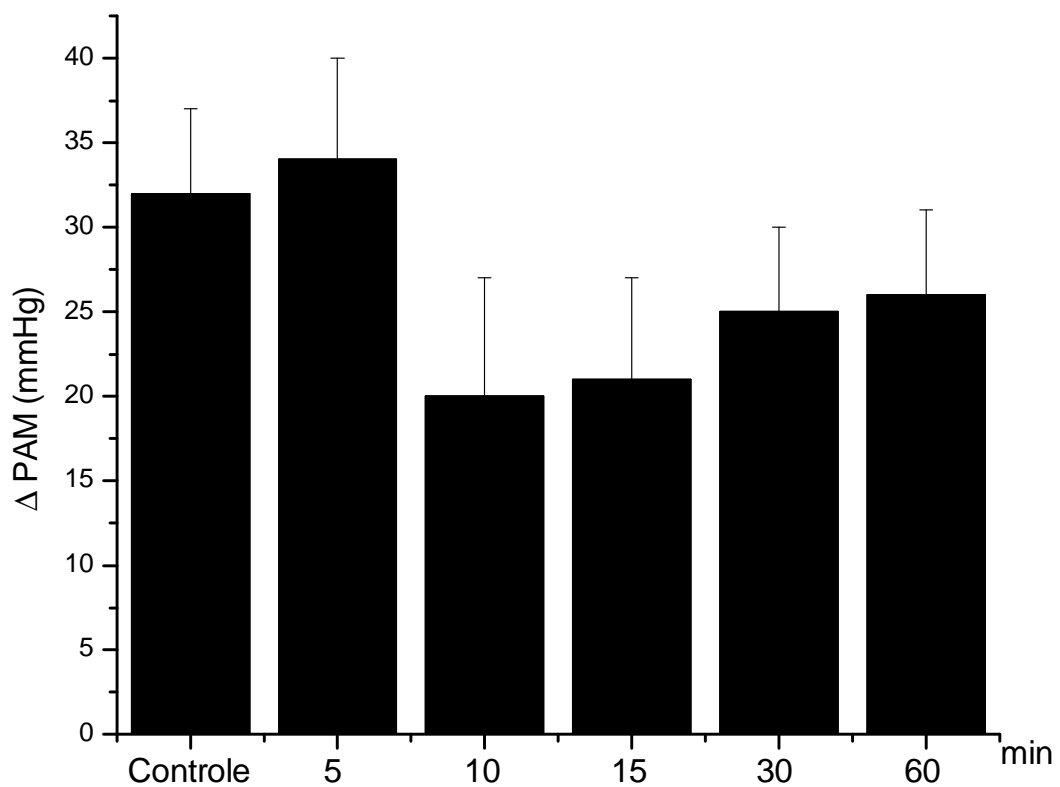


***7 – Efeito do Sartran, antagonista dos receptores de angiotensina, no NTS bilateralmente sobre as respostas cardiovasculares do quimiorreflexo no rato acordado:***

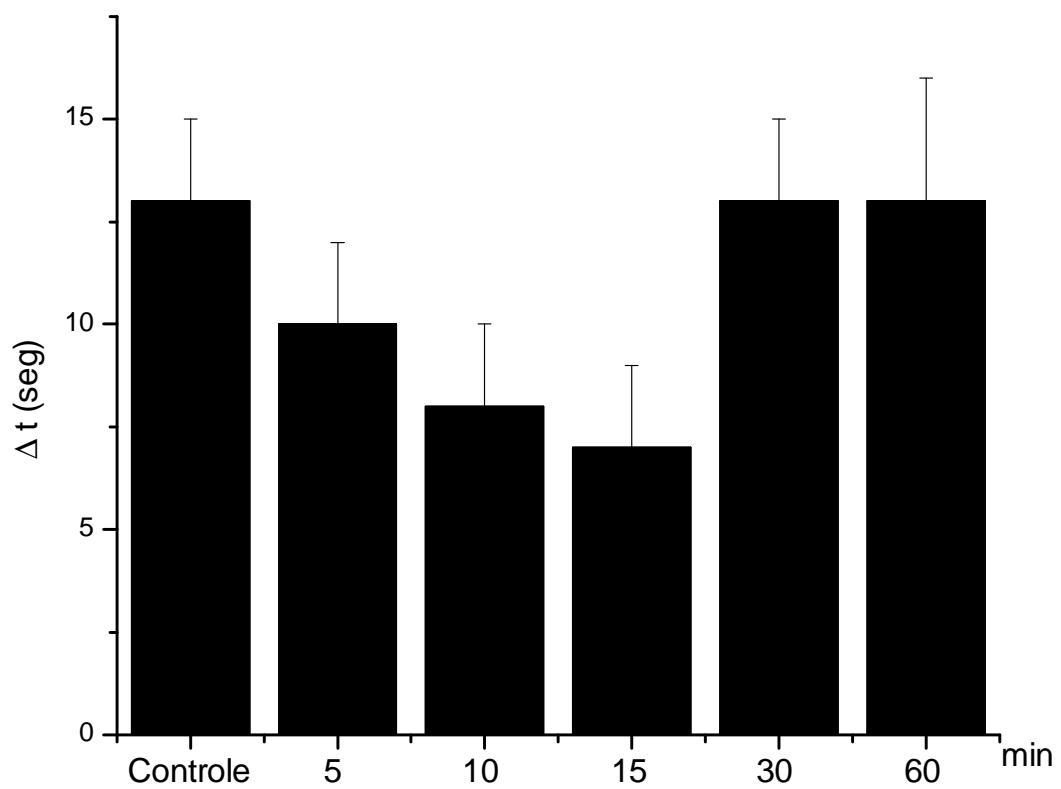
A figura 34 ilustra traçados representativos de um animal do grupo, mostrando as alterações na pressão arterial média, pressão arterial pulsátil e frequência cardíaca em resposta à ativação do quimiorreflexo, antes e após a microinjeção bilateral do Sartran no NTS de ratos acordados. Na figura 35, observamos que a resposta pressora do quimiorreflexo não foi significativamente alterada aos 5, 10, 15, 30 e 60 minutos após a microinjeção bilateral de Sartran ( $+24 \pm 6$ ,  $+20 \pm 7$ ,  $+21 \pm 6$ ,  $+25 \pm 5$  e  $+26 \pm 5$  mmHg), no NTS de ratos acordados, em relação à resposta controle ( $+31 \pm 5$  mmHg). O tempo de duração da resposta pressora do quimiorreflexo não foi alterada aos 5, 10, 15, 30 e 60 minutos após a microinjeção bilateral do Sartran no NTS ( $10 \pm 2$ ;  $8 \pm 2$ ;  $7 \pm 2$ ;  $13 \pm 2$  e  $13 \pm 3$  segundos, respectivamente) em comparação ao tempo de duração da resposta pressora controle ( $13 \pm 2$  segundos), como representado na figura 36. Na figura 37 apresentamos graficamente os níveis de pressão arterial basal antes e após a microinjeção bilateral de Sartran no NTS ( $103 \pm 1$  vs  $123 \pm 6$  mmHg,  $n=7$ ). A figura 38 mostra a fotomicrografia do tronco cerebral de um animal do grupo, ilustrando os sítios de microinjeção bilateral do Sartran no NTS. Vale, ainda ressaltar que a microinjeção bilateral do veículo (aCSF) não promoveu qualquer alteração na resposta pressora do quimiorreflexo aos 5, 10, 15, 30 e 60 ( $35 \pm 3$ ;  $32 \pm 3$ ;  $38 \pm 2$ ;  $30 \pm 2$  e  $37 \pm 3$  mmHg, respectivamente) minutos em relação à resposta pressora controle ( $35 \pm 2$  mmHg). Os dados referentes aos presentes experimentos estão apresentados na tabela 13 do apêndice.



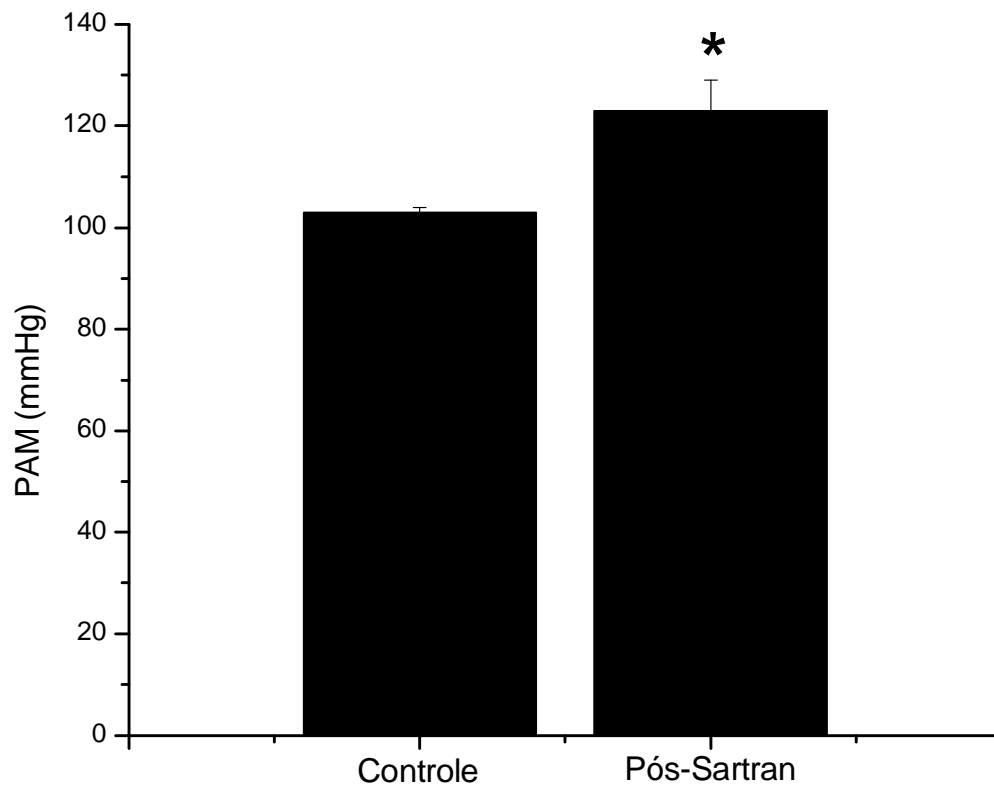
**Figura 34:** Traçados de um animal representativo do grupo, mostrando as alterações na frequência cardíaca (FC), pressão arterial pulsátil (PAP) e pressão arterial média (PAM) em resposta à ativação do quimiorreflexo antes (KCN CONT) e aos 5, 10, 15, 30 e 60 minutos após a microinjeção bilateral do Sartran (40 mM) no NTS de ratos acordados (n=7).



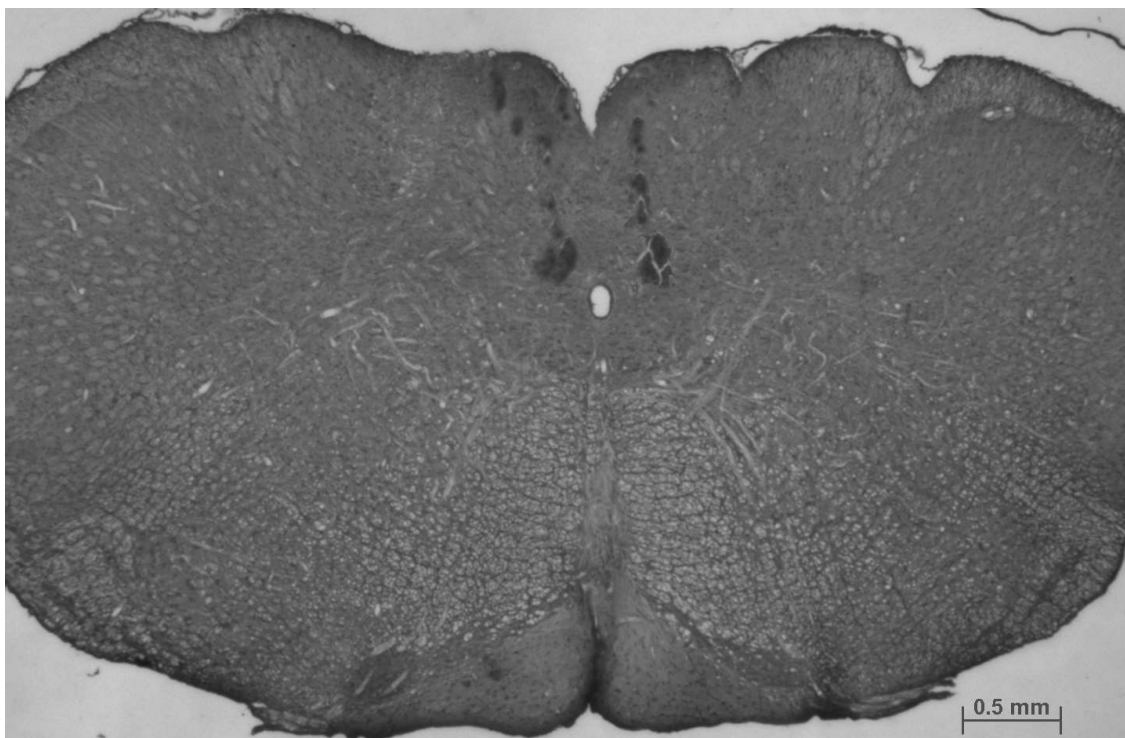
**Figura 35:** Resposta pressora ( $\Delta PAM$ ) à ativação do quimiorreflexo antes (Controle) e aos 5, 10, 15, 30 e 60 minutos após a microinjeção bilateral do Sartran no NTS de ratos acordados (40 mM, n=7).



**Figura 36:** Duração da resposta pressora ( $\Delta t$ ) à ativação do quimiorreflexo antes (Controle) e 5, 10, 15, 30 e 60 minutos após a microinjeção de Sartran bilateralmente no NTS de ratos acordados (40 mM, n=7).



**Figura 37:** Valores basais da pressão arterial média (PAM) antes (Controle) e após (Pós-Sartran) a microinjeção bilateral de Sartran no NTS de ratos acordados (40 mM, n=7).



**Figura 38:** Fotomicrografia do tronco cerebral de um animal representativo do grupo, mostrando os sítios de microinjeção bilateral no NTS (aumento = 40 x)

**B – Experimentos em neurônios isolados:**

***1 - Avaliação do efeito farmacológico da angiotensina sobre neurotransmissão glutamatérgica e GABAérgica em sinapses dos neurônios dispersados mecanicamente do NTS comissural:***

Neste protocolo, observamos as alterações na frequência e na amplitude das correntes excitatórias pós-sinápticas (CEPs) e das correntes inibitórias pós-sinápticas (CIPs) espontâneas promovidas pela aplicação de angiotensina II exógena. Vale lembrar que os eventos espontâneos incluem a liberação de vesículas sinápticas de maneira quantal, bem como vesículas sinápticas que são liberadas pela despolarização espontânea do terminal pré-sináptico. Assim, no decorrer deste protocolo experimental, observamos três padrões de alteração distintos nos CEPs e nos CIPs espontâneos, quando da administração do referido peptídeo: aumento, redução e ausência de alteração, tanto na frequência quanto na amplitude destes eventos espontâneos. Com efeito, nesta seção, inicialmente tratamos da morfologia e das características dos neurônios observados após o procedimento de dispersão mecânica dos neurônios do NTS comissural. Em seguida, abordaremos a diferenciação dos CEPs e dos CIPs quanto à cinética e à farmacologia destes eventos. Finalmente, trataremos dos resultados referentes à aplicação de angiotensina II exógena nos diferentes grupos encontrados, no intuito de realizar uma análise mais acurada.

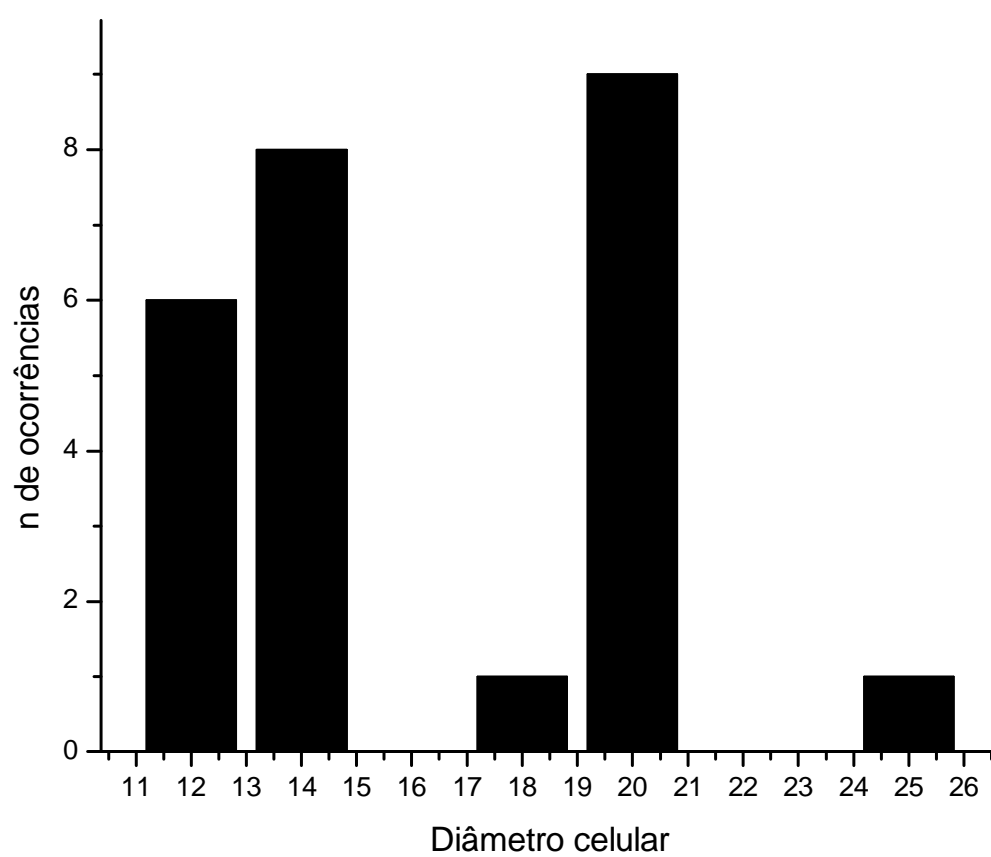
a) *Morfologia dos neurônios do NTS comissural:*

A dispersão mecânica dos neurônios do NTS fornece neurônios aparentemente saudáveis e que possuem seus botões sinápticos intactos, estes por sua vez, são necessários para a observação dos eventos pós-sinápticos espontâneos. Na figura 39 mostramos 15 exemplos de neurônios observados após a dispersão mecânica da região do NTS comissural. Notamos nesta figura que estes neurônios possuem diversos padrões morfológicos, bem como é variado o número de processos dendríticos que os mesmos possuem. Podemos ainda, observar que estes neurônios possuem diâmetro celular variado, como demonstrado na figura 40. Neste gráfico de distribuição amostral, observamos que a média do diâmetro celular foi de  $16,6 \pm 3,67 \mu\text{m}$ . A maior célula registrada teve o diâmetro celular de  $24 \mu\text{m}$  e a menor de  $12 \mu\text{m}$ .





**Figura 39:** Figura ilustrando a pluralidade de tipos celulares observados quando da dispersão mecânica dos neurônios do NTS comissural. Notar a diversidade quanto ao diâmetro celular, forma e quantidade de processos dendríticos.

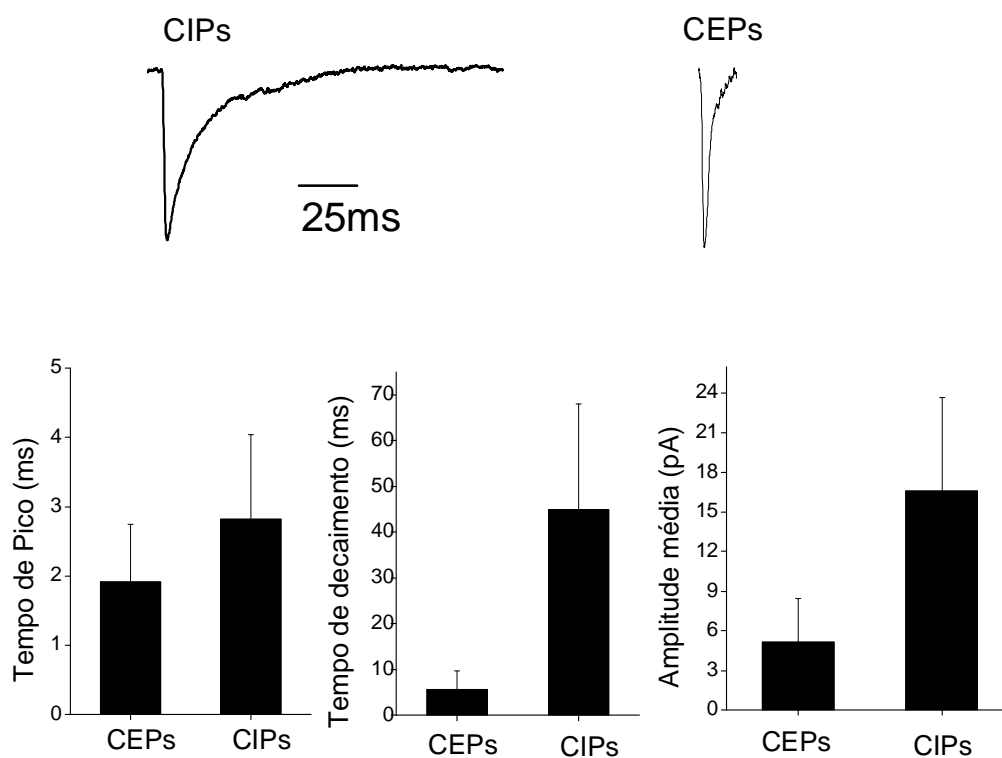


**Figura 40** : Frequência amostral do diâmetro celular dos neurônios registrados do NTS comissural. Dados expressos como média  $\pm$  DPM.

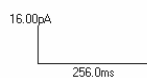
*b) Identificação dos CEPs e dos CIPs:*

Durante o registro dos neurônios do NTS comissural dispersados mecanicamente, observamos dois eventos distintos a saber: as correntes excitatórias pós-sinápticas espontâneas (CEPs) e as correntes inibitórias pós-sinápticas espontâneas (CIPs). Estes eventos são diversos sob o ponto de vista de suas cinéticas, bem como da sua natureza sináptica e, portanto, de sua farmacologia. Os CEPs são correntes catiônicas provocadas pela liberação do neurotransmissor excitatório glutamato pelo terminal pré-sináptico e pela ação deste neurotransmissor em receptores ionotrópicos na membrana pós-sináptica. Por sua vez, os CIPs, são correntes iônicas de cloreto promovidas pela liberação de GABA pelo terminal pré-sináptico e pela ação deste neurotransmissor inibitório em receptores GABA<sub>A</sub> na membrana da célula pós-sináptica. Além disso, como citado anteriormente e exemplificado na figura 41, observamos que estes eventos possuem cinéticas diferentes. Os CEPs possuem valores de tempo de pico e o tempo de decaimento menores que os valores dos mesmo parâmetros para os CIPs, entretanto, a sua amplitude é varias vezes menor que a amplitude dos CIPs. O conhecimento destas diferenças é de grande utilidade e nos permite diferenciar um CEPs de um CIPs durante os registros eletrofisiológicos. Pode-se ainda, realizar a diferenciação farmacológica destes eventos espontâneos. A figura 42, mostra o registro de um neurônio do NTS comissural, dispersado mecanicamente, onde observamos a ocorrência de CEPs e de CIPs concomitantemente durante o período controle. Após a aplicação de bicuculina ao perfusato, observamos que os CIPs espontâneos são bloqueados pela bicuculina, sendo portanto este eventos dependentes da ativação de receptores GABA<sub>A</sub> pós-sinápticos. Após a lavagem do antagonista com a solução padrão observamos que o registro volta a

apresentar os CIPs espontâneos. A adição de NBQX e AP-5 ao perfusato bloqueia a ocorrência espontânea dos CEPs. Assim, mostramos que estes eventos são dependentes da ativação de receptores inotrópicos de glutamato na membrana pós-sinápticas. A reversibilidade do bloqueio é demonstrada pela lavagem dos antagonistas e recuperação dos CEPs.



**Figura 41:** Diferenças entre as características cinéticas (tempo de pico, tempo de decaimento e amplitude média) dos eventos sinápticos espontâneos (CEPs e CIPs) observados ao registro de neurônios do NTS mecanicamente dissociados.

**Controle****Bicuculina****Recuperação****NBQX + AP-5****Recuperação**

**Figura 42:** Traçados obtidos de um neurônio do NTS comissural, dispersado mecanicamente, ilustrando a identificação farmacológica dos CEPs e dos CIPs, no período controle, após bicuculina, NBQX bem como após a recuperação dos eventos sinápticos espontâneos.

*c) Efeito da Aplicação de angiotensina II exógena sobre a frequência dos CEPs e dos CIPs:*

Nesta análise observamos três padrões de alteração quando da aplicação de angiotensina II exógena (1  $\mu\text{M}$ ) sobre a frequência dos CEPs e dos CIPs: aumento, redução e ausência de alteração na frequência destes eventos espontâneos. Na figura 43, painel A, observamos que entre as 13 células em que observamos CEPs, 5 (38,5%) apresentaram aumento, 5 (38,5%) apresentaram redução e 3 (23,1%) não apresentaram qualquer alteração significativa na frequência dos CEPs após a aplicação de angiotensina II. No painel B, mostramos que dentre as 22 células que apresentaram a ocorrência espontânea de CIPs quando do registro eletrofisiológico, 6 (27,3%) apresentaram aumento, 13 (59,1%) redução e 3 (13,6%) não apresentaram qualquer alteração na frequência dos CIPs quando da aplicação de angiotensina II exógena.

Na figura 44 mostramos registros eletrofisiológicos, no período controle, após a administração de angiotensina II (1  $\mu\text{M}$ ) e após a reperusão do sistema com solução padrão (recuperação), bem como mostramos o histograma de frequência, representativos de neurônios que apresentaram aumento na frequência dos CEPs após a administração de angiotensina II (1  $\mu\text{M}$ , n=5). Na figura 45 mostramos as alterações na frequência média dos CEPs (dados normalizados em relação ao controle e apresentados como % do controle) quando da aplicação de angiotensina II (1 e 3  $\mu\text{M}$ ) bem como a recuperação após a lavagem do peptídeo do sistema. Nesta figura observamos que a administração de angiotensina II na concentração de 1  $\mu\text{M}$ , aumentou significativamente a frequência média dos CEPs espontâneos, entretanto, não observamos um padrão concentração-dependente quando da aplicação de angiotensina II na concentração de 3  $\mu\text{M}$ . Após a

reperfusão do sistema com solução padrão, observamos que a frequência média dos CEPs retorna a valores próximos aos observados durante o período controle.

A figura 46 mostra registros eletrofisiológicos e histograma de frequência no período controle, após a aplicação de angiotensina II (1  $\mu\text{M}$ ) e após o retorno da perfusão do sistema com solução padrão, no grupo que apresentou aumento na frequência dos CIPs em resposta à administração de angiotensina II (1  $\mu\text{M}$ , n=6). Na figura 47, observamos as alterações na frequência média dos CIPs após a aplicação de angiotensina II (1 e 3  $\mu\text{M}$ ), bem como após a recuperação pela perfusão do sistema com solução padrão. Observamos nesta figura que a administração de angiotensina II (1  $\mu\text{M}$ ) promove aumento significativo da frequência dos CIPs, entretanto, a administração de angiotensina II (3  $\mu\text{M}$ ), embora tenha mostrado uma elevação mais acentuada, seu efeito não foi significativo. Após o período de recuperação, observamos que a frequência média dos CIPs retorna a valores semelhantes ao controle. Os dados expressos neste gráfico foram normalizados e expressos como porcentagem do controle.

Na figura 48 observamos os dados referentes ao grupo de neurônios que apresentaram redução na frequência dos CEPs frente à aplicação de angiotensina II (1  $\mu\text{M}$ , n = 5) exógena. Assim, nesta figura mostramos os traçados eletrofisiológicos e o histograma de frequência de um neurônio representativo do grupo, no qual observamos a redução de da ocorrência espontânea dos CEPs após a administração de angiotensina II (1  $\mu\text{M}$ ) em relação ao período controle, bem como notamos a reversibilidade da redução da frequência após a lavagem deste peptídeo do sistema (recuperação). Na figura 49, observamos a redução na frequência média dos CEPs em neurônios do NTS comissural, dispersados mecanicamente, frente à aplicação de angiotensina II (1 e 3 $\mu\text{M}$ ), bem como a



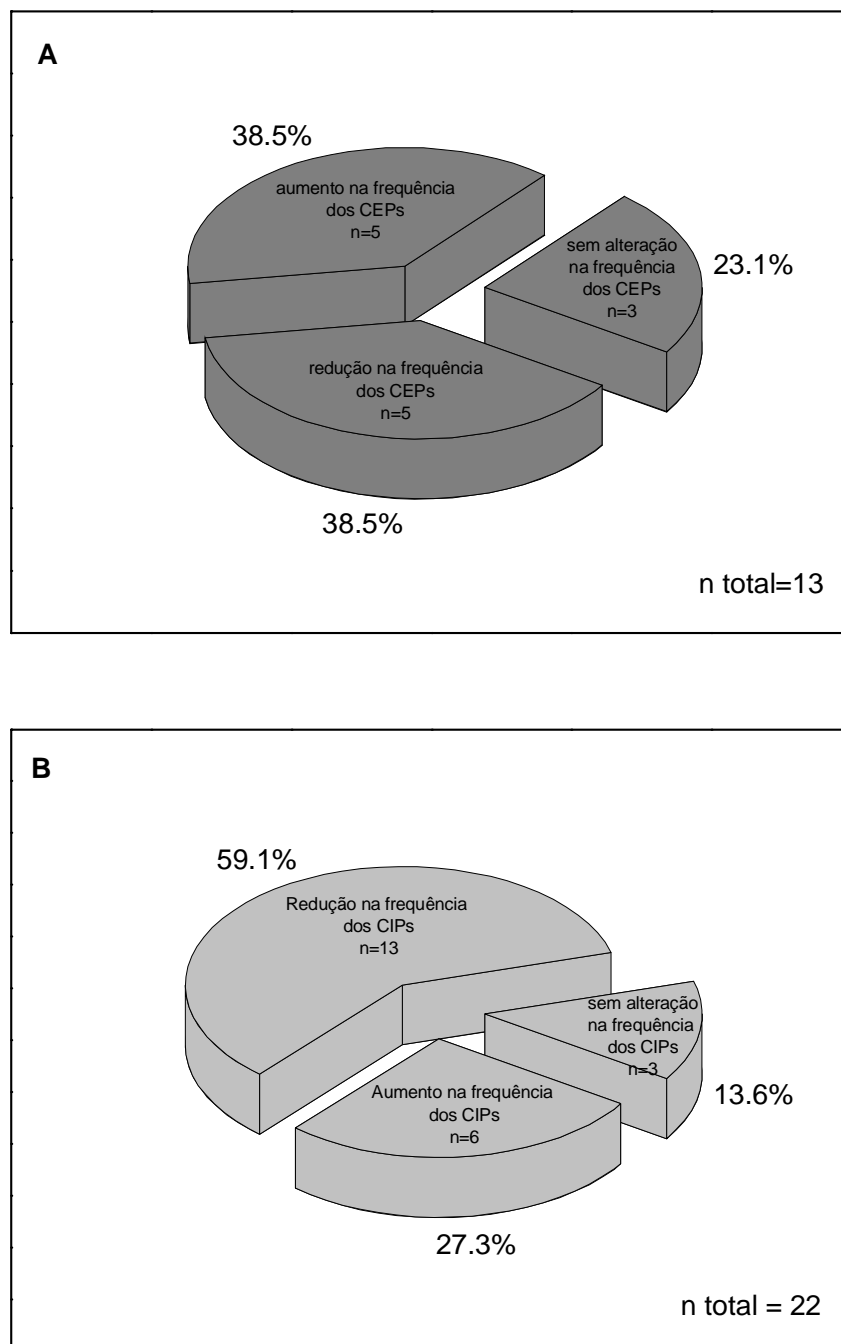
frequência após a reperfusão do sistema com solução padrão. Nesta figura, mostramos que a aplicação de angiotensina (1 ou 3  $\mu\text{M}$ ) não promove alterações significativas na frequência média dos CEPs. Os dados foram normalizados em relação ao controle e expressos como porcentagem do controle.

A exemplo da figura anterior, na figura 50, podemos observar os registros eletrofisiológicos e o histograma de frequência dos neurônios que apresentaram redução na frequência dos CIPs após a administração de angiotensina II (1  $\mu\text{M}$  – n = 13), mostrando os períodos controle, após a aplicação de angiotensina II e após a recuperação. Na figura 51 observamos que a aplicação de angiotensina II (1 e 3  $\mu\text{M}$ ) promoveu redução significativa na frequência média dos CIPs espontâneos, entretanto esta redução não se deu de modo concentração-dependente. Mostramos ainda, que após a lavagem do sistema com solução padrão os valores de frequência média dos CIPs encontram-se próximos aos valores basais. Os dados referentes a este gráfico foram normalizados em relação ao controle e apresentados como porcentagem do controle.

O grupo de neurônios que não apresentou qualquer alteração na frequência dos eventos espontâneos registrados são apresentadas a seguir. Na figura 52 observamos registros eletrofisiológicos e histograma de frequência de um neurônio do NTS, representativo do grupo em que a frequência dos CEPs não foi alterada pela administração de angiotensina II (1  $\mu\text{M}$ , n = 3). Nesta figura podemos observar a frequência dos CEPs no período controle, após a aplicação de angiotensina II (1  $\mu\text{M}$ ) e após a reperfusão do sistema com solução padrão. Na figura 53 mostramos os dados referentes ao grupo de neurônios que não apresentou qualquer alteração tanto na

frequência média dos CEPs quando da aplicação de angiotensina II (1 e 3  $\mu\text{M}$ ) exógena, bem como o período de recuperação após a reperfusão do sistema com solução padrão.

A figura 54 mostra os registros eletrofisiológicos e histograma de frequência de um neurônio representativo do grupo que não alterou a frequência dos CIPs frente à aplicação de angiotensina II (1  $\mu\text{M}$ , n = 3). Na figura 55 mostramos os dados referentes ao grupo de neurônios do NTS dispersados mecanicamente que não apresentaram qualquer alteração significativa após a administração de angiotensina II (1 e 3  $\mu\text{M}$ ), bem como a frequência média após a recuperação pela lavagem do sistema com solução padrão. Os dados referentes aos presentes experimentos encontram-se nas tabelas 14 e 15 do apêndice.



**Figura 43:** Gráficos amostrais, ilustrando as proporções de células que apresentaram aumento, redução ou ausência de alteração na frequência dos CEPs (painel A) e na frequência dos CIPs (painel B) após a administração exógena de angiotensina II (1  $\mu$ m) em neurônios do NTS comissural mecanicamente dissociados.

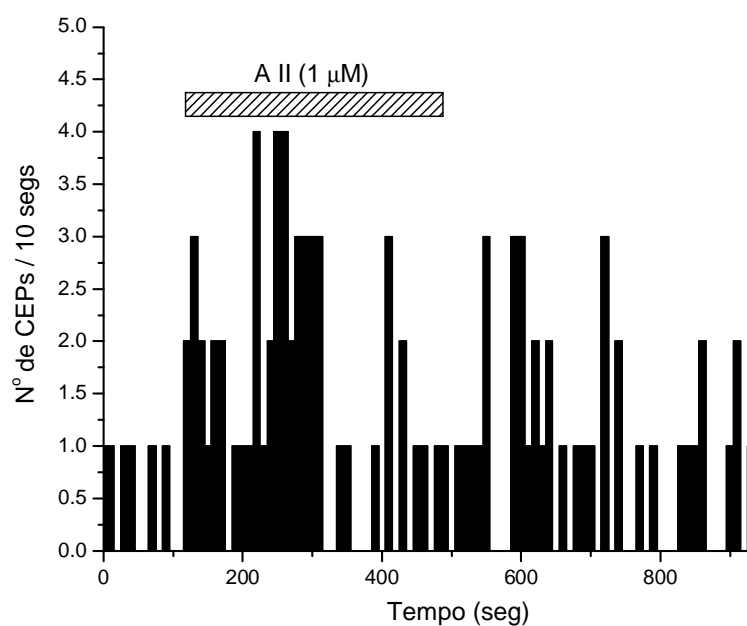
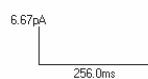
### Controle



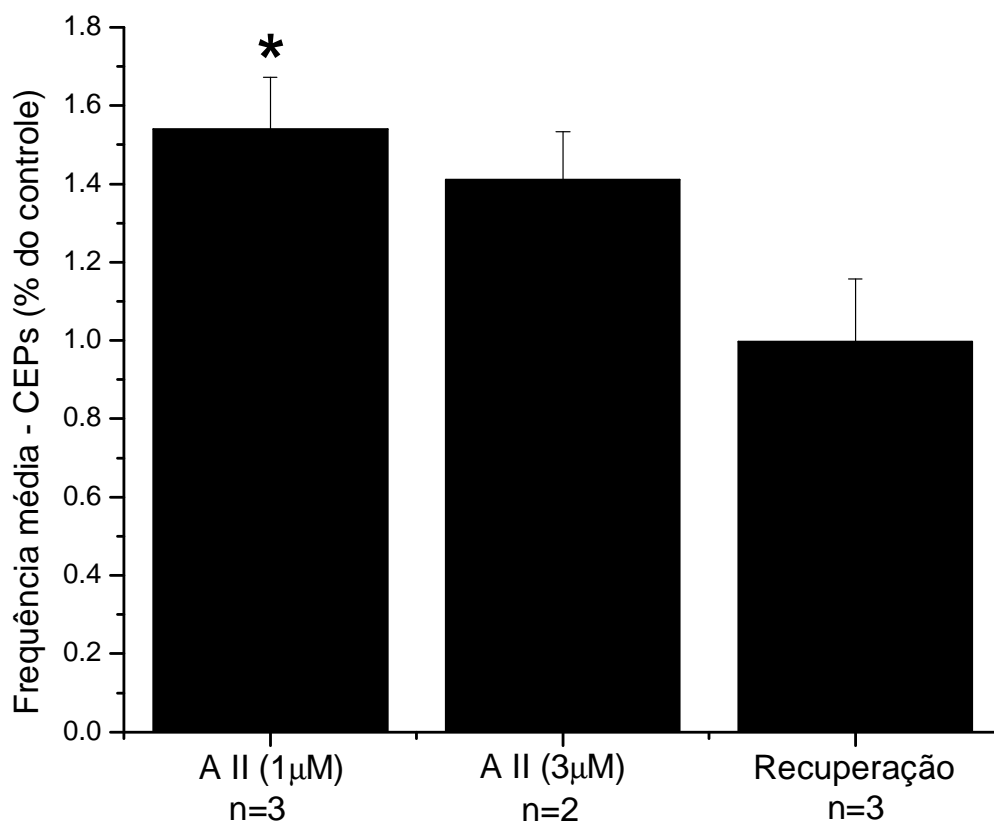
### Angiotensina II – 1 $\mu\text{M}$



### Recuperação



**Figura 44:** Registros eletrofisiológicos e histograma de frequência representativos do grupo de neurônios do NTS comissural que apresentou *aumento* na frequência dos CEPs quando da aplicação exógena de angiotensina II .

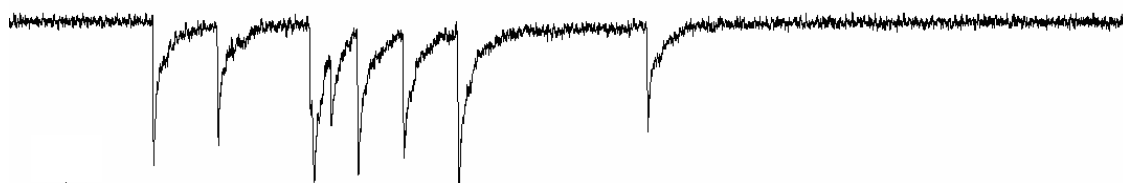


**Figura 45:** Gráfico de frequência média de correntes excitatórias pós-sinápticas (CEPs) em neurônios do NTS comissural, mostrando as alterações quando da administração de angiotensina II (A II) exógena nas concentrações de 1 e 3 μM, bem como o período de recuperação após a reperfusão do sistema com solução padrão (\* = diferente do controle,  $p < 0,05$ ).

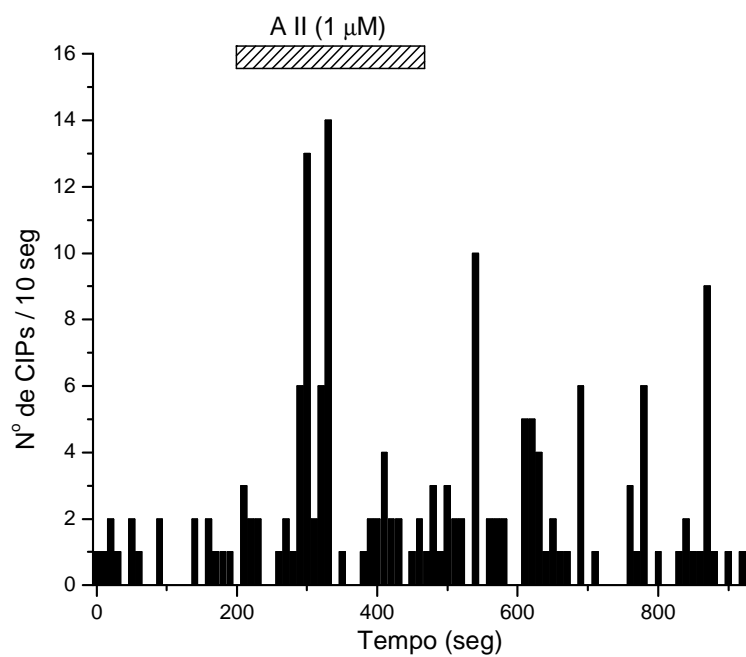
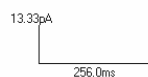
### Controle



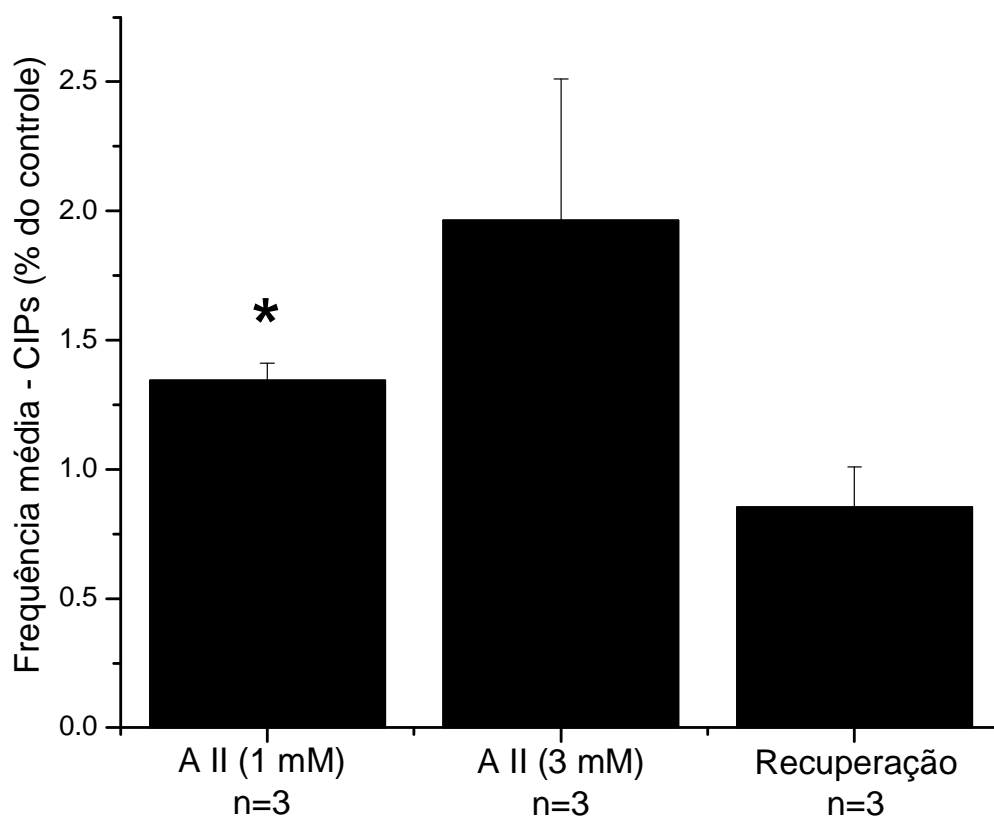
### Angiotensina II – 1 $\mu$ M



### Recuperação



**Figura 46:** Registros eletrofisiológicos e histograma de frequência representativos do grupo de neurônios do NTS comissural que apresentou *aumento* na frequência dos CIPs quando da aplicação exógena de angiotensina II .



**Figura 47:** Gráfico de frequência média de correntes inibitórias pós-sinápticas (CIPs) em neurônios do NTS comissural, mostrando as alterações quando da administração de angiotensina II (A II) exógena nas concentrações de 1 e 3  $\mu\text{M}$ , bem como o período de recuperação após a reperfusão do sistema com solução padrão (\* = diferente do controle,  $p < 0,05$ ).

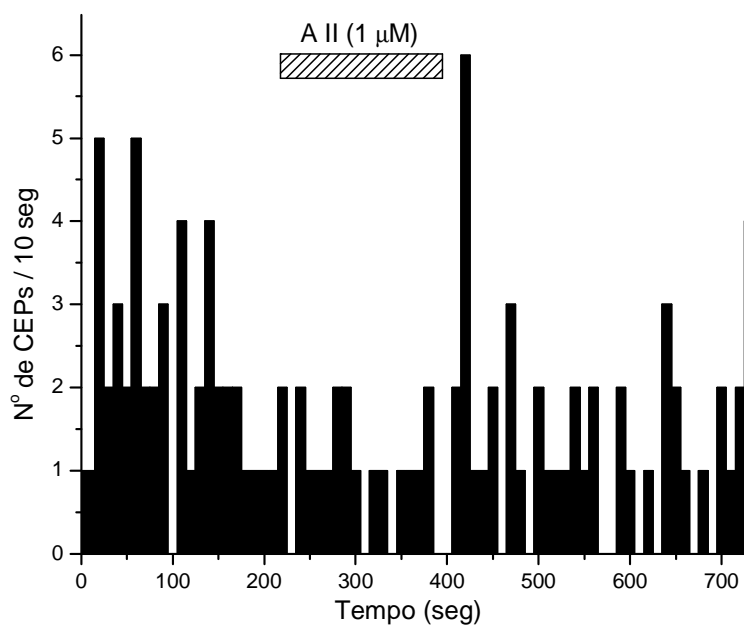
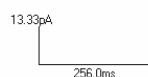
### Controle



### Angiotensina II – 1 $\mu$ M

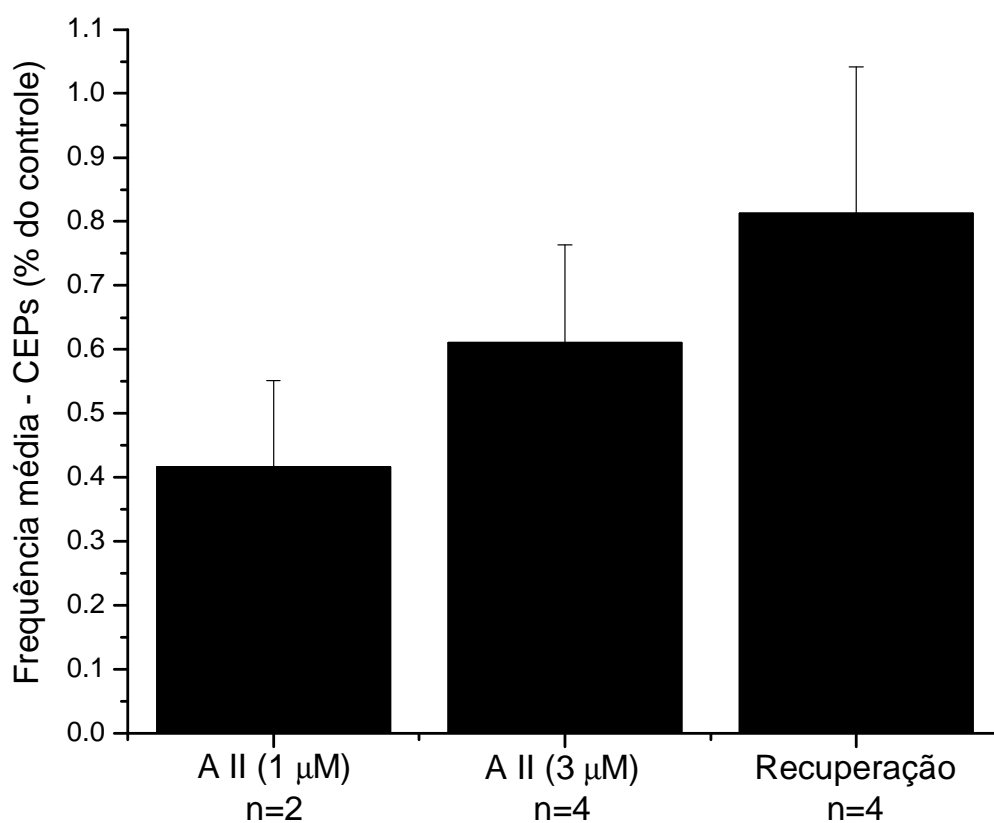


### Recuperação



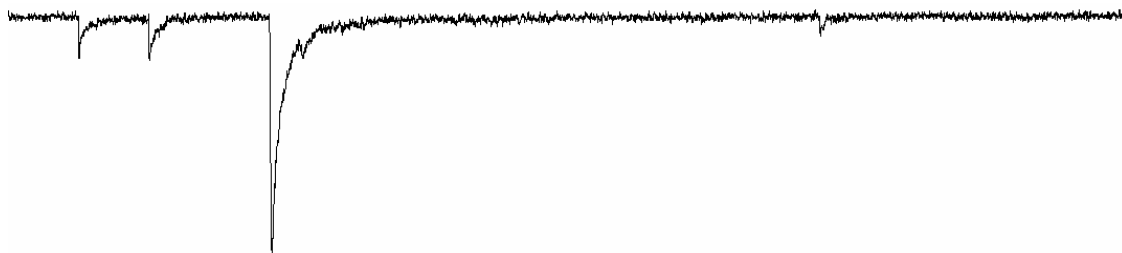
**Figura 48:** Registros eletrofisiológicos e histograma de frequência representativos do grupo de neurônios do NTS comissural que apresentou *redução* na frequência dos CEPs quando da aplicação exógena de angiotensina II .





**Figura 49:** Gráfico de frequência média de correntes excitatórias pós-sinápticas (CEPs) em neurônios do NTS comissural, mostrando as alterações quando da administração de angiotensina II (A II) exógena nas concentrações de 1 e 3  $\mu$ M, bem como o período de recuperação após a reperfusão do sistema com solução padrão.

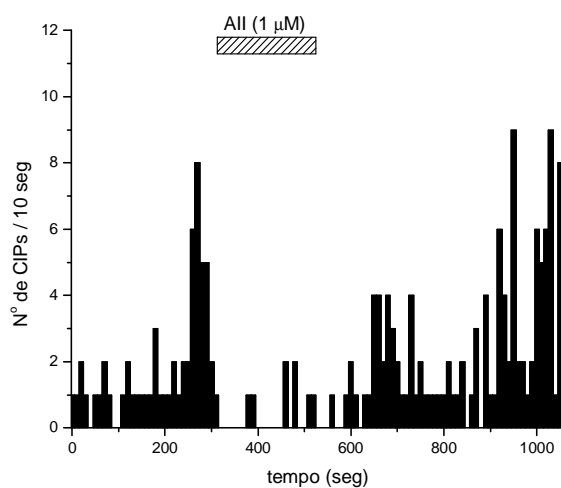
**Controle**



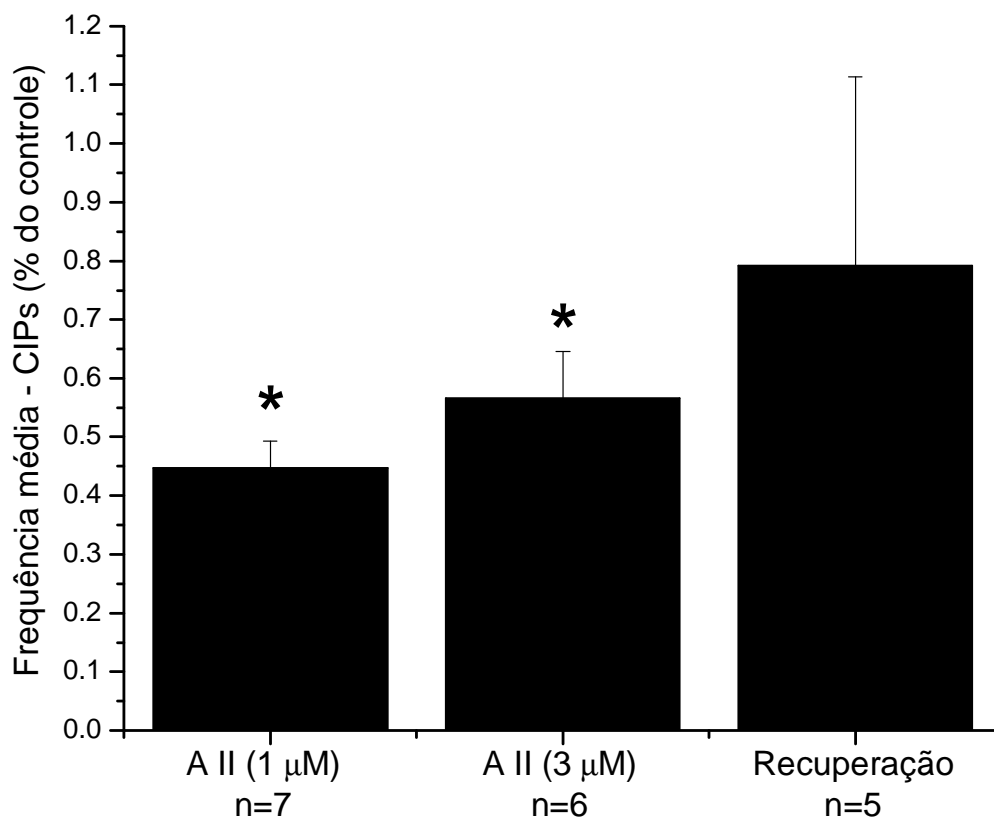
**Angiotensina II – 1  $\mu$ M**



**Recuperação**



**Figura 50:** Registros eletrofisiológicos e histograma de frequência representativos do grupo de neurônios do NTS comissural que apresentou *redução* na frequência dos CIPs quando da aplicação exógena de angiotensina II .



**Figura 51:** Gráfico de frequência média de correntes inibitórias pós-sinápticas (CIPs) em neurônios do NTS comissural, mostrando as alterações quando da administração de angiotensina II (A II) exógena nas concentrações de 1 e 3 μM, bem como o período de recuperação após a reperfusão do sistema com solução padrão (\* = diferente do controle,  $p < 0,05$ ).

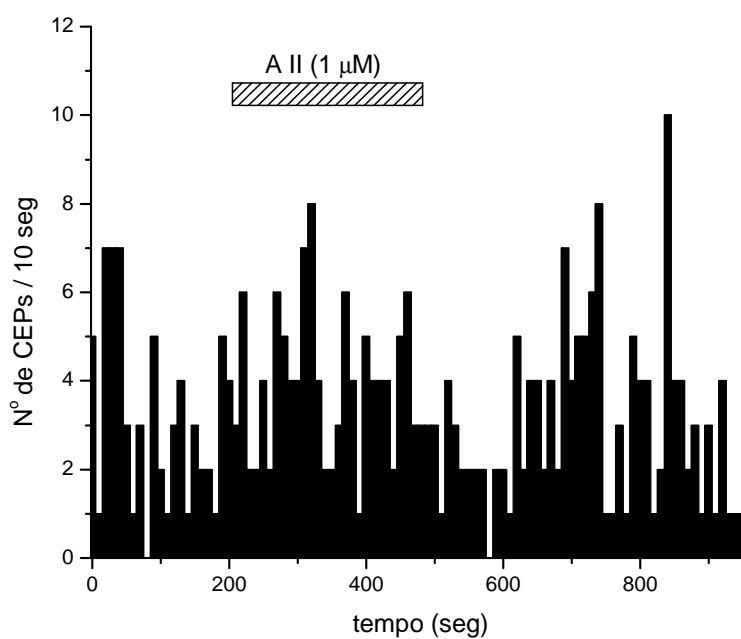
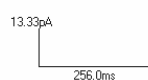
## Controle



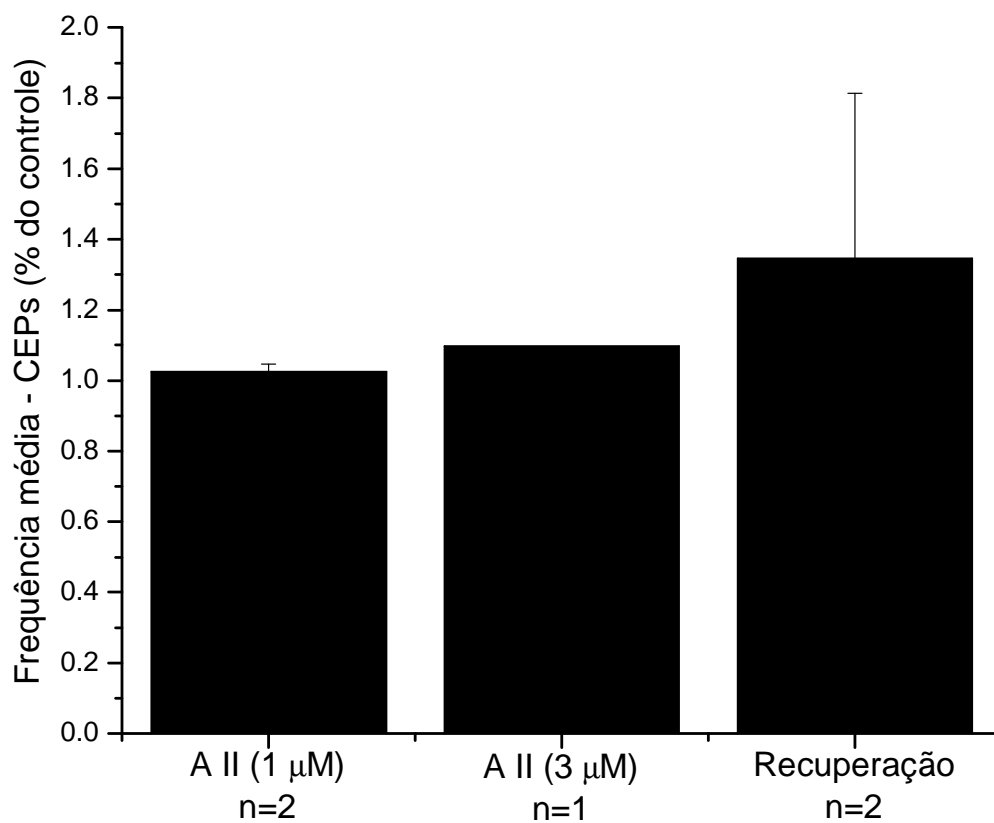
## Angiotensina II – 1 $\mu$ M



## Recuperação



**Figura 52:** Registros eletrofisiológicos e histograma de frequência representativos do grupo de neurônios do NTS comissural que *não apresentou alteração* na frequência dos CEPs quando da aplicação exógena de angiotensina II .



**Figura 53:** Gráfico de frequência média de correntes excitatórias pós-sinápticas (CEPs) em neurônios do NTS comissural, mostrando as alterações quando da administração de angiotensina II (A II) exógena nas concentrações de 1 e 3  $\mu$ M, bem como o período de recuperação após a reperfusão do sistema com solução padrão.

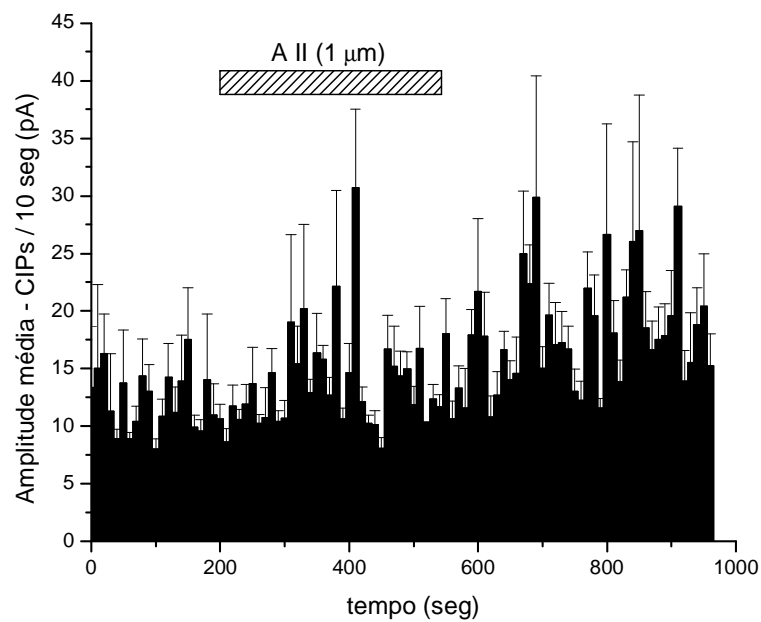
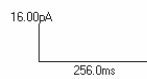
Controle



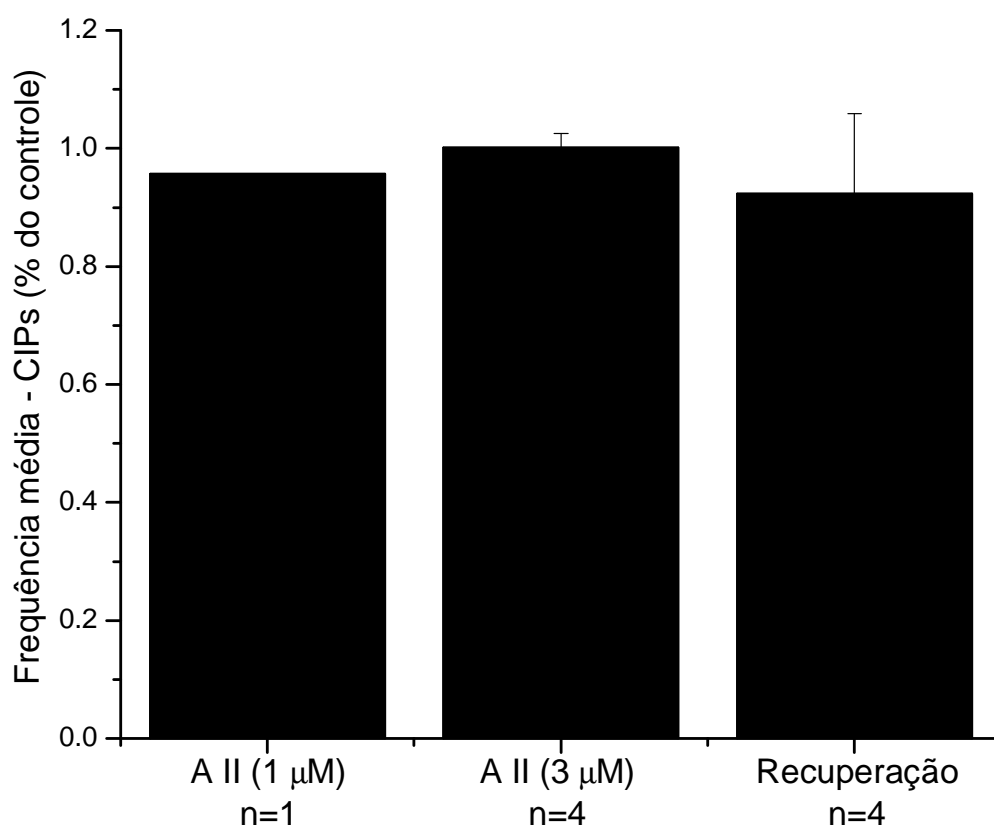
Angiotensina II – 1  $\mu$ M



Recuperação



**Figura 54:** Registros eletrofisiológicos e histograma de frequência representativos do grupo de neurônios do NTS comissural que *não apresentou alteração* na frequência dos CIPs quando da aplicação exógena de angiotensina II.



**Figura 55:** Gráfico de frequência média de correntes inibitórias pós-sinápticas (CIPs) em neurônios do NTS comissural, mostrando as alterações quando da administração de angiotensina II (A II) exógena nas concentrações de 1 e 3 μM, bem como o período de recuperação após a reperfusão do sistema com solução padrão.

*c) Efeito da Aplicação de angiotensina II exógena sobre a Amplitude dos CEPs e dos CIPs:*

Nesta seção, trataremos dos três padrões de alteração na amplitude dos CEPs e dos CIPs espontâneos quando da aplicação de angiotensina II exógena (1  $\mu\text{M}$ ): aumento, redução e ausência de alteração na amplitude destes eventos espontâneos. No painel A da figura 56, observamos que entre as 13 células em que observamos CEPs, 5 (38,5%) apresentaram aumento, 3 (23,1%) redução e 5 (38,5%) não apresentaram alterações significativas na amplitude dos CEPs após a aplicação de angiotensina II. No painel B, mostramos que dentre as 20 células que apresentaram a ocorrência espontânea de CIPs e que foram submetidas à análise de amplitude média, quando do registro eletrofisiológico, 8 (40%) apresentaram aumento, 6 (30%) redução e 6 (30%) não apresentaram qualquer alteração na amplitude dos CIPs após a administração de angiotensina II.

Na figura 57 mostramos registros eletrofisiológicos, no período controle, após a administração de angiotensina II (1  $\mu\text{M}$ ) e após a reperusão do sistema com solução padrão (recuperação), bem como mostramos o histograma de amplitude, representativos de neurônios que apresentaram aumento na amplitude dos CEPs após a administração de angiotensina II (1  $\mu\text{M}$ ). Na figura 58, mostramos as alterações na amplitude média dos CEPs (dados normalizados em relação ao controle e apresentados como porcentagem do controle) quando da aplicação de angiotensina II (1 e 3  $\mu\text{M}$ ) bem como a recuperação após a lavagem do peptídeo do sistema. Nesta figura observamos que a administração de angiotensina II na concentração de 1 e 3  $\mu\text{M}$ , aumentou significativamente a amplitude média dos CEPs espontâneos, entretanto, não observamos um padrão concentração-dependente. Ainda nesta figura, mostramos que, neste grupo, a reperusão do sistema



com solução padrão não trouxe os valores de amplitude média para valores compatíveis com os valores basais.

A figura 59 mostra registros eletrofisiológicos e histograma de amplitude no período controle, após a aplicação de angiotensina II (1  $\mu\text{M}$ ) e após o retorno da perfusão do sistema com solução padrão, no grupo que apresentou aumento na amplitude dos CIPs em resposta à administração de angiotensina II. Na figura 60, observamos as alterações na amplitude média dos CIPs após a aplicação de angiotensina II (1 e 3  $\mu\text{M}$ ), bem como após a recuperação pela perfusão do sistema com solução padrão. Observamos nesta figura que a administração de angiotensina II (1  $\mu\text{M}$ ) promove aumento significativo da amplitude dos CIPs, entretanto, embora a administração de angiotensina II (3  $\mu\text{M}$ ) tenha promovido uma elevação mais acentuada, seu efeito não foi significativo. Após o período de recuperação, observamos que a amplitude média dos CIPs retorna a valores semelhantes ao controle. Os dados expressos neste gráfico foram normalizados e expressos como porcentagem do controle.

Na figura 61 observamos os dados referentes ao grupo de neurônios que apresentaram redução na amplitude dos CEPs frente à aplicação de angiotensina II exógena. Assim, nesta figura mostramos os traçados eletrofisiológicos e o histograma de amplitude de um neurônio representativo do grupo, onde observamos a redução de amplitude dos CEPs espontâneos após a administração de angiotensina II (1  $\mu\text{M}$ ) em relação ao período controle, bem como notamos a reversibilidade da redução da amplitude após a lavagem deste peptídeo do sistema (recuperação). Na figura 62, observamos um gráfico de amplitude média que ilustra a redução na amplitude média dos CEPs em neurônios do NTS comissural, dispersados mecanicamente, frente à aplicação

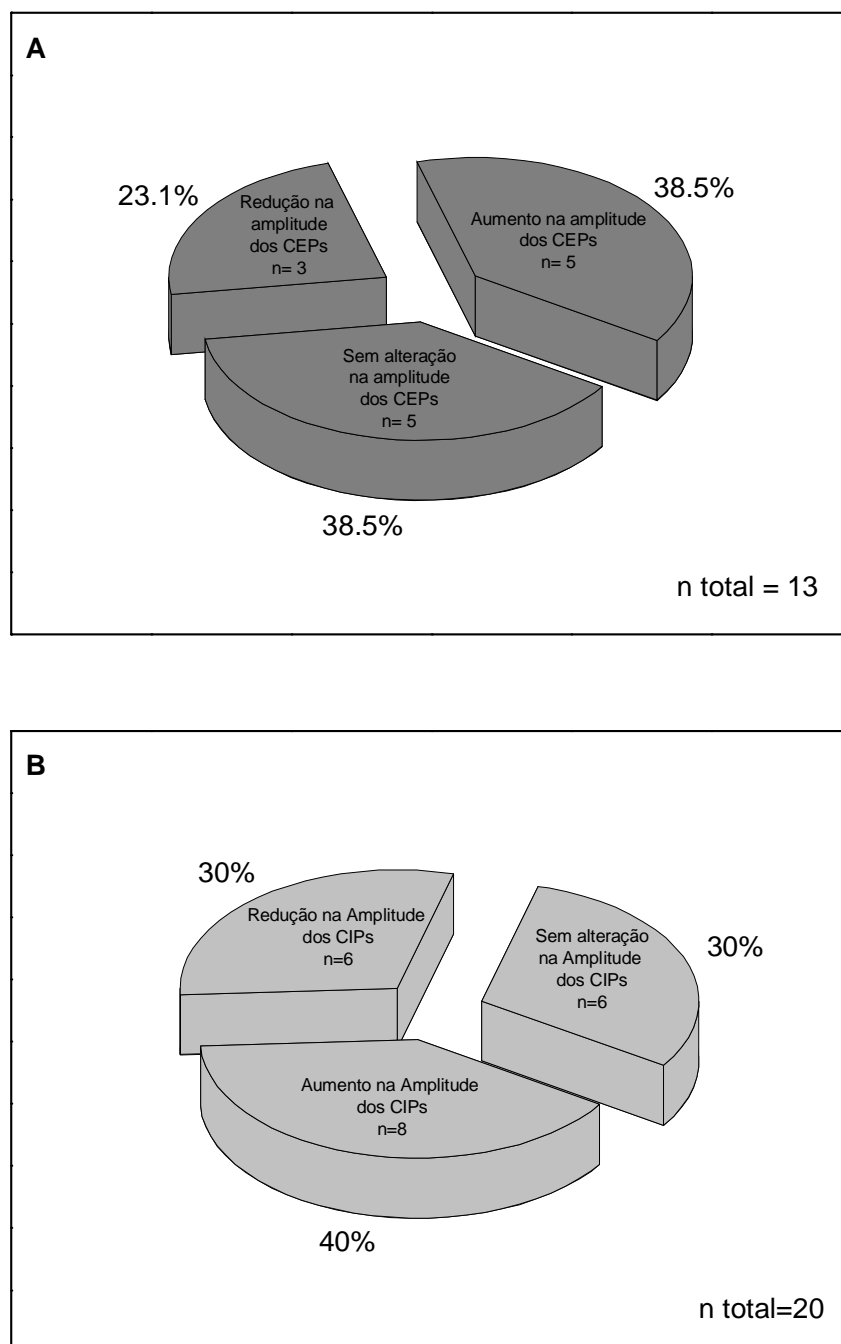
de angiotensina II (1  $\mu\text{M}$ ), bem como o valor médio de amplitude após a reperfusão do sistema com solução padrão. Nesta figura, mostramos que a aplicação de angiotensina (1  $\mu\text{M}$ ) não promove alterações significativas na amplitude média dos CEPs, embora uma tendência seja clara. Os dados deste gráfico foram normalizados em relação ao controle e expressos como porcentagem do controle.

Na figura 63, podemos observar os registros eletrofisiológicos e o histograma de amplitude, representativos do grupo de neurônios do NTS comissural que apresentaram redução na amplitude dos CIPs após a administração de angiotensina II (1  $\mu\text{M}$ ), mostrando os períodos controle, após a aplicação de angiotensina II e após a recuperação. Na figura 64 mostramos um gráfico de amplitude média, onde observamos que a aplicação de angiotensina II (1 e 3  $\mu\text{M}$ ) não promoveu redução significativa na amplitude média dos CIPs espontâneos. Os dados referentes a este gráfico foram normalizados em relação ao controle e apresentados como porcentagem do controle.

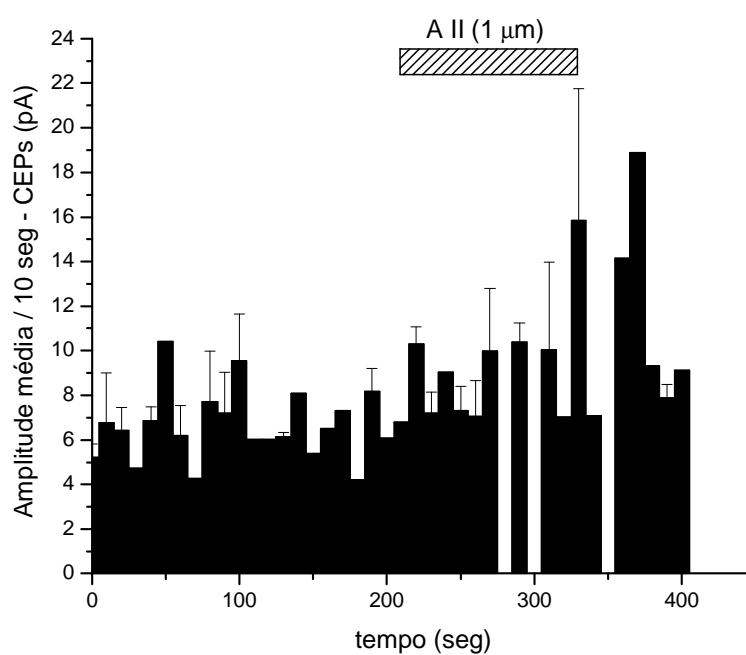
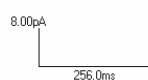
O grupo de neurônios que não apresentou qualquer alteração na amplitude dos eventos espontâneos registrados são apresentadas a seguir. Na figura 65 observamos registros eletrofisiológicos e histograma de amplitude de um neurônio do NTS, representativo do grupo, em que a amplitude dos CEPs não foi alterada pela administração de angiotensina II (1  $\mu\text{M}$ ). Nesta figura podemos observar a amplitude dos CEPs no período controle, após a aplicação de angiotensina II (1  $\mu\text{M}$ ) e após a reperfusão do sistema com solução padrão. Na figura 66 observamos um gráfico de amplitude média no qual mostramos os dados referentes ao grupo de neurônios que não apresentou qualquer alteração tanto na amplitude média dos CEPs quando da aplicação de

angiotensina II (1 e 3  $\mu\text{M}$ ) exógena, bem como o período de recuperação após a reperfusão do sistema com solução padrão.

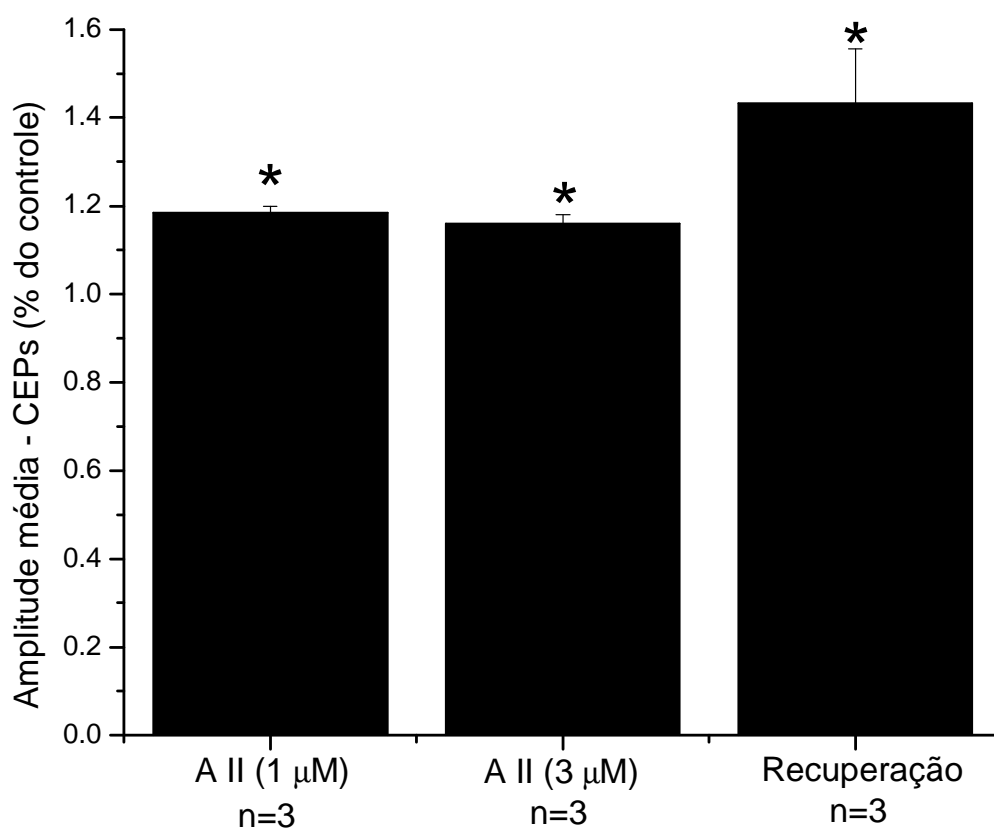
A figura 67 mostra os registros eletrofisiológicos e o histograma de amplitude de um neurônio representativo do grupo de neurônios do NTS comissural, dispersados mecanicamente, que não apresentaram alteração na amplitude dos CIPs após à aplicação de angiotensina II (1  $\mu\text{M}$ , n = 3). Na figura 68 mostramos os dados referentes ao grupo de neurônios do NTS comissural, dispersados mecanicamente, que não apresentou qualquer alteração significativa na amplitude média dos CIPs após a administração de angiotensina II (1 e 3  $\mu\text{M}$ ), bem como a frequência média após a recuperação pela lavagem do sistema com solução padrão. Os dados referentes ao presente experimento encontram-se nas tabelas 16 e 17 do apêndice.



**Figura 56:** Gráficos amostrais, ilustrando as proporções de células que apresentaram aumento, redução ou ausência de alteração na amplitude dos CEPs (painel A) e amplitude dos CIPs (painel B) após a administração exógena de angiotensina II ( $1 \mu\text{m}$ ) em neurônios do NTS comissural mecanicamente dissociados.

**Controle****Angiotensina II – 1 μM****Recuperação**

**Figura 57:** Registros eletrofisiológicos e histograma de amplitude representativos do grupo de neurônios do NTS comissural que apresentou *aumento* na amplitude dos CEPs quando da aplicação exógena de angiotensina II.

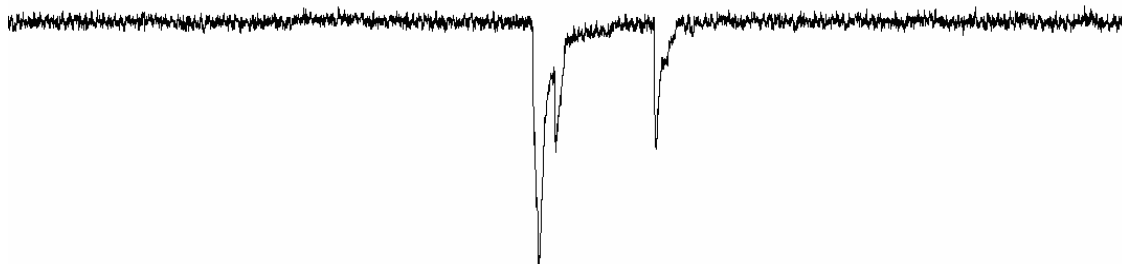


**Figura 58:** Gráfico de amplitude média de correntes excitatórias pós-sinápticas (CEPs) em neurônios do NTS comissural, mostrando as alterações quando da administração de angiotensina II (A II) exógena nas concentrações de 1 e 3  $\mu$ M, bem como o período de recuperação após a reperfusão do sistema com solução padrão (\* = diferente do controle,  $p < 0,05$ ).

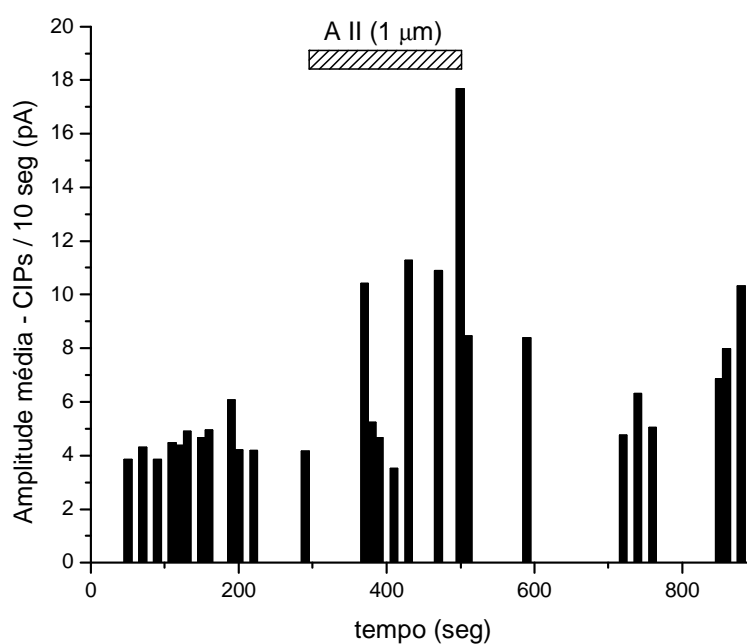
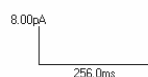
### Controle



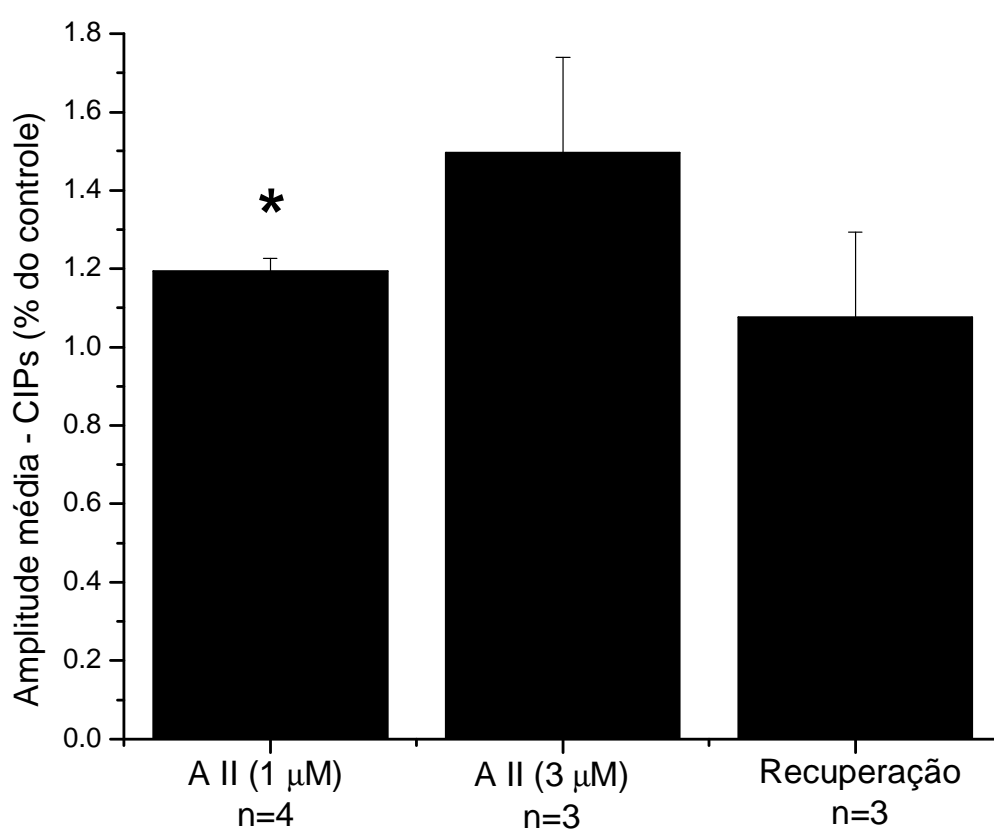
### Angiotensina II – 1 $\mu$ M



### Recuperação



**Figura 59:** Registros eletrofisiológicos e histograma de amplitude representativos do grupo de neurônios do NTS comissural que apresentou *aumento* na amplitude dos CIPs quando da aplicação exógena de angiotensina II.



**Figura 60:** Gráfico de amplitude média de correntes inibitórias pós-sinápticas (CIPs) em neurônios do NTS comissural, mostrando as alterações quando da administração de angiotensina II (A II) exógena nas concentrações de 1 e 3  $\mu$ M, bem como o período de recuperação após a reperfusão do sistema com solução padrão (\* = diferente do controle,  $p < 0,05$ ).



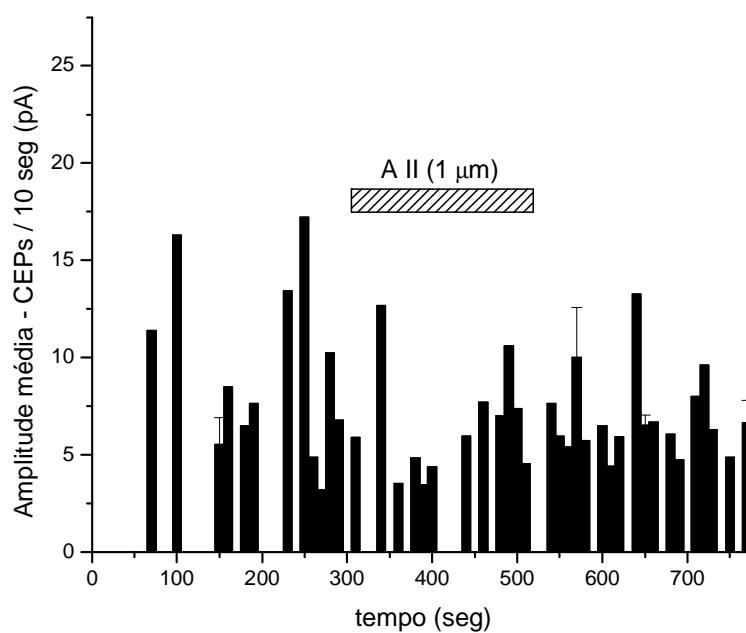
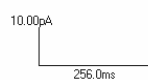
### Controle



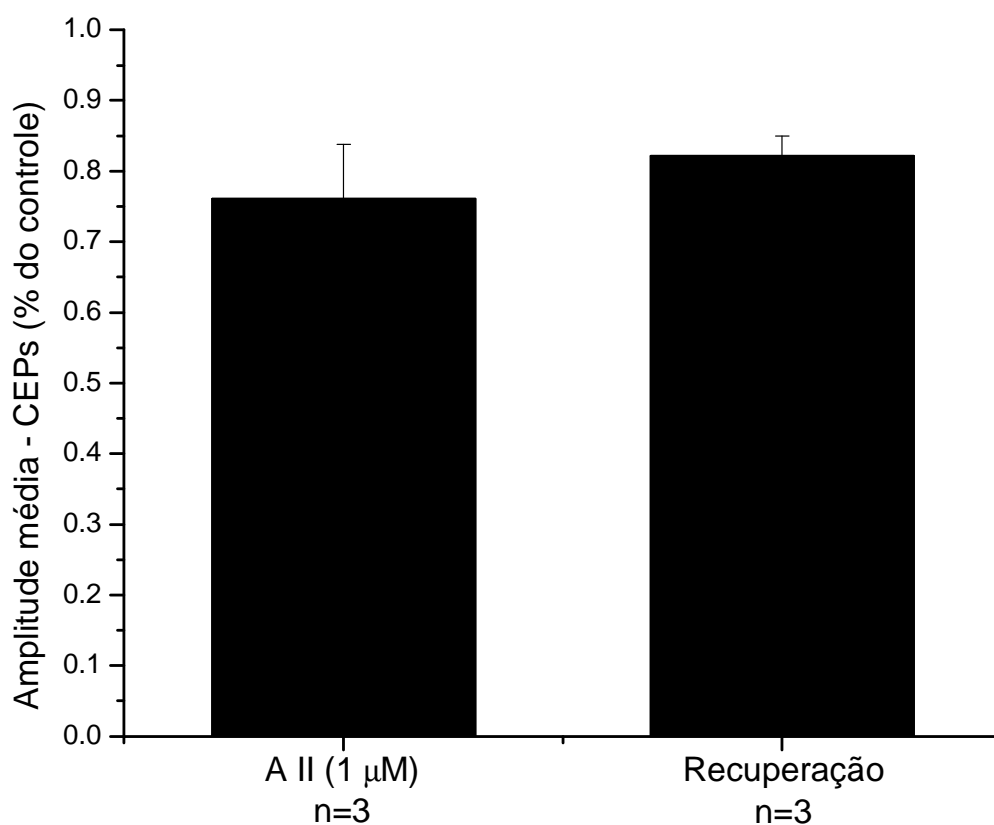
### Angiotensina II – 1 $\mu\text{M}$



### Recuperação



**Figura 61:** Registros eletrofisiológicos e histograma de amplitude representativos do grupo de neurônios do NTS comissural que apresentou *redução* na amplitude dos CEPs quando da aplicação exógena de angiotensina II.



**Figura 62:** Gráfico de amplitude média de correntes excitatórias pós-sinápticas (CEPs) em neurônios do NTS comissural, mostrando as alterações quando da administração de angiotensina II (A II) exógena na concentração de 1 μM, bem como o período de recuperação após a reperfusão do sistema com solução padrão.

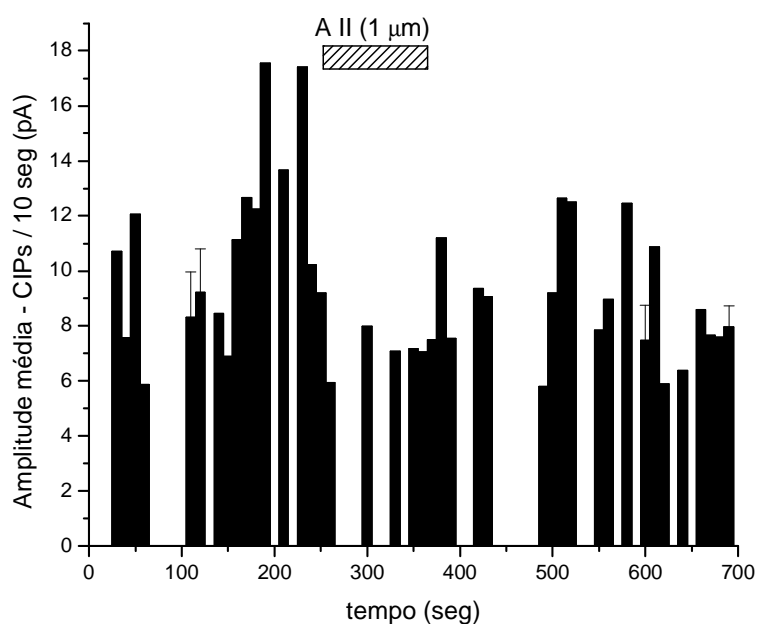
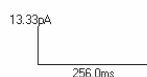
### Controle



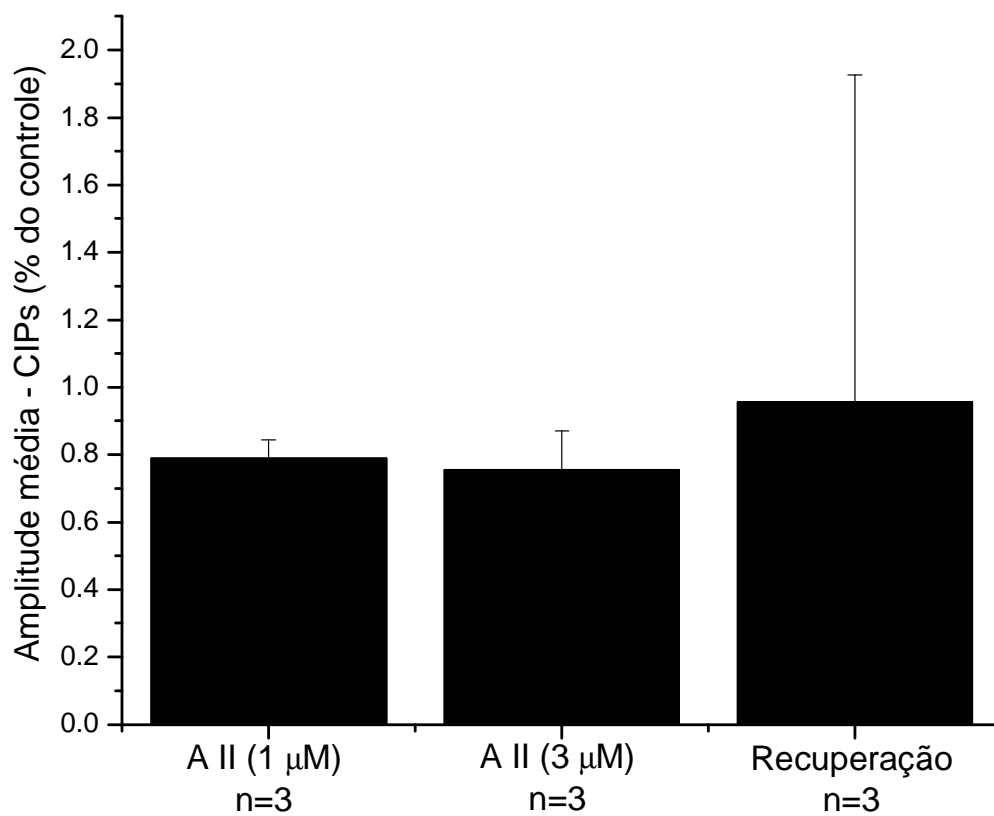
### Angiotensina II – 1 $\mu$ M



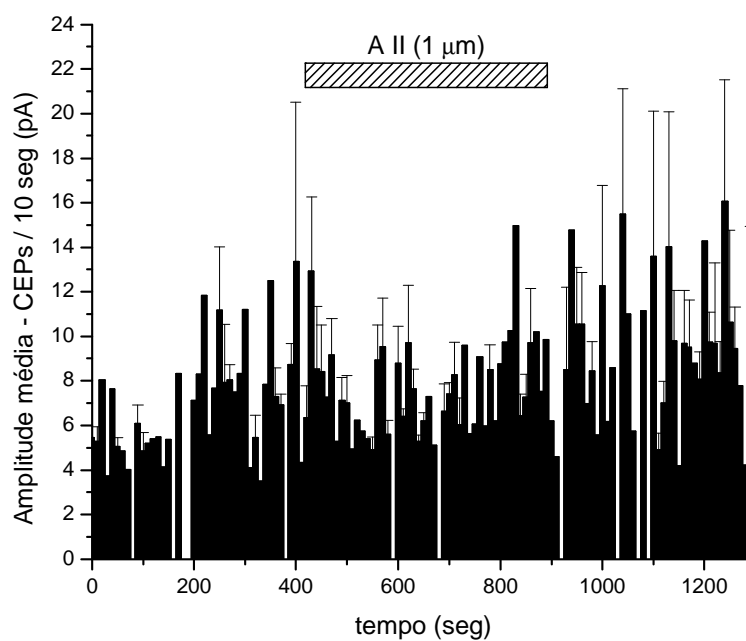
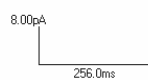
### Recuperação



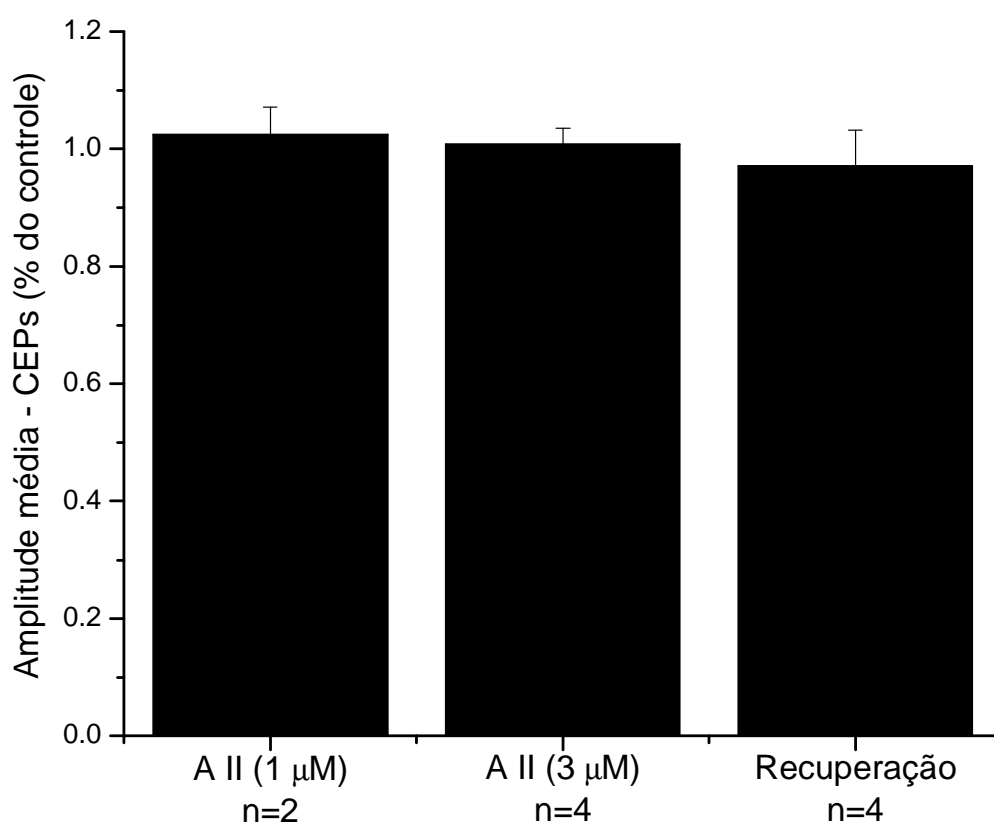
**Figura 63:** Registros eletrofisiológicos e histograma de amplitude representativos do grupo de neurônios do NTS comissural que apresentou *redução* na amplitude dos CIPs quando da aplicação exógena de angiotensina II.



**Figura 64:** Gráfico de amplitude média de correntes inibitórias pós-sinápticas (CIPs) em neurônios do NTS comissural, mostrando as alterações quando da administração de angiotensina II (A II) exógena nas concentrações de 1 e 3 μM, bem como o período de recuperação após a reperfusão do sistema com solução padrão.

**Controle****Angiotensina II – 1 μM****Recuperação**

**Figura 65:** Registros eletrofisiológicos e histograma de amplitude representativos do grupo de neurônios do NTS comissural que *não apresentou* alteração na amplitude dos CEPs quando da aplicação exógena de angiotensina II

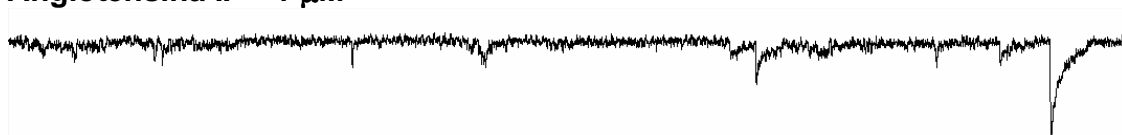


**Figura 66:** Gráfico de amplitude média de correntes excitatórias pós-sinápticas (CEPs) em neurônios do NTS comissural, quando da administração de angiotensina II (A II) exógena nas concentrações de 1 e 3  $\mu$ M, bem como o período de recuperação após a reperfusão do sistema com solução padrão.

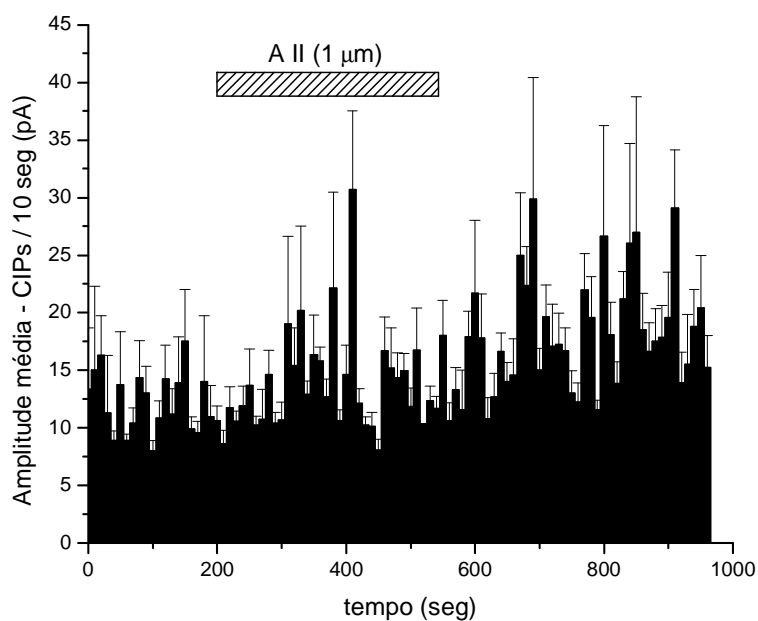
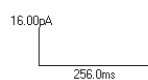
Controle



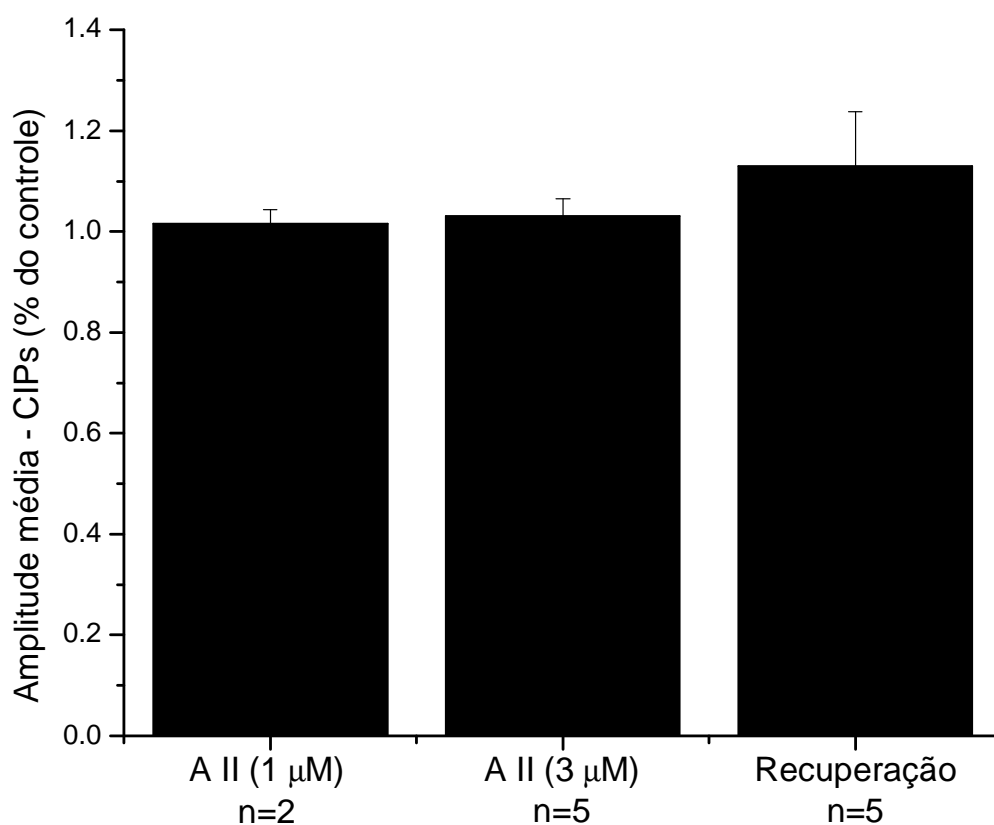
Angiotensina II – 1  $\mu$ M



Recuperação



**Figura 67:** Registros eletrofisiológicos e histograma de amplitude representativos do grupo de neurônios do NTS comissural que *não apresentou* alteração na amplitude dos CIPs quando da aplicação exógena de angiotensina II.



**Figura 68:** Gráfico de amplitude média de correntes inibitórias pós-sinápticas (CIPs) em neurônios do NTS comissural, quando da administração de angiotensina II (A II) exógena nas concentrações de 1 e 3  $\mu\text{M}$ , bem como o período de recuperação após a reperfusão do sistema com solução padrão.



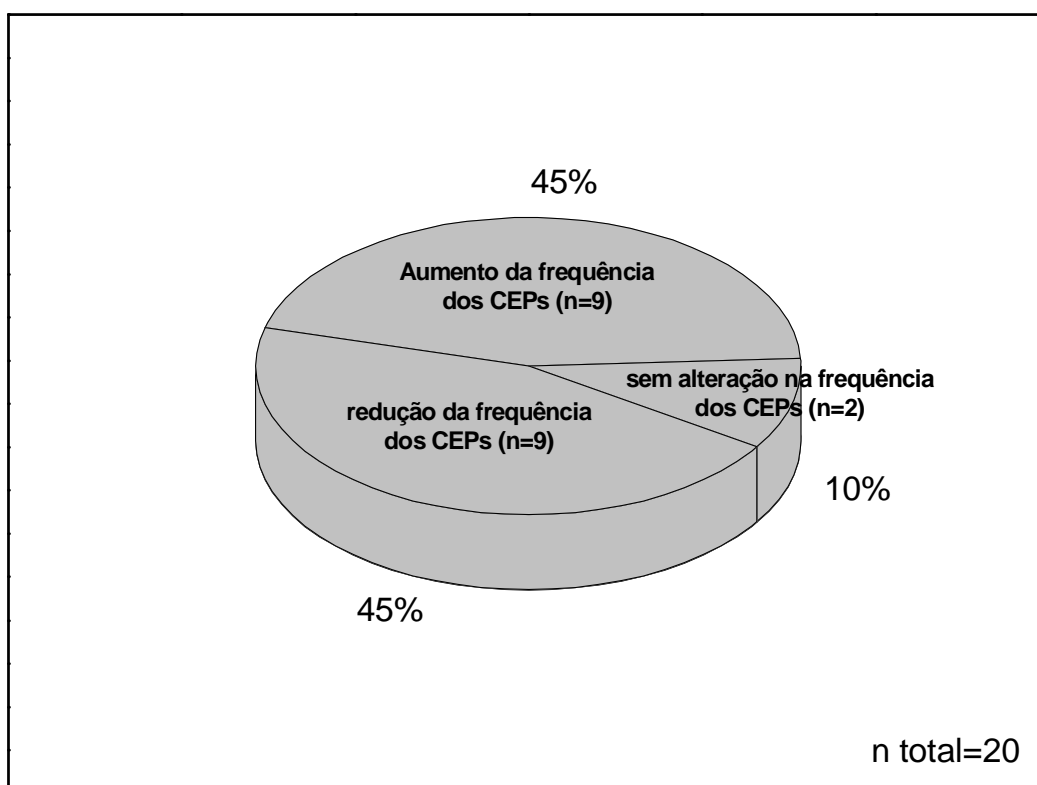
### C – Experimentos em fatias horizontais do NTS

#### *1) Avaliação do efeito farmacológico da angiotensina sobre neurotransmissão glutamatérgica em sinapses dos neurônios contidos em fatias horizontais do NTS comissural:*

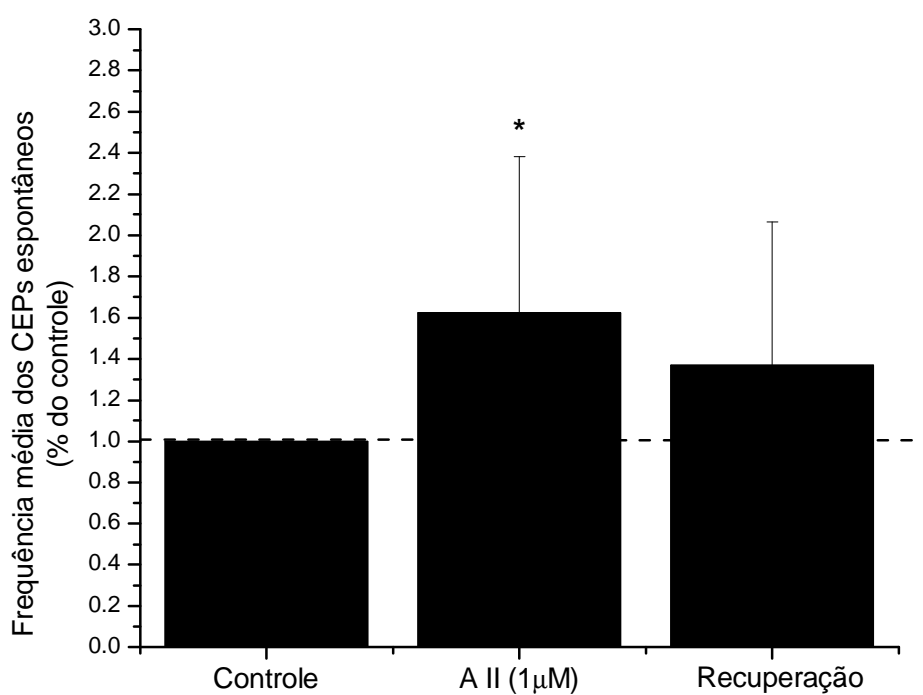
Em sequência aos registros eletrofisiológicos em neurônios dispersados mecanicamente, procedemos ao registro de neurônios do NTS comissural em fatias horizontais do tronco cerebral. Assim, em um primeiro momento, avaliamos o efeito da aplicação de angiotensina II (1 $\mu$ M) sobre a frequência e a amplitude das correntes excitatórias pós-sinápticas espontâneas observadas em neurônios do NTS comissural, na presença de TTX e Gabazina (antagonista de receptores GABA<sub>A</sub>). Como resultado observamos três padrões de resposta à aplicação de angiotensina II: no total de 20 neurônios registrados, 9 neurônios (45%) apresentaram aumento na frequência das CEPs espontâneas (1,62 $\pm$ 0,75) em relação ao controle; 9 neurônios apresentaram redução na frequência das CEPs espontâneas (45% - 0,62 $\pm$ 0,19) e 2 neurônios remanescentes (10%) não apresentaram qualquer alteração significativa na frequência espontânea das CEPs (1,12 $\pm$ 0,59 - figura 69). A figura 70 mostra os dados referentes ao grupo de neurônios do NTS comissural que apresentaram aumento da frequência das CEPs espontâneas em fatias horizontais do tronco cerebral após a aplicação de angiotensina II (1  $\mu$ M).

Na figura 71, observamos os dados referentes ao grupo de neurônios do NTS comissural, presentes em fatias horizontais do tronco cerebral, que apresentaram redução na frequência da ocorrência de CEPs espontâneos após a aplicação de angiotensina II (1  $\mu$ M). A figura 72 ilustra os dados referentes aos neurônios do NTS comissural que não

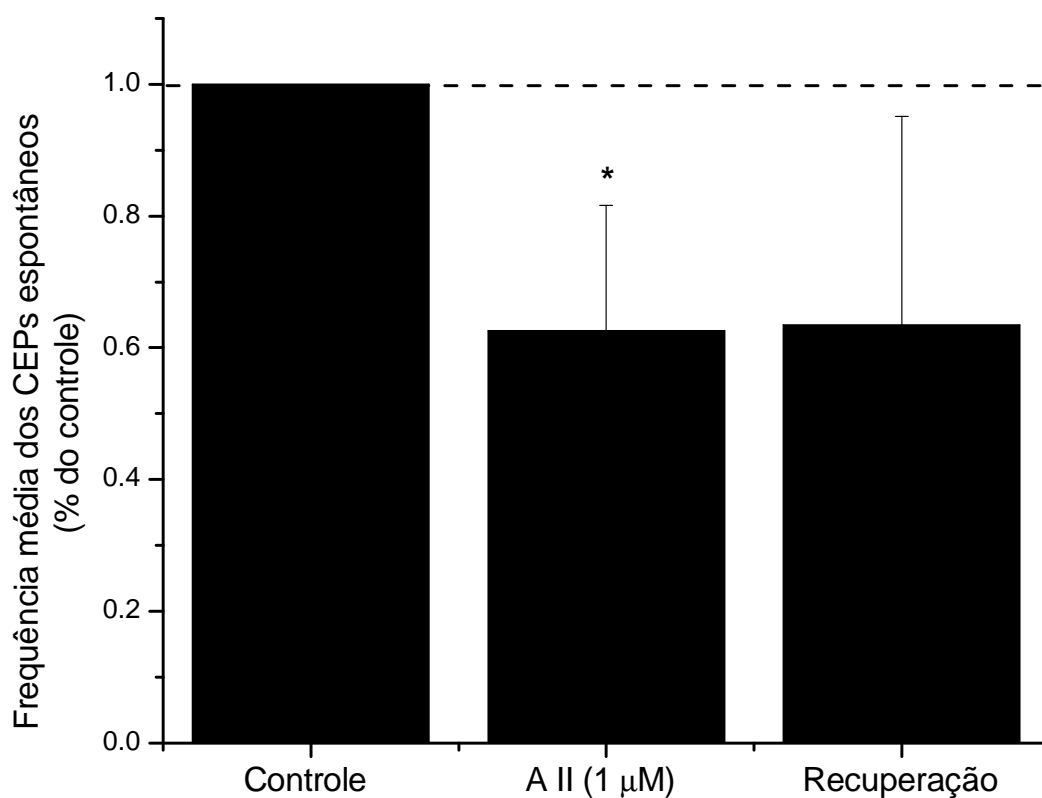
apresentaram qualquer alteração na frequência dos CEPs espontâneos após a aplicação de angiotensina II (1  $\mu$ M). Os dados referentes ao presente experimento encontram-se relacionados nas tabelas 18 e 19 do apêndice.



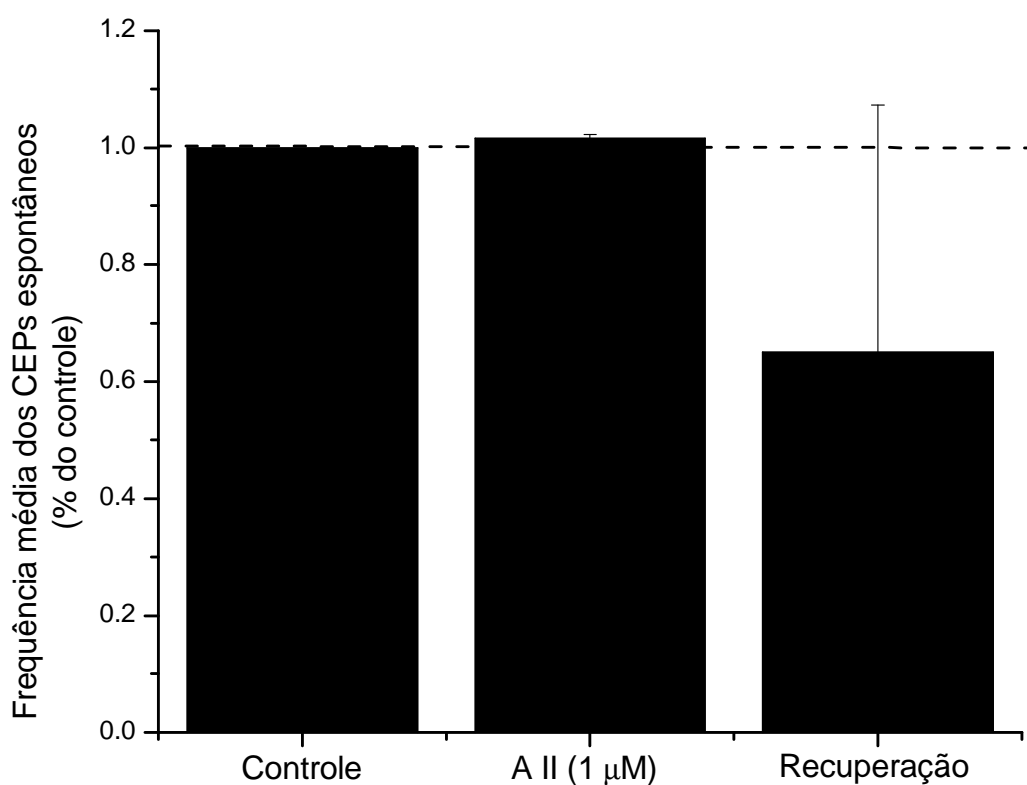
**Figura 69:** Gráfico mostrando a proporção de células que apresentaram aumento, redução e que não apresentaram alterações na frequência média dos CEPs espontâneos na presença de Gabazina e TTX.



**Figura 70:** Gráfico de frequência média de correntes excitatórias pós-sinápticas (CEPs) em neurônios do NTS comissural contidos em fatias horizontais do tronco cerebral, mostrando as alterações quando da administração de angiotensina II (A II) exógena na concentração de 1 µM, bem como o período de recuperação após a reperfusão do sistema com solução padrão (\* = diferente do controle,  $p < 0,05$ .  $n=9$ ). Dados expressos como média  $\pm$  DPM.



**Figura 71:** Gráfico de frequência média de correntes excitatórias pós-sinápticas (CEPs) em neurônios do NTS comissural contidos em fatias horizontais do tronco cerebral, mostrando as alterações quando da administração de angiotensina II (AII) exógena na concentração de 1 μM, bem como o período de recuperação após a reperfusão do sistema com solução padrão (\* = diferente do controle,  $p < 0,01$ ,  $n=9$ ). Dados expressos como média  $\pm$  DPM.



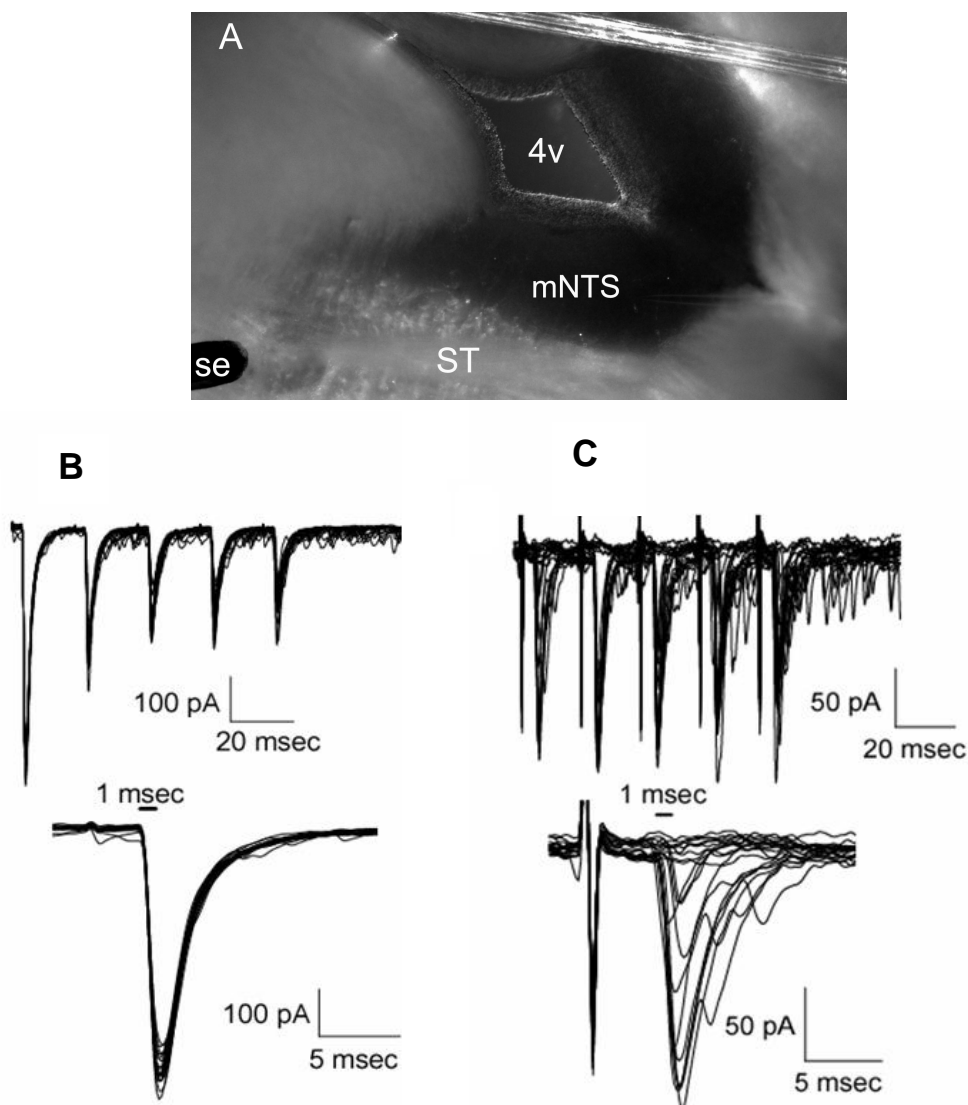
**Figura 72:** Gráfico de frequência média de correntes excitatórias pós-sinápticas (CEPs) em neurônios do NTS comissural contidos em fatias horizontais do tronco cerebral, mostrando as alterações quando da administração de angiotensina II (AII) exógena na concentração de 1 µM, bem como o período de recuperação após a reperfusão do sistema com solução padrão (n=2). Dados expressos como média ± DPM.

*2) Avaliação do efeito farmacológico da angiotensina sobre as correntes excitatórias pós-sinápticas evocadas pela estimulação elétrica do trato solitário em neurônios contidos em fatias horizontais do NTS comissural:*

Nesta fase, realizamos experimentos envolvendo a estimulação elétrica do TS através de um eletrodo bipolar concêntrico e o registro das CEPs evocadas em neurônios de fatias horizontais do NTS comissural, antes e após a administração de angiotensina II (1  $\mu$ M). Este estímulo contitui-se de um trem de 5 estímulos elétricos ao trato solitário a cada 6 segundos, sendo que intervalo entre os estímulos de um mesmo trem foi de 20 ms. As fatias horizontais do tronco cerebral foram preparadas segundo a técnica descrita por Doyle e cols. (2004). Esta preparação possibilita que o eletrodo estimulador seja posicionado em região do trato solitário distante da região do NTS a ser registrada, diminuindo assim a possibilidade de registro de correntes causadas por estimulação de campo, além de otimizar a identificação de neurônios de segunda-ordem do NTS (figura 73, painel A). No painel B da figura 73, mostramos um traçado eletrofisiológico de um neurônio do NTS, apresentando as correntes excitatórias pós-sinápticas evocadas pela estimulação do trato solitário. Na figura 73, painel C, apresentamos as correntes excitatórias pós-sinápticas evocadas pela estimulação elétrica do trato solitário, registradas em neurônios de ordem superior (terceira ordem e superiores). Ainda, visualizamos os neurônios contidos na fatia através do uso de tecnologia de contraste de interferência diferencial associada ao uso de iluminação infravermelha. Com isso pudemos observar com certo detalhamento os neurônios que foram registrados (figura 74).

Dos 7 neurônios registrados observamos que 2 destes (28,56%) apresentaram aumento na amplitude dos CEPs, outros 2 neurônios (28,56%) apresentaram redução na amplitude dos CEPs e outros 3 neurônios remanescentes deste grupo experimental (42,86%) não apresentaram qualquer alteração na amplitude dos CEPs evocados pela estimulação do trato solitário (figura 75). A figura 76 resume os dados referentes ao grupo de células que apresentou aumento na amplitude dos CEPs evocados pela estimulação elétrica do trato solitário frente à aplicação de angiotensina II ( $1 \mu\text{M}$ ) ao perfusato. Ainda, na figura 77, mostramos os dados referentes ao grupo de neurônios que apresentou redução na amplitude dos CEPs evocados após a aplicação de angiotensina II. Na figura 78 observamos os dados referentes ao grupo de neurônios que não apresentou qualquer alteração na amplitude dos CEPs evocados pela estimulação elétrica do trato solitário após a aplicação de angiotensina II ( $1\mu\text{M}$ ) ao perfusato. Os dados referentes ao presente experimento encontram-se na tabela 20 do apêndice.

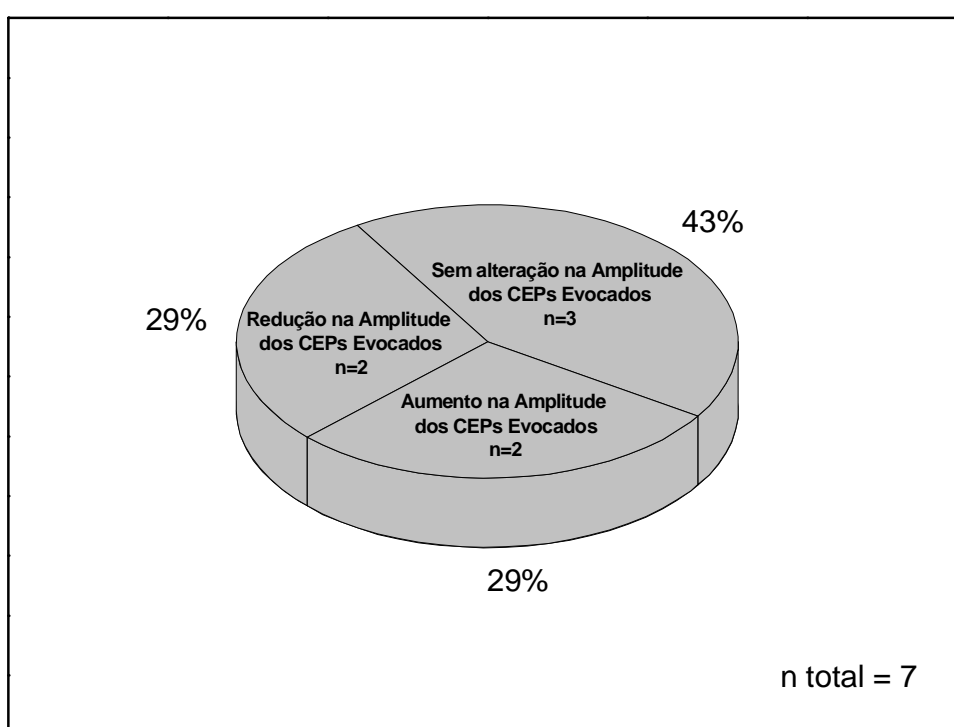




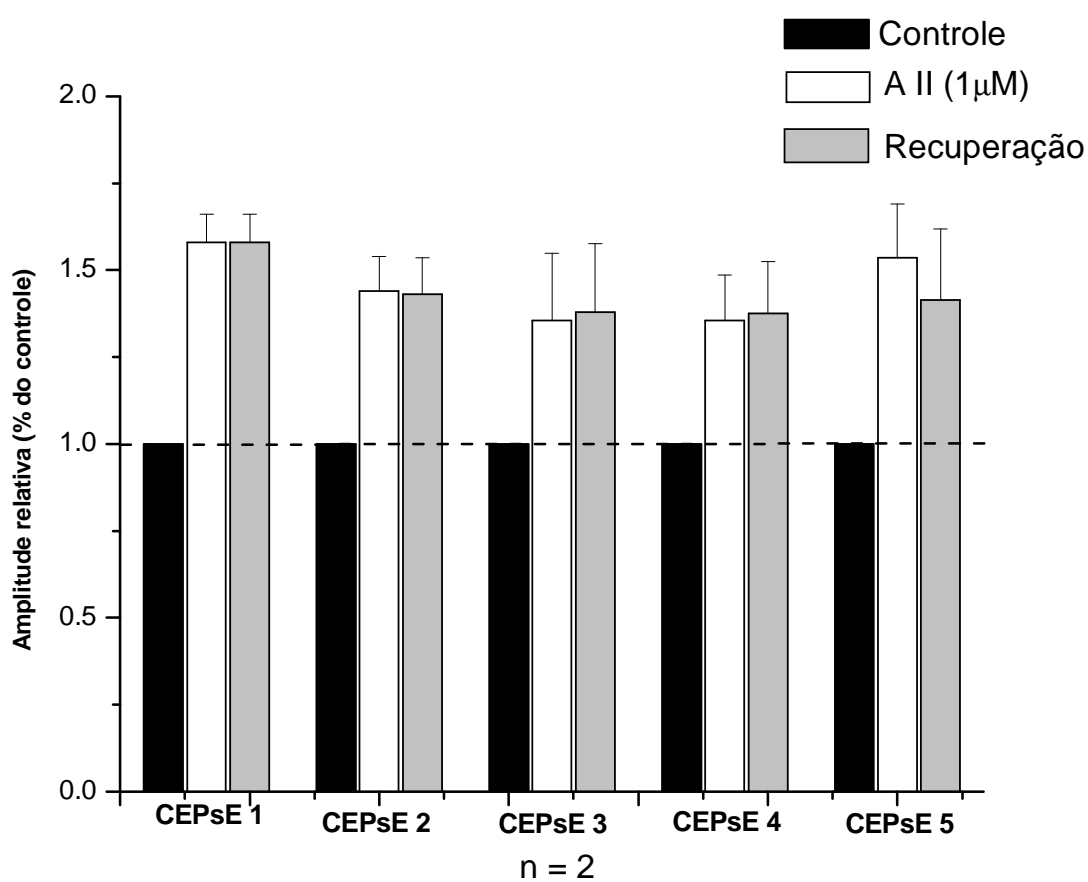
**Figura 73:** A:Fotomicrografia do tronco cerebral em corte horizontal, mostrando o NTS, trato solitário (ST), eletrodo estimulador (SE) e eletrodo de registro (aumento de 150 vezes). B: Correntes excitatórias pós-sinápticas evocadas pela estimulação elétrica do trato solitário registradas em neurônios de segunda ordem do NTS. C: Correntes excitatórias pós-sinápticas evocadas pela estimulação elétrica do trato solitário registradas em neurônios de ordem superior (terceira ordem e ordens maiores).



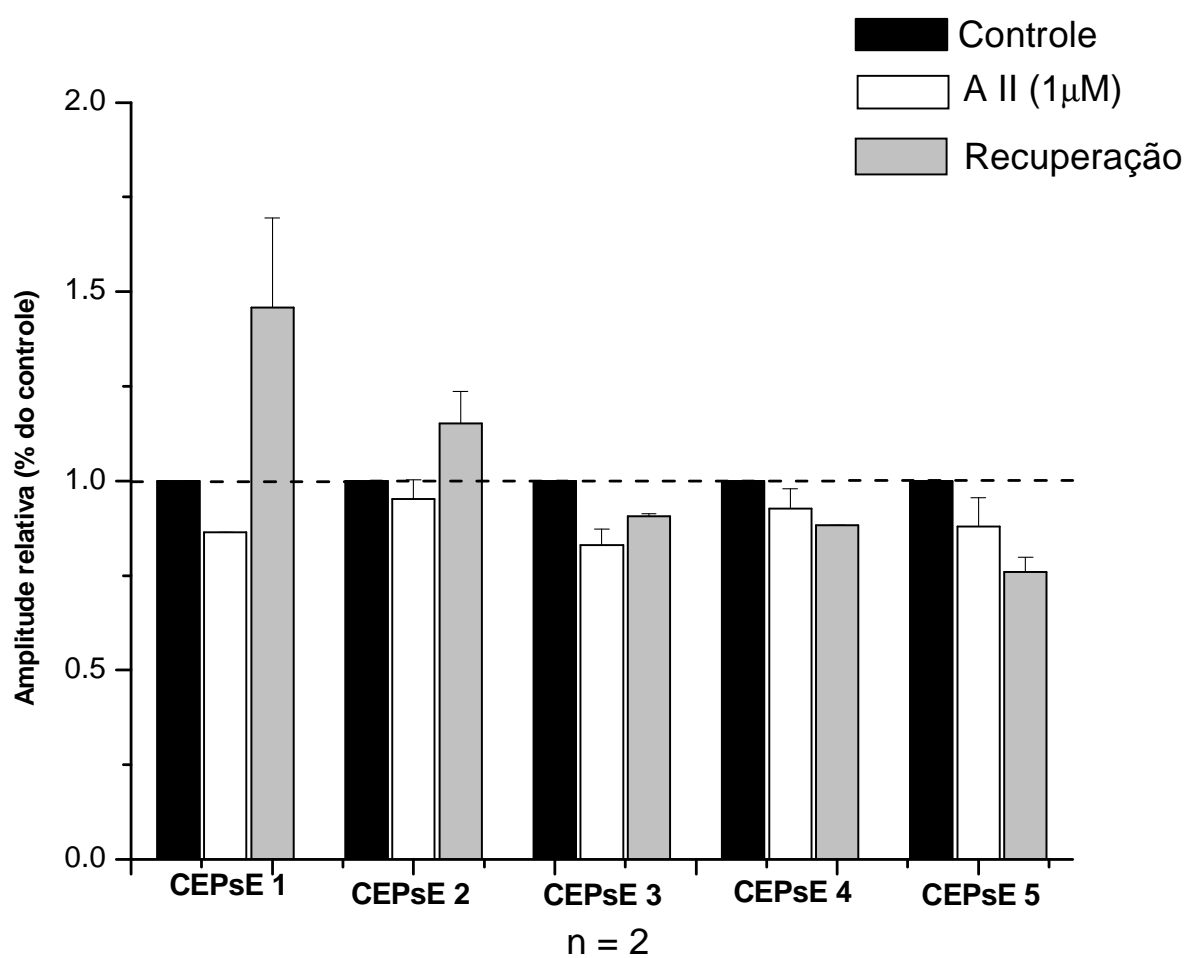
**Figura 74:** Fotomicrografia de neurônios do NTS, mostrando neurônios viáveis do NTS e eletrodo de registro, visualizados através de tecnologia de contraste de interferência diferencial e iluminação infra-vermelha (aumento de 450 vezes).



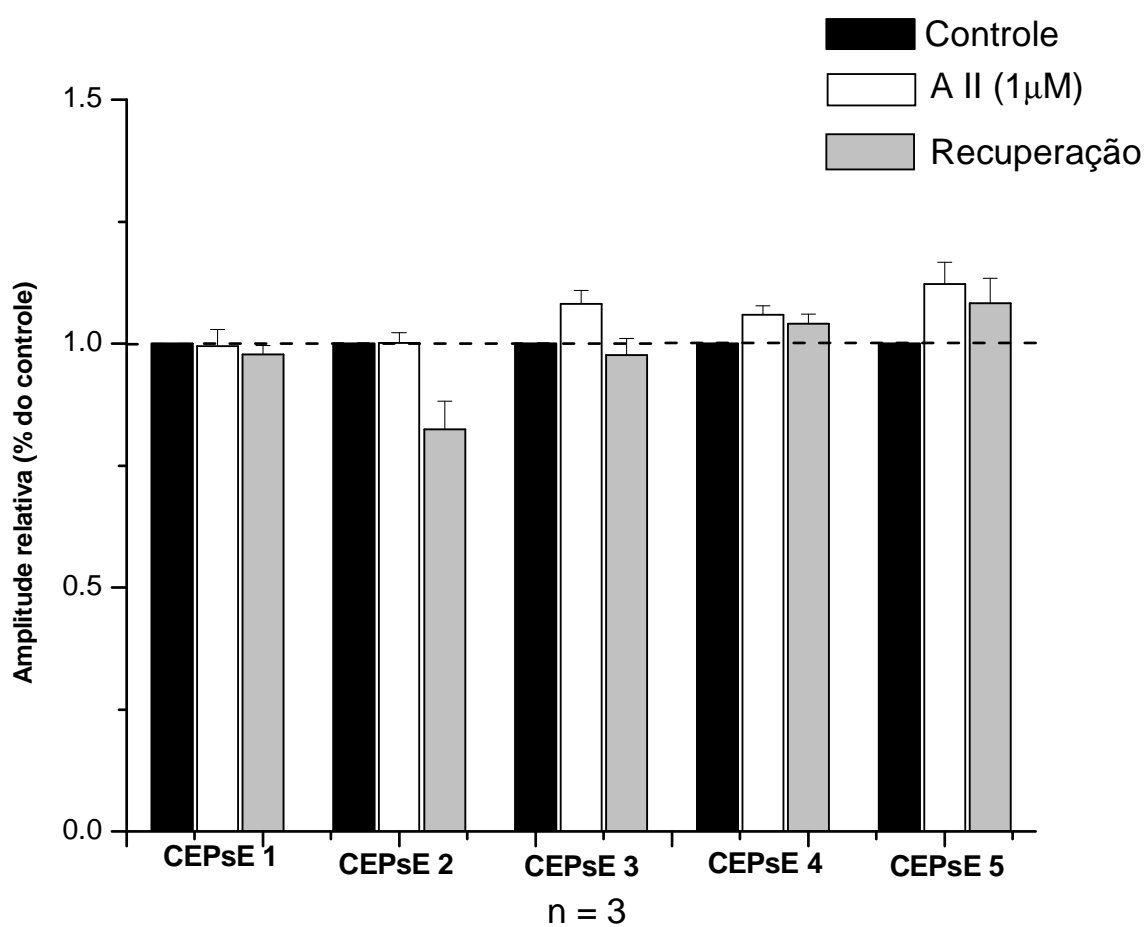
**Figura 75:** Gráfico amostral da proporção de células do NTS que apresentaram aumento, redução e ausência de alterações na amplitude média dos CEPs evocados pela estimulação elétrica do trato solitário frente à aplicação de angiotensina II (1  $\mu$ M).



**Figura 76:** Gráfico referente ao grupo de neurônios do NTS comissural que apresentou aumento na amplitude dos CEPs evocados (CEPsE) pela estimulação elétrica do trato solitário após a aplicação de angiotensina II ao perfusato (n=2).



**Figura 77:** Gráfico referente ao grupo de neurônios do NTS comissural que apresentou redução na amplitude dos CEPs evocados (CEPsE pela estimulação elétrica do trato solitário após a aplicação de angiotensina II ao perfusato (n=2).



**Figura 78:** Gráfico referente ao grupo de neurônios do NTS comissural que não apresentou alteração na amplitude dos CEPs (CEPsE) evocados pela estimulação elétrica do trato solitário após a aplicação de angiotensina II ao perfusato (n=3).

**VIII- DISCUSSÃO**

O presente estudo compreendeu experimentos relativos às ações da angiotensina II no RVLM e no NTS para a neurotransmissão-neuromodulação da resposta simpato-excitatória do quimiorreflexo em ratos acordados. Observamos, como principais resultados, que o bloqueio bilateral dos receptores de angiotensina do RVLM, em animais acordados, não promoveu queda na pressão arterial basal. A resposta pressora do quimiorreflexo foi significativamente reduzida pelo bloqueio bilateral dos receptores de angiotensina do RVLM em animais acordados. O bloqueio dos receptores de angiotensina do NTS de animais acordados não alterou a resposta pressora à ativação do quimiorreflexo. A ativação de receptores de angiotensina em neurônios do NTS comissural promove diversos padrões de resposta nos CIPs e nos CEPs espontâneos e evocados. Os resultados deste estudo serão discutidos de acordo com cada uma das etapas realizadas.

***a) Bulbo Rostroventro-lateral:***

A fase inicial deste estudo teve como objetivo avaliar os aspectos farmacológicos da microinjeção de angiotensina II no RVLM. No que diz respeito às informações presentes na literatura relacionadas à participação dos receptores de angiotensina II do RVLM na modulação dos reflexos cardiovasculares, podemos observar que as técnicas de microinjeções no parênquima do sistema nervoso central (SNC) utilizadas neste estudo têm sido vastamente utilizadas no intuito de limitar a ação de uma determinada droga à uma pequena região do SNC, entretanto, na maioria dos casos, em animais anestesiados. O RVLM constitui uma das mais importantes regiões na qual os peptídeos de angiotensina produzem efeitos cardiovasculares (Tagawa e cols., 2000; Head, 1996), pois



este núcleo é a maior fonte de atividade eferente simpática bulboespinal para os neurônios pré-ganglionares simpáticos da medula espinal (Dampney, 1994) e possui alta densidade de receptores de angiotensina II em diversas espécies, como no rato, no coelho, no cão e no gato (Mendelsohn e cols., 1988, Speth e cols., 1995). A existência de imunoreatividade para receptores de angiotensina II no bulbo ventrolateral e nos processos neurais do RVLM próximos à superfície ventral do bulbo (Benaroch e cols., 1986) sugerem que a angiotensina II possa ter acesso imediato ao RVLM tanto através de sinapses angiotensinérgicas como através do fluido cérebro-espinal (Bunnemann e cols., 1992). Estudos de Andreatta e cols. (1988) forneceram as primeiras evidências de uma ação tônica da angiotensina II no RVLM do gato anestesiado, visto que a microinjeção de Sarile promoveu queda da pressão arterial. Sasaki e Dampney (1990) e Sasaki e cols. (1993) demonstraram que os sítios do RVLM que são responsáveis pelos maiores aumentos da pressão arterial frente à microinjeções de l-glutamato são aqueles nos quais são encontradas as maiores densidades de receptores de angiotensina II e, além disso, forneceram a primeira evidência para a ação tônica da angiotensina II no RVLM do coelho sino-aorticamente desnervado, mostrando que a microinjeção bilateral de Sartran promoveu redução na pressão arterial média e na atividade simpática do nervo renal (RSNA). Estudos na literatura sugerem que a microinjeção de angiotensina II no RVLM promove respostas semelhantes àsquelas observadas quando da microinjeção de glutamato, isto é, aumento na pressão arterial e na atividade simpática do nervo renal (Saigusa e Head, 1993). A similiaridade entre estas duas respostas sugere que a angiotensina II atue diretamente sobre os neurônios responsáveis pela atividade simpática vasomotora. De fato, estudos eletrofisiológicos têm mostrado que a angiotensina II parece ativar

diretamente neurônios bulboespinais vasomotores da região C1 através da ativação pós-sináptica dos receptores AT1, resultando em fechamento de canais de  $K^+$  e despolarização da membrana (Li e Guyenet, 1996). Existe muito interesse acerca da possibilidade da angiotensina II participar da manutenção da atividade eferente simpática através de sua liberação endógena de forma tônica, já que Ito e Sved (2000) mostraram que a microinjeção bilateral de Sartan no RVLM no rato anestesiado reduz substancialmente a pressão arterial basal.

Com isso, o nosso primeiro protocolo experimental visou a obtenção de uma curva concentração-resposta à microinjeção de angiotensina II no RVLM de ratos acordados, com a finalidade de se estabelecer uma concentração intermediária para a angiotensina II. Observamos que a microinjeção de angiotensina II no RVLM de ratos acordados, promoveu respostas pressoras que seguiram um padrão concentração-dependente. Estes resultados estão de acordo com curvas concentração-respostas para a angiotensina II no RVLM disponíveis na literatura, pois mostram que são necessárias concentrações muito baixas de angiotensina II para promover respostas pressoras (Head e cols., 1990).

Avaliamos também a ocorrência ou não de taquifilaxia em resposta à microinjeção de angiotensina II no RVLM de ratos acordados. A taquifilaxia é um fenômeno ainda não muito bem elucidado, porém seria semelhante à uma dessensibilização de receptores, onde microinjeções consecutivas do mesmo peptídeo causariam redução progressiva das respostas. Assim, observamos que microinjeções consecutivas de uma mesma concentração de angiotensina II no RVLM de ratos acordados, em intervalos de tempo decrescentes, não promoveu qualquer redução na

magnitude desta resposta pressora, nem no tempo de duração desta resposta, mostrando que os receptores de angiotensina no RVLM de ratos acordados não estão sujeitos ao fenômeno de taquifilaxia, diferindo portanto dos animais anestesiados, uma vez que este fenômeno parece ocorrer em animais anestesiados, como referido por Ito e Sved (1996) e Tagawa e Dampney (1999).

Uma vez determinada a dose intermediária da angiotensina II, realizamos o estudo da concentração do antagonista não-específico dos receptores de angiotensina (Sartran), que seria efetiva no bloqueio da resposta pressora produzida pela microinjeção de angiotensina II (8 mM), no RVLM de ratos acordados. Inicialmente, usamos a concentração de 20 mM de Sartran para testar contra a dose intermediária de angiotensina II e esta concentração do antagonista não bloqueou as respostas pressoras à microinjeção de angiotensina II no RVLM de ratos acordados. Vale destacar que esta concentração foi eficiente em bloquear a resposta pressora à microinjeção de angiotensina II no RVLM em ratos anestesiados (Ito e Sved, 2000). Esta diferença entre os animais anestesiados e acordados corrobora com as evidências de que em experimentos realizados em ratos anestesiados ou acordados possam apresentar resultados distintos.

Devido ao fato de que a concentração de 20 mM do Sartran não bloqueou a resposta pressora à microinjeção de angiotensina II no RVLM de ratos acordados, decidimos avaliar se concentrações maiores de Sartran seriam efetivas no bloqueio desta resposta pressora. Com isso, utilizamos a concentração de 40 mM e esta concentração do antagonista reduziu significativamente a resposta pressora à microinjeção da angiotensina II, tanto na magnitude quanto na duração. Tendo estabelecido a concentração do Sartran que bloqueia a resposta pressora à microinjeção da angiotensina II no RVLM de ratos

acordados, o próximo passo foi o teste da ativação do quimiorreflexo pela injeção intravenosa de KCN contra esta concentração. Estas microinjeções foram feitas bilateralmente com a finalidade de bloquear os receptores de angiotensina do RVLM assegurando assim, que as possíveis sinapses angiotensinérgicas da via simpato-excitatória do quimiorreflexo no RVLM estariam bloqueadas. Observamos neste experimento a redução significativa na resposta pressora à ativação do quimiorreflexo aos cinco minutos após a microinjeção bilateral de Sartran. Com isso, podemos sugerir que os receptores de angiotensina localizados no RVLM de ratos participam do processamento do componente simpato-excitatório do quimiorreflexo no RVLM. Estes resultados abrem novas possibilidades para o entendimento da neurotransmissão e neuromodulação do componente simpato-excitatório do quimiorreflexo pois, é provável que a angiotensina necessária para ativar estes receptores provavelmente seja originária das projeções angiotensinérgicas oriundas de outras regiões do sistema nervoso central como o PVN, por exemplo, como demonstrado por Tagawa e Dampney (1999). O conhecimento das condições nas quais a angiotensina seria liberada em maior ou menor quantidade nestas sinapses pode fornecer evidências importantes para o entendimento acerca da neurotransmissão e da neuromodulação dos reflexos cardiovasculares no SNC, podendo surtir impacto sobre o entendimento de mecanismos fisiológicos e fisiopatológicos associados aos reflexos cardiovasculares, como por exemplo em certos estados que levam à hipertensão arterial.

Vale ressaltar que nos nossos experimentos não observamos qualquer redução na pressão arterial basal após a microinjeção bilateral do Sartan. Estes dados contrastam com os resultados obtidos por Ito e Sved (2000), os quais mostraram que a microinjeção

bilateral de antagonistas de receptores de angiotensina no RVLM promove queda da pressão arterial para níveis observados em animais com transecção de medula espinal. No entanto, o estudo realizado por Ito e Sved (2000) foi realizado em animais anestesiados, sendo possível que os resultados obtidos por estes pesquisadores sejam pelo menos em parte devidos ao fato do anestésico poder estar influenciando a atividade simpática. Além disso, sistemas hormonais como o sistema renina-angiotensina podem estar ativados durante experimentos realizados em animais anestesiados após intervenções cirúrgicas razoavelmente extensas (Chernow e cols., 1987). Outrossim, estudos recentes sugerem que o efeito depressor observado quando da microinjeção de sarile ou sartran (antagonistas não-seletivos de receptores de angiotensina) bilateralmente no RVLM depende de um mecanismo não relacionado com o bloqueio dos receptores de angiotensina propriamente ditos, mas provavelmente da inibição de efeitos excitatórios tônicos ou ativação de efeitos inibitórios tônicos de um componente endógeno ainda não identificado, ou ainda estes antagonistas podem estar atuando em receptores ainda não identificados dos neurônios do RVLM, produzindo assim um efeito inibitório sobre estes neurônios (Potts e cols., 2000). Não podemos ainda descartar que a angiotensina II esteja sendo degradada em outros peptídeos e através destes exercendo sua ação em seus respectivos receptores (Sasaki e cols., 1993; Mendelsohn e cols., 1984 e 1988; Silva e cols., 1993; Fontes e cols., 1994; Fontes e cols., 1997 e 2000).

***b) Núcleo do Trato Solitário:***

A segunda etapa descrita neste estudo visou avaliar os aspectos farmacológicos da microinjeção de angiotensina II no NTS. Com isso, o primeiro protocolo experimental

visou a obtenção de uma curva concentração-resposta à microinjeção de angiotensina II no NTS de ratos acordados, com a finalidade de se estabelecer uma concentração intermediária da angiotensina II. Para tanto realizamos microinjeções de diferentes concentrações de angiotensina II no NTS de ratos acordados. Observamos que a microinjeção de angiotensina II no NTS de ratos acordados, promoveu respostas pressoras que seguiram um padrão concentração-dependente. Assim estabelecemos a concentração intermediária de 10 mM.

No quarto protocolo experimental tivemos como objetivo avaliar a participação dos receptores da angiotensina II em outras áreas do tronco cerebral para a resposta pressora do quimiorreflexo. Decidimos realizar este protocolo experimental devido ao fato que as microinjeções de angiotensina II fora do NTS, inclusive dorsais, promoveram respostas cardiovasculares similares àquelas promovidas pela microinjeção da angiotensina II no NTS. Entretanto, não poderíamos afirmar se esta resposta pressora observada era devida ao espalhamento da angiotensina II microinjetada em sítios adjacentes ao NTS até as diferentes sub-regiões do NTS, e que poderiam ser responsáveis pela resposta pressora observada. Este resultado estaria de acordo com estudos de Bunnemann e cols. (1992) que sugeriu que a angiotensina (ou seus fragmentos) seriam liberados em terminações sinápticas para ativar receptores pós-sinápticos (“wiring transmission”) ou se difundiriam pelo fluido extracelular ativando receptores distantes do local de liberação (“volume transmission”). Portanto, a microinjeção de angiotensina fora do NTS poderia ativar os receptores de angiotensina localizados neste núcleo, através de difusão pelo fluido extra-celular. Estudos anteriores (Iriki e cols., 1997, Iriki e Kozawa, 1983) sugerem que a administração de angiotensina II no 4V produz resposta eferente

simpática semelhante àquela observada quando da ativação do quimiorreflexo por meio da hipóxia, sugerindo assim, que estes receptores localizados no tronco cerebral seriam ativados durante a ativação do quimiorreflexo.

Em fase subsequente, com a finalidade de estabelecer a concentração do Sartran que bloqueia a concentração intermediária da angiotensina II no NTS, verificamos que, à semelhança do observado nos experimentos relacionados ao RVLM, que a solução de Sartran de 20 mM não foi eficiente em bloquear a resposta pressora promovida à microinjeção de angiotensina II no NTS. Portanto, decidimos utilizar para o referido experimento, a concentração de 40 mM de Sartran. Como resultado, observamos que a resposta pressora à microinjeção de angiotensina II no NTS de ratos acordados foi significativamente reduzida. Tendo estabelecido esta concentração do antagonista que atenua as respostas à concentração intermediária da angiotensina II, procedemos então aos experimentos relacionados à ativação do quimiorreflexo antes e depois da microinjeção de Sartran na concentração de 40 mM no NTS de ratos acordados, onde não observamos alteração significativa na resposta pressora do quimiorreflexo. Como houve aumento da pressão arterial basal após a microinjeção bilateral de sartran, sugerimos que os receptores de angiotensina do NTS sejam ativados tonicamente em animais normais.

Observamos ainda neste estudo, que a microinjeção bilateral de Sartran no NTS de animais acordados promove aumento da pressão arterial basal. Isso poderia ser explicado pela ação antagonista parcial do Sartran, uma vez que Michelini e Bonagamba (1990) mostraram que a microinjeção de angiotensina II no NTS promove redução da via simpato-inibitória do barorreflexo. Vale ainda ressaltar que este estudo de Michelini e

Bonagamba (1990) foi realizado em condições experimentais muito semelhantes àquelas que usamos neste estudo.

***c) Neurônios isolados do NTS comissural:***

Estudos eletrofisiológicos mostram que a angiotensina potencia a transmissão sináptica em neurônios que fazem parte das vias neurais do quimiorreflexo (Kasparov e Paton, 1999) e que a aplicação de angiotensina II, em fatias horizontais do tronco cerebral promove despolarização da membrana, redução da resistência da membrana neuronal (aumento da condutância iônica), potenciação da amplitude dos potenciais excitatórios pós-sinápticos (PEPs) evocados em resposta à ativação do Trato Solitário (TS), redução da latência dos PEPs, além de promover salvas de potenciais de ação de alta frequência (Barnes e cols., 2003). Desta forma, estes trabalhos em conjunto sugerem a neuromodulação exercida pela angiotensina II e seus receptores sobre neurotransmissão das informações aferentes quimiorreceptoras no NTS.

O objetivo da etapa seguinte de nosso estudo foi analisar a possível influência da angiotensina II sobre a neurotransmissão glutamatérgica nas sinapses dos neurônios do NTS comissural que, possivelmente, fazem parte das vias neurais do quimiorreflexo. Com relação aos efeitos da angiotensina II sobre os eventos espontâneos observados em nosso estudo, diversos estudos disponíveis na literatura suportam nossos achados, entretanto estes estudos, em sua maioria, foram realizados em outras regiões do sistema nervoso central. Li e Pan (2005) mostraram que a aplicação de angiotensina reduz a frequência dos potenciais pós-sinápticos inibitórios evocados e dos *minis* em neurônios do núcleo paraventricular do hipotálamo, assim, evidenciando a existência de receptores



de angiotensina pré-sinápticos que, quando ativados, promovem redução na frequência da liberação vesículas contendo GABA por atuação direta em canais iônicos ou através da ativação de vias de segundo mensageiro. De forma semelhante, Latchford e Fergusson (2004) mostraram que a administração de angiotensina II promove aumento da frequência de liberação de glutamato em neurônios magnocelulares do núcleo paraventricular do hipotálamo. Estas observações mostram que os nossos achados, que sugerem alteração na frequência dos eventos espontâneos e, portanto, existência de receptores pré-sinápticos de angiotensina II que, quando ativados, promovem alteração na frequência dos eventos espontâneos, estão de acordo com a observação de outros pesquisadores, mesmo que em outras áreas do sistema nervoso central. Ainda, em nossos estudos, observamos um menor grupo de células que não apresentaram alteração na frequência dos CEPs ou dos CIPs. Isto, provavelmente, ocorreu porque estes neurônios não possuem receptores Angiotensinérgicos pré-sinápticos. Vale lembrar que, a dispersão mecânica não seleciona qualquer variedade neuronal, apenas possibilita que realizemos registros isolados de um neurônio de uma determinada área anatômica. Assim, é possível que tenhamos registrado células de populações neuronais heterogêneas e pertencentes a circuitos neurais distintos do NTS.

Com relação às alterações observadas na amplitude, aparentemente não existem dados compatíveis na literatura, pois trata-se da primeira vez que é observado alterações na amplitude dos eventos espontâneos com a aplicação de angiotensina II. Alguns efeitos da angiotensina II na membrana pós-sináptica estão bem caracterizados por alguns estudos da literatura. Pan e cols. (2001) demonstraram que a angiotensina II promove o fechamento de canais retificadores para potássio, aumentando assim o potencial de

membrana e a excitabilidade celular em neurônios hipotalâmicos e do tronco cerebral, este fato também foi observado por Oz e Renaud (2002) em neurônios do corno ventral da medula espinal. Moreira e cols. (2005) mostraram que a ativação de receptores angiotensinérgicos pós-sinápticos está associado à inibição de correntes de cálcio em neurônios do gânglio nodoso. Portanto, estes estudos têm sugerido uma ação direta ou indireta da angiotensina II sobre a atividade de canais iônicos voltagem-dependentes. Nossas observações sugerem, pela primeira vez, a ação da angiotensina em canais que não são dependentes de voltagem, ou seja, a modulação angiotensinérgica em canais ativado por ligantes: receptores GABA<sub>A</sub> (no caso dos CIPs) e ionotrópicos de glutamato (NMDA e/ou não-NMDA no caso dos CEPs). Vale ressaltar que observamos tanto aumento como redução na amplitude dos CEPs e dos CIPs. Estes efeitos opostos provavelmente se devem à diferente proporção de expressão entre os receptores AT1 e AT2 na célula pós-sináptica, bem como da afinidade relativa da angiotensina II por estes receptores nas concentrações usadas nestes estudo. Não observamos um padrão concentração-dependente nas alterações na frequência e na amplitude dos CEPs e dos CIPs com as concentrações de angiotensina II testadas. A este respeito, estudos de Paton e Kasparov (1999 e 2000), mostraram que concentrações baixas de angiotensina II microinjetadas no NTS possuem efeitos opostos quando comparados aos efeitos promovidos pela microinjeção de altas concentrações de angiotensina II no NTS. Ainda, um terceiro grupo de neurônios do NTS comissural, a exemplo do observado na frequência, não apresentou qualquer alteração na amplitude dos eventos espontâneos registrados. Muito provavelmente, estes neurônios não continham receptores pós-sinápticos para angiotensina II.

***d) Neurônios do NTS comissural em fatias horizontais do tronco cerebral:***

Neste estudo observamos ainda, que em neurônios presentes em fatias do tronco cerebral, a aplicação de angiotensina II (1  $\mu$ M) promoveu aumento, redução ou ausência de alteração na frequência média dos mini-potenciais (na presença de TTX e Gabazina) registrados nestes neurônios. Estes dados estão de acordo com os dados observados em neurônios dissociados mecanicamente. Entretanto nesta preparação não observamos alterações na amplitude dos minis, dados estes que contrastam com o que fora observado em neurônios isolados mecanicamente. Estes dados podem refutar aqueles observados anteriormente em neurônios isolados, entretanto, estudos acerca da condutância iônica da membrana pós-sináptica antes e após a aplicação de angiotensina II ainda são necessários para elucidar esta diferença encontrada entre as duas técnicas eletrofisiológicas utilizadas.

Acerca das correntes excitatórias pós-sinápticas evocadas por estimulação do trato solitário em neurônios do NTS comissural, observamos um padrão semelhante ao observado em neurônios dissociados e em fatias horizontais do tronco cerebral, ou seja, a angiotensina II (1  $\mu$ M) pode aumentar, reduzir ou não alterar a liberação de glutamato nos terminais sinápticos em neurônios do NTS. Estes resultados estão em concordância com os dados de Barnes e cols. (2003) e de Paton e Kasparov (1999 e 2000), mostrando que a angiotensina (1  $\mu$ M) pode aumentar a excitabilidade dos neurônios do NTS, facilitar a liberação sináptica de glutamato e, desta forma, facilitar os reflexos cardiovasculares.

Nos resultados referentes aos neurônios isolados e contidos em slice, encontramos resultados diversos em relação à ação da angiotensina II sobre as correntes pós-sinápticas, tanto excitatórias quanto inibitórias. A importância funcional deste achado não pode ser sugerida neste estudo, entretanto, devido ao fato de que a microinjeção de angiotensina II no NTS promove alterações de pressão arterial e frequência cardíaca sem alterar a frequência respiratória (Fow e cols., 1994), nós poderíamos especular que os receptores de angiotensina II estão relacionados exclusivamente às vias cardiovasculares. Ainda, estudos neuroanatômicos sugerem que a via simpato-excitatória do quimiorreflexo depende de projeções diretas do NTS para o RVLM (Dampney, 1994; Aicher e cols., 1996). Com isso, se considerarmos a hipótese de que esses neurônios do NTS comissural fazem parte das vias neurais do quimiorreflexo, podemos sugerir que aqueles neurônios que apresentaram aumento da frequência de CEPs fazem parte das projeções diretas do NTS para o RVLM. Os neurônios que apresentaram diminuição dos CEPs, bem como aqueles que apresentaram aumento da frequência de CIPs, podem fazer parte das vias neurais de outro reflexo, como da via simpato-inibitória do barorreflexo e podem participar da inibição do barorreflexo após a microinjeção de altas concentrações de angiotensina II no NTS (Paton e Kasparov, 1999 e 2000) ou ainda podem se tratar de interneurônios pertencentes às diferentes vias dos reflexos cardiovasculares. Coerente com esta linha de raciocínio, os neurônios que não apresentaram alterações na frequência dos CEPs não pertencem às vias neurais de reflexos cardiovasculares. Esta sugestão encontra suporte nos dois mais importantes estudos presentes na literatura envolvendo estudos eletrofisiológicos do NTS e ativação de receptores de angiotensina II. Barnes e cols (2003) encontraram diversos padrões de respostas eletrofisiológicas frente à aplicação

de angiotensina II em neurônios do NTS, onde observaram um grupo de neurônios do NTS que são responsivos à angiotensina II e outro grupo constituídos de neurônios não responsivos. Os resultados observados no presente estudo e no estudo de Barnes e cols. (2003) ainda estão de acordo com os resultados obtidos por Kasparov e Paton (1999), onde estes autores observaram que neurônios do NTS que apresentam atividade espontânea de despolarização responderam à ativação do trato solitário com CEPs evocados e estes eventos foram potenciados pela aplicação exógena de angiotensina II, ao passo que, em neurônios silentes, a angiotensina II reduziu ou não promoveu qualquer alteração nos CEPs evocados pela estimulação do trato solitário. Assim, investigações adicionais acerca dos mecanismos celulares, vias autonômicas e da função dos diferentes grupos neuronais do NTS comissural são claramente necessárias para determinar a importância da localização pré- ou pós-sináptica dos receptores de angiotensina II nas vias neurais do quimiorreflexo.

*e) Considerações finais:*

Recentemente, muitos progressos foram atingidos no que concerne à importância das diferentes angiotensinas e dos seus respectivos receptores no tronco cerebral para a regulação da homeostasia cardiovascular. Um crescente número de estudos têm relatado os efeitos da ativação de receptores de angiotensinas no NTS, RVLM, CLM e outras áreas do sistema nervoso central, e estes efeitos parecem estar estreitamente relacionados com o estado fisiológico do animal experimental e com a atividade da informação aferente específica (Head, 1994 e 1995; Floras e cols., 1988; Buckley e cols., 1963; Wright e cols., 1985; Barron e cols., 1989; Bruner e Fink, 1986; Iriki e cols., 1977; Iriki e

Kozawa 1983; Chan e cols., 1991; Mosqueda-Garcia e cols.1990; Fontes e cols., 2000; Mayorov e cols., 2001; Kasparov e cols., 1998) . Isto parece ser especialmente importante para a habilidade adaptativa do SNC em alterar a atividade autonômica eferente frente às diversas situações fisiológicas. Na maioria dos estudos presentes na literatura, experimentos realizados em animais acordados mostram pouca ou nenhuma participação tônica dos receptores de angiotensina II do RVLM na manutenção da atividade eferente simpática basal, ou seja, não parece haver uma ativação tônica destes receptores. Estas observações estão de acordo com os resultados deste estudo, uma vez que o bloqueio bilateral de Sartran no RVLM de ratos acordados não promoveu queda da pressão arterial basal. O efeito tônico da ativação dos receptores de angiotensina no RVLM parece ser mais evidente em experimentos realizados com animais anestesiados, já que as condições fisiológicas parecem estar alteradas devido ao anestésico e aos procedimentos cirúrgicos realizados previamente aos experimentos. Entretanto, como observado neste estudo, os receptores de angiotensina do RVLM parecem participar da neuromodulação da resposta pressora do quimiorreflexo em ratos acordados, uma vez que o bloqueio bilateral dos receptores de angiotensina do RVLM promoveu redução significativa da resposta pressora do quimiorreflexo. Podemos assim, sugerir que as vias angiotensinérgicas sugeridas por Tagawa e Dampney (1999) oriundas do PVN que se projetam para o RVLM participam da resposta simpato-excitatória do quimiorreflexo. Essa hipótese encontra suporte em estudos anteriores do nosso laboratório que apontam para a participação do PVN nas respostas cardiovasculares do quimiorreflexo (Olivan e cols., 2001). Além disso, muitas evidências suportam a hipótese de que em situações onde existe um aumento das aferências simpato-excitatórias e uma redução das aferências

simpato-inibitórias para o RVLM, como o estresse agudo, hipertensão ou insuficiência cardíaca, a importância do sistema simpatoexcitatório angiotensínico do tronco cerebral parece se tornar mais evidente (Head, 1994 e 1995; Floras e cols., 1988; Head e cols., 1988; Bendle e cols., 1997; Barron e cols., 1989; Bruner e Fink, 1986; Haack e Mohring., 1978; Dorward e Rudd, 1991; Saigusa e Head, 1993; Bartholomeusz e Widdop, 1995; Liu e cols., 1999; Chan e cols., 1991; Mosqueda-Garcia e cols., 1990; Muratani e cols., 1991) .

No que concerne ao NTS, a importância dos receptores de angiotensina II para os reflexos cardiovasculares têm sido extensivamente estudada no que diz respeito à integração das informações barorreceptoras, entretanto, poucos estudos relatam a possível importância dos receptores da angiotensina do NTS para os mecanismos de integração das informações aferentes quimiorreceptoras. No tocante a estes mecanismos, como observado neste estudo não parece ocorrer a participação dos receptores de angiotensina do NTS na neuromodulação das respostas cardiovasculares do quimiorreflexo.

Em conclusão, de acordo com os resultados presentes neste estudo, observamos que os receptores de angiotensina II do RVLM participam da resposta simpato-excitatória do quimiorreflexo, pois o bloqueio destes receptores atenuou, de forma significativa, a resposta pressora à ativação do quimiorreflexo. Observamos também que o bloqueio bilateral dos receptores de angiotensina II do RVLM não promoveu qualquer alteração na linha de base da pressão arterial, mostrando que estes receptores provavelmente não são ativados tonicamente em situações fisiológicas normais. Esta diferença de resultados pode estar relacionada ao uso de animais anestesiados ou acordados. Os resultados referentes aos experimentos em animais acordados, nos quais avaliamos a participação

dos receptores de angiotensina II do NTS nas respostas cardiovasculares do quimiorreflexo, nos permitem sugerir que estes receptores neste núcleo não estão relacionados na resposta simpato-excitatória do quimiorreflexo, ainda que os estudos eletrofisiológicos do presente estudo demonstrem a existência de diferentes tipos de neurônios do NTS comissural apresentam os mais diversos padrões de respostas à angiotensina. De fato, como sugerido por Barnes e cols. (2003), a importância e a função fisiológica destes diferentes tipos celulares no NTS, bem como a importância da localização pré- ou pós-sináptica destes receptores para os diferentes reflexos cardiovasculares permanece para ser elucidada.



**IX – BIBLIOGRAFIA**

**Aicher, AS; Saravay, RH, Cravo, S; Jeske, I; Morrison, SF; Reis, DJ ; Milner, TA.**

Monosynaptic projections from the nucleus tractus solitarii to C1 adrenergic neurons in the rostral ventrolateral medulla: Comparison with input from caudal ventrolateral medulla. J. Comp. Neurol.,373: 62-75, 1996.

**Andreatta SH, Averill DB, Santos RA, Ferrario CM.** The ventrolateral medulla. A

new site of action of the renin-angiotensin system. Hypertension. 11(2 Pt 2):I163-6, 1988.

**Barnes KL, DeWeese DM, Andresen MC.** Angiotensin potentiates excitatory sensory

synaptic transmission to medial solitary tract nucleus neurons. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 284(5):R1340-53, 2003.

**Barron KW, Trapani AJ, Gordon FJ, Brody MJ.** Baroreceptor denervation

profoundly enhances cardiovascular responses to central angiotensin II. Am J Physiol. 257(1 Pt 2):H314-23, 1989.

**Benarroch EE, Granata AR, Ruggiero DA, Park DH, Reis DJ.** Neurons of C1 area

mediate cardiovascular responses initiated from ventral medullary surface. Am J Physiol. 250(5 Pt 2):R932-45, 1986.

**Bendle RD, Malpas SC, Head GA.** Role of endogenous angiotensin II on sympathetic

reflexes in conscious rabbits. Am J Physiol. 272(6 Pt 2):R1816-25, 1997.

**Biscoe, TJ ; Dunchen, MR.** Monitoring pO<sub>2</sub> by the carotid chemoreceptor. News in

physiol. Sci., 5:229-233, 1990.

**Biscoe, TJ; Sampson, SR ; Purves, MJ.** Stimulus response curves of single carotid

body chemoreceptor afferent fiber. Nature, 215: 654-655, 1967.

Brain Res. 11;613(2):321-5, 1993.

- Bruner CA, Fink GD.** Neurohumoral contributions to chronic angiotensin-induced hypertension. Am J Physiol. 250(1 Pt 2):H52-61, 1986.
- Buckley, JP; Bickerton, RK; Halliday, RP; Kato, H.** Central effects of peptides on the cardiovascular system. Ann N Y Acad Sci.104:299-311, 1963.
- Bunnemann B, Fuxe K, Ganten D.** The brain-angiotensin system: localization and general significance. J.Cardiovasc. Pharmacol. 19: S51-S62, 1992.
- Callera, JC; Bonagamba, LGH; Nosjean, A; Laguzzi, R; Machado, BH.** Activation of GABA<sub>A</sub> but not GABA<sub>B</sub> receptors in the NTS blocked bradycardia of chemoreflex in awake rats. Am. J. Physiol. 276 (Heart Circ. Physiol.): H1902-10, 1999.
- Callera, JC; Sévoz, C; Laguzzi, R; Machado, BH.** Microinjection of serotonin<sub>3</sub> receptor agonist into the NTS of unanesthetized rats inhibits the bradycardia evoked by activation of the baro- and chemoreflexes.. J. Auton. Nerv. Syst.63: 127-136, 1997.
- Campbell, DJ; Rong, P; Kladis, A; Rees, B; Ganten, D; Skinner, SL.** Angiotensin and bradykinin peptides in the TGR(mRen-2)27 rat. Hypertens, 25: 1014-20, 1995.
- Casto R, Phillips MI.** Cardiovascular actions of microinjections of angiotensin II in the brain stem of rats. Am J Physiol. 246(5 Pt 2):R811-6, 1984.
- Chan RK, Chan YS, Wong TM.** Responses of cardiovascular neurons in the rostral ventrolateral medulla of the normotensive Wistar Kyoto and spontaneously hypertensive rats to iontophoretic application of angiotensin II. Brain Res. 9;556(1):145-50, 1991.

- Chernow B, Alexander HR, Smallridge RC, Thompson WR, Cook D, Beardsley D, Fink MP, Lake CR, Fletcher JR.** Hormonal responses to graded surgical stress. Arch Intern Med. 147(7):1273-8, 1987.
- Ciriello, J ; Calaresu, FR.** Role of paraventricular and supraoptic nuclei in central cardiovascular regulation in the cat. Am. J. Physiol., 239: R 137 - R 142, 1980.
- Ciriello, J; Hochstenbach, SL ; Roder, S.** Central projections of baroreceptor afferent fiber in the rat. In: Nucleus of the Solitary Tract. Edited by Robin A. Barraco, CRC Press, London, 35-50, 1994.
- Dampney RA.** The subretrofacial vasomotor nucleus: anatomical, chemical and pharmacological properties and role in cardiovascular regulation. Prog Neurobiol. 42(2):197-227, 1994.
- Dampney, RAL.** Functional organization of central pathways regulating cardiovascular system. Physiol. Reviews, 74: 323-364, 1994.
- de Paula, PM e Machado, BH.** Changes in regional resistance in response to microinjection of L – Glutamate into different antero-posterior coordinates of the RVLM in awake rats. Autonom. Neurosci: Basic and Clinical. 87: 301-09, 2001.
- Diz DI, Barnes KL, Ferrario CM.** Hypotensive actions of microinjections of angiotensin II into the dorsal motor nucleus of the vagus. Hypertens Suppl. 2(3):S53-6, 1984.
- Dorward PK, Rudd CD.** Influence of brain renin-angiotensin system on renal sympathetic and cardiac baroreflexes in conscious rabbits. Am J Physiol. 260(3 Pt 2):H770-8, 1991.

- Doyle MW, Bailey TW, Jin Y-H, Appleyard SM, Low MJ, Andresen MC.** Strategies for cellular identification in nucleus tractus solitarius slices. *J Neurosci Methods* 37: 37-48, 2004.
- Floras JS, Hassan MO, Jones JV, Osikowska BA, Sever PS, Sleight P.** Consequences of impaired arterial baroreflexes in essential hypertension: effects on pressor responses, plasma noradrenaline and blood pressure variability. *J Hypertens.* 6(7):525-35, 1988.
- Fontes MA, Baltatu O, Caligiorne SM, Campagnole-Santos MJ, Ganten D, Bader M, Santos RA.** Angiotensin peptides acting at rostral ventrolateral medulla contribute to hypertension of TGR(mREN2)27 rats. *Physiol Genomics.* 27;2(3):137-42, 2000.
- Fontes, MAP; Pinge, MGM; Naves, V; Campagnole-Santos, MJ; Lopes, OU; Khosla, MC; Santos, RAS.** Cardiovascular effects produced by microinjection of angiotensins and angiotensin antagonists into the ventrolateral medulla of freely moving rats. *Brain Res.*, 750: 305-10, 1997.
- Fow JE, Averill DB, Barnes KL.** Mechanisms of angiotensin-induced hypotension and bradycardia in the medial solitary tract nucleus. *Am J Physiol.* 267(1 Pt 2):H259-66, 1994.
- Franchini, KG & Krieger, EM.** Cardiovascular responses of conscious rats to carotid body chemoreceptor stimulation by intravenous injection of KCN. *J. Atonom. Nerv. Syst.* 42: 63-70, 1993.
- Fuji, AM; Vanter, SF.** Direct versus indirect pressor and vasoconstrictor actions of angiotensin II in conscious dogs. *Hypertens.*, 7: 253-61, 1985.

- González, C; López-López, RJ; Obeso, A; Pérez-García, MT; Roecher, A.** Cellular mechanisms of oxygen chemoreception in carotid body. Respiration Physiol. 102. 137-147, 1995.
- Gutkind, JS; Kurihara, M; Castren, E; Saavedra, JM.** Increased concentration of angiotensin II binding sites in selected brain areas of spontaneously hypertensive rats. J. Hypertens. 6:79-84, 1988.
- Guyenet, PG ; Koshiya, N.** Respiratory sympathetic integration in the medulla oblongata. In: Central Neural Mechanisms in Cardiovascular Regulation. Edited by Kunos, G and Ciriello, J. Vol. 2. Birkhäuser, Boston, 226-247, 1992.
- Guyenet, PG.** Role of Ventral Medulla Oblongata in Blood Pressure Regulation. In: Central Regulation of Autonomic Functions (Edited. by Loewy, AD and Spyer, KM). Oxford University Press. New York, 1990.
- Haack D, Mohring J.** Vasopressin-mediated blood pressure response to intraventricular injection of angiotensin II in the rat. Pflugers Arch. 22;373(2):167-73, 1978.
- Haibara, AS.** Estudo da neurotransmissão dos quimiorreceptores carotídeos no núcleo do trato solitário de ratos não-anestesiados. TESE (Doutorado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 1996.
- Haibara, AS; Bonagamba, LGH ; Machado, BH.** Simpatoexcitatory neurotransmission of the chemoreflex of awake rats. Am. J. Physiol. 276 (Regul. Integr. Comp. Physiol. 45): R 69 - R 80, 1999.
- Haibara, AS; Colombari, E; Chianca Jr., DA; Bonagamba, LGH ; Machado, BH.** NMDA receptors in NTS are involved in bradycardic but not in pressor response of

chemoreflex. Am. J. Physiol., 269 (Heart and Circulatory Physiology, 38): H 1421 - H 1427, 1995.

**Haibara, AS; Colombari, E; Chianca Jr., DA; Bonagamba, LGH ; Machado, BH.**

NMDA receptors in NTS are involved in bradycardic but not in pressor response of chemoreflex. Am. J. Physiol., 269 (Heart and Circulatory Physiology, 38): H 1421 - H 1427, 1995.

**Head GA, Elghozi JL, Korner PI.** Baroreflex modulation of central angiotensin II pressor responses in conscious rabbits. J Hypertens Suppl. 6(4):S505-7,1988.

**Head GA, Williams NS, Godwin SJ.** Evidence for central rennin Angiotensin system controlling sympathetic tone in the rabbit. Proc. Aust. Physiol. Pharmacol. Soc. 21: 41P, 1990.

**Head GA.** Baroreflexes and cardiovascular regulation in hypertension. J Cardiovasc Pharmacol. 26 Suppl 2:S7-16, 1995.

**Head GA.** Cardiac baroreflexes and hypertension. Clin Exp Pharmacol Physiol. 10:791-802, 1994.

**Head GA.** Role of AT1 receptors in the central control of sympathetic vasomotor function. Clin Exp Pharmacol Physiol Suppl. 3:S93-8, 1996.

**Healy, DP; Retting, R; Nguyen, T; Printz, MP.** Quantitative autoradiography of angiotensin II receptors in the rat solitary-vagal area: Effects of noconcentração ganglionectomy or sinoaortic denervation. Brain Res. 489: 1-12, 1989.

**Hilton, SM.** Hypotalamic regulation of the cardiovascular system. Br. Med. Bull. 22: 243-248, 1966.

- Hirooka Y, Potts PD, Dampney RA.** Role of angiotensin II receptor subtypes in mediating the sympathoexcitatory effects of exogenous and endogenous angiotensin peptides in the rostral ventrolateral medulla of the rabbit. Brain Res. 24;772(1-2):107-14, 1997.
- Horn R, Marty, A.** Muscarinic activation of ionic currents measured by a new whole-cell recording method. J. Gen. Physiol., 92: 145-159, 1988.
- Iriki M, Dorward P, Korner PI.** Baroreflex "resetting" by arterial hypoxia in the renal and cardiac sympathetic nerves of the rabbit. Pflugers Arch. 29;370(1):1-7, 1977.
- Iriki M, Kozawa E.** Renal sympathetic baroreflex during normoxia and during hypoxia in conscious and in anesthetized rabbits. Pflugers Arch. 398(1):23-6, 1983.
- Ito S, Sved AF.** Blockade of angiotensin receptors in rat rostral ventrolateral medulla removes excitatory vasomotor tone. Am J Physiol. 270(6 Pt 2):R1317-23, 1996.
- Ito S, Sved AF.** Pharmacological profile of depressor response elicited by Sarthran in rat ventrolateral medulla. Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol. 279: H2961-H2966, 2000.
- Jin, YH; Bailey, TW; Andresen, MC.** Cranial afferent glutamate heterosynaptically modulates GABA release onto second-order neurons via distinctly segregated metabotropic glutamate receptors. J. Neurophysiol. 24 (42): 9332-9340, 2004.
- Kasparov S, Paton JF.** Differential effects of angiotensin II in the nucleus tractus solitarii of the rat--plausible neuronal mechanism. J Physiol. 521 Pt 1:227-38. Erratum in: J Physiol (Lond) 1999 Dec 15;521 Pt 3:761, 1999.
- Kooner, JS; May, CN; Peart, S; Mathias, CJ.** Separation of peripheral and central cardiovascular actions of angiotensin II. Am. J. Physiol. 273 (Heart Circ. Physiol. 42): H2620-26, 1997.



- Latchford, KJ; Fergusson, AV.** Angiotensina II-induced excitation of paraventricular nucleus magnocellular neurons: a role of glutamate interneurons. Am. J. Physiol. (Reg. Integr. Comp. Physiol.) 286: 894-902, 2004.
- Li YW, Guyenet PG.** Angiotensin II decreases a resting K<sup>+</sup> conductance in rat bulbospinal neurons of the C1 area. Circ Res. 78(2):274-82, 1996.
- Li, DP; Pan, HL.** Angiotensin II attenuates synaptic GABA release and excites paraventricular-rostral ventrolateral medulla output neurons. J. Pharmacol. Exp. Ther. *In press.* 2005.
- Lima, DX; Fontes, MAP; Oliveira, RC; Campagnole-Santos MJ; Khosla, MC; Santos, RAS.** Pressor action of angiotensina I at the ventrolateral medulla: effect of selective angiotensin blockade. Immunopharmacol., 33: 305-7, 1996.
- Liu JL, Murakami H, Sanderford M, Bishop VS, Zucker IH.** ANG II and baroreflex function in rabbits with CHF and lesions of the area postrema. Am J Physiol. 277(1 Pt 2):H342-50, 1999.
- Luitten, PGM; terHorst, CJ ; Steffens, AB.** The course of paraventricular hypothalamic efferents to autonomic structures in medulla and spinal cord. Brain Res., 329: 374-378, 1985.
- Marshall, JM.** Peripheral chemoreceptor and cardiovascular regulation. Physiol. Rev., 74: 543-549, 1994.
- Martin, DS, Haywood, JR.** Sympathetic nervous system activation by glutamate injections into the paraventricular nucleus. Brain Res., 577: 261-267, 1992.

- Martin, DS; Haywood, JR.** Hemodynamic responses to paraventricular nucleus disinhibition with bicuculline in conscious rats. Am. J. Physiol., 265 ( Heart Circ. Physiol.34 ): H 1727 - H 1733, 1993.
- Mayorov DN, Burke SL, Head GA.** Relative importance of rostral ventrolateral medulla in sympathoinhibitory action of rilmenidine in conscious and anesthetized rabbits. J Cardiovasc Pharmacol. 37(3):252-61, 2001.
- Mendelsohn FA, Allen AM, Clevers J, Denton DA, Tarjan E, McKinley MJ.** Localization of angiotensin II receptor binding in rabbit brain by in vitro autoradiography. J Comp Neurol. 270(3):372-84, 1988.
- Mendelsohn FA, Quirion R, Saavedra JM, Aguilera G, Catt KJ.** Autoradiographic localization of angiotensin II receptors in rat brain. Proc Natl Acad Sci U S A. 81(5):1575-9, 1984.
- Michelini LC, Bonagamba, LGH.** Angiotensin II as a modulator of baroreceptor reflex in the brainstem of conscious rats. Hypertens. 15 (suppl 1): I-45 – I-50, 1990.
- Mifflin, SW.** Arterial chemoreceptor input to Nucleus Tractus Solitarius. Am. J. Physiol. 263 ( Regul. Integr. Com. Physiol. 32 ): R 362 - R 375, 1992.
- Moreira, TH; Rodrigues, AL; Beirão, PSL; Santos, RA; Cruz, JS.** Angiotensin II inhibition of Ca<sup>2+</sup> currents in independent of ATR1 angiotensin II receptor activation in adult vagal afferent neurons. Autonom. Neurosci. 117: 79-86, 2005.
- Moroshita, R; Higaki, J; Nakamura, Y; Aoki, M; Yamada, K; Moriguchi, A; Rakugi, H; Tomita, N; Tomita, S; Yu, H; Nakamura, F; Mikami, H; Ogihara, T.** Effects of an antihypertensive drug on brain angiotensin II levels in renal spontaneously hypertensive rats. Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 22: 665-9, 1995.

- Mosqueda-Garcia R, Tseng CJ, Appalsamy M, Robertson D.** Cardiovascular effects of microinjection of angiotensin II in the brainstem of renal hypertensive rats. J Pharmacol Exp Ther. 255(1):374-81, 1990.
- Murase, K; Ryu, PD; Randic, M.** Excitatory and inhibitory amino acids and peptide-induced responses responses in acutely isolated rat spinal dorsal horn neurons. Neurosci. Lett., 103: 56-63, 1989.
- Muratani H, Averill DB, Ferrario CM.** Effect of angiotensin II in ventrolateral medulla of spontaneously hypertensive rats. Am J Physiol. 260(5 Pt 2):R977-84, 1991.
- Olivan, MV; Bonagamba, LGH; Machado, BH.** Involvement of paraventricular nucleus of the hypothalamus in the pressor response to chemoreflex activation of awake rats. Brain Res. 895: 167-172, 2001.
- Oz, M; Renaud, LP.** Angiotensin AT1-receptors depolarize neonatal spinal motoneurons and other ventral horn neurons via two distinct conductances. J. Neurophysiol., 88: 2857-2863, 2002.
- Pan, SJ; Zhu, M; Raizada, MK; Sumners, C; Gelband, CH.** Angiotensin II-mediated inhibition of neuronal delayed rectifier K<sup>+</sup> current: Role of protein kinase C- $\alpha$ . Am. J. Cell. Physiol. 281: C17-C23, 2001.
- Paton JF, Kasparov S.** Sensory channel specific modulation in the nucleus of the solitary tract. J Auton Nerv Syst. 80(3):117-29, 2000.
- Paton, JFR e Kasparov, S.** Differential effects of angiotensin II on cardiorespiratory reflexes mediated by nucleus tractus solitarii – a microinjection study in the rat. J. Physiol. 521.1: 213-25, 1999.

- Phillips, MI.** Functions of angiotensin in the central nervous system. Annu. Rev. Physiol. 49: 413-435, 1987.
- Phillips, MI; Mann, JFE; Hideyuki, H; Hoffman, WE; Dietz, R; Schelling, P; Ganten, D.** Lowering of Hypertension by central saralasin in the absence of plasma renin. Nature, 270: 445-7, 1977.
- Phillips, MI; Summers, C.** Angiotensin II in central nervous system physiol. Reg. Pept. 78: 1-11, 1998.
- Pimentel, FF; Bonagamba, LGH; Machado, BH.** Pressor response to chemoreflex activation before and after microinjection of glycine into the NTS of awake rats. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.; 284 (4):R1000-9. 2003.
- Potts PD, Allen AM, Horiuchi J, Dampney RA.** Does angiotensin II have a significant tonic action on cardiovascular neurons in the rostral and caudal VLM? Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 279(4):R1392-402, 2000.
- Rettig R, Healy DP, Printz MP.** Cardiovascular effects of microinjections of angiotensin II into the nucleus tractus solitarii. Brain Res. 364(2):233-40, 1986.
- Rocha I, Bras-Rosario L, Amparo-Brarros M, Silva-Carvalho L.** Antgiotensin AT<sub>1</sub> receptor antagonist losartan and the defence reaction in the anaesthetised rat. Exp. Physiol. 88(3): 309-314, 2003.
- Ross, CA; Ruggiero, DA; Park, DH; Joh, TH; Sved AF; Fernandez-Pardal, J; Saavedra, JM; Reis, DJ.** Tonic vasomotor control by the rostroventrolateral medulla: Effects of electrical or chemical stimulation of the area containing adrenaline neurons on arterial pressure, heart rate, and plasma catecholamine and vasopressin. J. Neurosci., 4(2): 474 – 494, 1984.

- Saigusa T, Head GA.** Renal sympathetic baroreflex effects of angiotensin II infusions into rostral ventrolateral medulla of the rabbit. Clin Exp Pharmacol Physiol. 20(5):351-4, 1993.
- Sangaletti CT, Crescenzi A, Michelini LC.** Endogenous angiotensin and pressure modulate brain angiotensinogen and AT<sub>1A</sub> mRNA expression. Hypertens. 43: 317-323, 2004.
- Sasaki S, Dampney RA.** Tonic cardiovascular effects of angiotensin II in the ventrolateral medulla. Hypertension. 15(3):274-83, 1990.
- Sasaki S, Li YW, Dampney RA.** Comparison of the pressor effects of angiotensin II and III in the rostral ventrolateral medulla. Brain Res. 15;600(2):335-8, 1993.
- Shafton, D; Ryan, A; Badoer, E.** Neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus send collaterals to the spinal cord and to the rostral ventrolateral medulla in the rat. Brain Res.,801: 239-243, 1998.
- Silva LC, Fontes MA, Campagnole-Santos MJ, Khosla MC, Campos RR Jr, Guertzenstein PG, Santos RA.** Cardiovascular effects produced by micro-injection of angiotensin-(1-7) on vasopressor and vasodepressor sites of the ventrolateral medulla. Brain Res. 613 (2): 321-325, 1993.
- Silva-Carvalho L, Dawid-Milner MS, Goldsmith GE, Spyer KM.** Hypothalamic-evoked effects in cat nucleus tractus solitarius facilitating chemoreceptor reflexes. Exp. Physiol. 78 (3): 425-428, 1993.
- Silva-Carvalho L, Dawid-Milner MS, Goldsmith GE, Spyer KM.** Hypothalamic modulation of the arterial chemoreceptor reflex in the anaesthetized cat: role of the nucleus of tractus solitarius. J. Physiol. 487 (3): 751-760, 1995.

- Song, K; Zhuo, J; Maendelsohn, FAO.** Access of peripherally administered DuP 753 to rat brain angiotensin receptors. Br. J. Pharmacol. 104: 771-2, 1991.
- Swanson, LW ; Sawchenko, PE.** Hypotalamic integration: organization of paraventricular and supraoptic nuclei. Annu. Review Neurosc., 6: 269-324, 1983.
- Tagawa T, Fontes MA, Potts PD, Allen AM, Dampney RA.** The physiological role of AT1 receptors in the ventrolateral medulla. Braz J Med Biol Res. 33(6):643-52, 2000.
- Tagawa, T; Dampney, RAL.** AT1 receptors mediate excitatory inputs to rostral ventrolateral medulla pressor neurons from hypothalamus. Hypertens., 34: 1301-07, 1999.
- Tagawa, T; Horiuchi, J; Potts, PD; Dampney, RAL.** Sympathoinhibition after receptor blockade in the rostral ventrolateral medulla is independent of glutamate and  $\gamma$  - aminobutyric acid receptors. J. Autonom. Nerv. Syst., 77: 21-30, 1999.
- Teruya, H; Muratani, H; Takishita, S; Sesoko, S; Matayoshi, R; Fukiyama, K.** Brain angiotensin II contributes to development of hypertension in Dahl-Iwai salt-sensitive rats. J. Hypertens., 13: 883-90, 1995.
- Unger T, Badoer E, Ganten D, Lang RE, Rettig R.** Brain angiotensin: pathways and pharmacology. Circulation. 77(6 Pt 2):I40-54, 1988.
- Urbanski, RW; Sapru, HN.** Evidence for a sympathoexcitatory pathway from the nucleus tractus solitarii to the ventrolateral medullary pressor area. J. Autonom. Nerv. Syst., 72: 161-174, 1988.
- Weiss, PGS; Wiene, JW; Rascher, JSW; Culman, J; Unger, T.** AT1 receptor antagonist Telmisartan administered peripherally inhibits central responses to angiotensin II in conscious rats. J. Pharmacol. Exp. Ther., 298 (1): 62-70, 2001.

- Wright JW, Sullivan MJ, Petersen EP, Harding JW.** Brain angiotensin II and III binding and dipsogenicity in the rabbit. Brain Res. 358(1-2):376-9, 1985.
- Yang, Z; Coote, JH.** Influence of the hypothalamic paraventricular nucleus on cardiovascular neurones in the rostral ventrolateral medulla of the rat. J. Physiol., 513.2: 521-530, 1998.
- Zhang, CH; Bonagamba, LGH; Machado, BH.** Blockade of NK-1 receptors in the nucleus tractus solitarii of awake rats produced no effect on the cardiovascular response to chemoreflex activation. Braz. J. Med Biol. Res., 33: 1379-85, 2000.
- Zhuo, JZ; Song, K; Abdelrahman, A; Mendelsohn, FAO.** Blockade of intravenous Losartan of AT1 angiotensin II receptors in the rat brain, kidney and adrenals demonstrated by in vitro autoradiography. Clin. Exp. Pharmacol. Physiol., 21: 557-67, 1994.

**X - APÊNDICE**

















































**XI – PUBLICAÇÃO**

# 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](#)