



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**MODULAÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL E FREQUÊNCIA CARDÍACA
PELA VIA ÓXIDO NÍTRICO/GUANOSINA MONOFOSFATO CÍCLICO
DA MEDULA ESPINHAL**

JOÃO PAULO JACOB SABINO

**Ribeirão Preto
2009**

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

JOÃO PAULO JACOB SABINO

**MODULAÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL E FREQUÊNCIA CARDÍACA
PELA VIA ÓXIDO NÍTRICO/GUANOSINA MONOFOSFATO CÍCLICO
DA MEDULA ESPINHAL**

Dissertação apresentada ao Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP, como parte das exigências para obtenção do grau de Mestre em Ciências – área de concentração em Fisiologia.

Orientador: Prof. Dr. Helio C. Salgado

Ribeirão Preto

2009

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Sabino, João Paulo Jacob

MODULAÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL E FREQUÊNCIA CARDÍACA PELA VIA ÓXIDO NÍTRICO/GUANOSINA MONOFOSFATO CÍCLICO DA MEDULA ESPINHAL. Ribeirão Preto, 2009.

110 p.; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Fisiologia.

Orientador: Prof. Dr. Helio Cesar Salgado.

1. Eferênica Simpática. 2. Neurônios Pré-Ganglionares Simpáticos. 3. Óxido Nítrico. 4. GMPc 5. Guanilato ciclase solúvel.

FOLHA DE APROVAÇÃO

João Paulo Jacob Sabino

MODULAÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL E FREQUÊNCIA CARDÍACA PELA VIA ÓXIDO NÍTRICO/GUANOSINA MONOFOSFATO CÍCLICO DA MEDULA ESPINHAL

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP, como parte das exigências para obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas – área de concentração em Fisiologia.

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Lista de abreviaturas

Ach	-	Acetilcolina
aCSF	-	Fluido cerebrospinal artificial
AP5	-	Ácido amino-fosfono-pentanóico (Antagonista dos receptores NMDA)
BK	-	Canais para potássio sensíveis a cálcio
bpm	-	Batimentos por minuto
Calmod	-	Calmodulina
CETEA	-	Comissão de ética em experimentação animal
CNGC	-	Canais iônicos ativados por nucleotídeos cíclicos
COBEA	-	Colégio brasileiro de experimentação animal
CVLM	-	Região caudal ventrolateral do bulbo
D-arginina	-	<i>(R)-2-Amino-5-guanidinopentanoic acid</i> (Isômero inativo da l-arginina)
DMSO	-	Dimetilsulfóxido
D-NAME	-	<i>Nω-Nitro-D-arginine methyl ester hydrochloride</i> (Isômero inativo do l-name)
eNOS	-	Óxido nítrico sintase endotelial
EPM	-	Erro padrão da média
FC	-	Frequência cardíaca
GABA	-	Ácido gama-amino-butírico
GCm	-	Guanilato ciclase de membrana
GCs	-	Guanilato ciclase solúvel
Glu	-	Glutamato
GMPc	-	Guanosina monofosfato cíclico

GTP	-	Guanosina trifosfato
i.m.	-	Intramuscular
i.p.	-	Intraperitoneal
IML	-	Coluna intermediolateral da medula espinhal
iNOS	-	Óxido nítrico sintase induzida
IVLM	-	Região intermediária ventrolateral do bulbo
IX	-	Nervo glossofaríngeo
L-ARG	-	L-arginina ((S)-2-Amino-5-guanidinopentanoic acid; S(+)-2-Amino-5-[(aminoiminomethyl) amino]pentanoic acid; Precursor da síntese de NO)
L-NAME	-	<i>Nω-Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride</i> (Inibidor não seletivo da óxido nítrico sintase)
L-NMMA	-	<i>N^G-Methyl-L-arginine acetate salt</i> (Inibidor não seletivo da óxido nítrico sintase)
mmHg	-	Milímetro de mercúrio
NA	-	Núcleo ambíguo
NADPH	-	Fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo
NE	-	Noradrenalina
NMDA	-	Receptor N-metil-D-aspartato
nNOS	-	Óxido nítrico sintase neuronal
NO	-	Óxido nítrico
NOS	-	Óxido nítrico sintase
NPGS	-	Neurônios pré-ganglionares simpáticos
NTS	-	Núcleo do trato solitário

ODQ	-	<i>1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one</i>	(Inibidor da guanilato ciclase solúvel)
PA	-	Pressão arterial	
PAM	-	Pressão arterial média	
PAP	-	Pressão arterial pulsátil	
PDE	-	Fosfodiesterase	
PE	-	Polietileno	
PKG	-	Proteína kinase G	
PVN	-	Núcleo paraventricular do hipotálamo	
RVLM	-	Região rostral ventrolateral do bulbo	
RVMM	-	Região rostral ventromedial do bulbo	
SHR	-	Ratos espontaneamente hipertensos	
SNP	-	Sistema nervoso parassimpático	
X	-	Nervo vago	

Lista de ilustrações

Figura 1 – Principais vias do arco barorreflexo no controle da atividade simpática.

Figura 2 – Metabolismo do NO e GMPc

Figura 3 – Cirurgia de cateterização lombar do espaço subaracnóide da medula espinhal

Figura 4 – Confirmação da administração intratecal de diferentes compostos

Figura 5 – Protocolo Experimental 1

Figura 6 – Protocolo Experimental 2

Figura 7 – Evolução (minutos) das respostas da pressão arterial média (Δ PAM) e da frequência cardíaca (Δ FC) à administração intratecal de L-NAME ou D-NAME.

Figura 8 –Evolução (minutos) das respostas da pressão arterial média (Δ PAM) e da frequência cardíaca (Δ FC) à administração intratecal de ODQ ou DMSO.

Figura 9 – Evolução (minutos) das respostas da pressão arterial média (Δ PAM) e da frequência cardíaca (Δ FC) à administração intratecal de AP5 ou aCSF.

Figura 10 – Evolução (minutos) das respostas da pressão arterial média (Δ PAM) e da frequência cardíaca (Δ FC) à administração intratecal de L-NAME seguida de AP5.

Figura 11 – Evolução (minutos) das respostas da pressão arterial média (Δ PAM) e da frequência cardíaca (Δ FC) à administração intratecal de L-ARG ou D-ARG.

Figura 12 – Evolução (minutos) das respostas da pressão arterial média (Δ PAM) e da frequência cardíaca (Δ FC) à administração intratecal de ODQ seguida de L-ARG ou administração de apenas L-ARG.

Lista de tabelas

Tabela 1 – Evolução (minutos) das respostas da pressão arterial média (Δ PAM) e da frequência cardíaca (Δ FC) à administração intratecal de L-NAME ou D-NAME.

Tabela 2 – Evolução (minutos) das respostas da pressão arterial média (Δ PAM) e da frequência cardíaca (Δ FC) à administração intratecal de ODQ ou DMSO.

Tabela 3 – Evolução (minutos) das respostas da pressão arterial média (Δ PAM) e da frequência cardíaca (Δ FC) à administração intratecal de AP5 ou veículo (aCSF).

Tabela 4 – Evolução (minutos) das respostas da pressão arterial média (Δ PAM) e da frequência cardíaca (Δ FC) à administração intratecal de L-NAME seguida de AP5.

Tabela 5 – Evolução (minutos) das respostas da pressão arterial média (Δ PAM) à administração intratecal de L-ARG ou D-ARG.

Tabela 6 – Evolução (minutos) das respostas da pressão arterial média (Δ PAM) e da frequência cardíaca (Δ FC) à administração intratecal de ODQ seguida de L-ARG ou administração de apenas L-ARG.

Dedicatória

Dedico este trabalho a minha mãe (Graça Rosa Jacob) e meu irmão (Fábio Sabino), pelo exemplo de dedicação, amor e pelo apoio nos momentos mais difíceis da minha vida

Agradecimientos

-
- A Deus por permitir a realização de mais um sonho.
 - A minha mãe, Graça Rosa Jacob, meu pai Antonio Alauri Sabino, meus irmãos, Maria Estela, Fábio, Carla e Ana Paula, pelo apoio para realização de meus sonhos.
 - Aos amigos do Prata, Acácio Neto, Bruno Gois, Bruno Henrique, Halp, Lielson, Valter Douglas e Wiasser.
 - Aos amigos de República e vizinhos, Ciro, Claiton, Danilo, Fabrício, Gilberto, Jhimmy e João Henrique Blanco.
 - Ao prof. Dr. Helio C. Salgado pela acolhida em seu laboratório e pela orientação nesta dissertação.
 - A prof. Dra. Maria Cristina de Oliveira Salgado pela ajuda em todas as partes deste trabalho.
 - Ao técnico, Carlos Alberto Aguiar, pela amizade e pela grande colaboração na parte experimental deste trabalho.
 - Aos técnicos de laboratório de Fisiologia Cardiovascular, Jaci Airton Castania, Leni Bonagamba e Mauro de Oliveira, pela amizade e grande ajuda nas minhas dúvidas.
 - Ao Prof. Dr. William A. Prado, aos técnicos Marcos e Paulo, os quais ensinaram a técnica de canulação intratecal.
-

-
- A turma do Cursão, Carlos Eduardo, Dawit, Eduardo Lira, Fernanda Machado, Marcelo Kwiatkoski, Marina Durand, Rafael, Ricardo Pereira, Tatiane, pela amizade e carinho.
 - Aos amigos de Laboratório, Daniel Penteado, Domitila, Fernanda Machado, Fernanda, Gabriela Bombarda, Giuliana, Marina Durand, Renata Lataro, Ricardo Pereira e Valter.
 - Aos amigos de departamento, André, Andréia, Bruno, Daniel Zoccal, Ernane, Érica, Fabiana Lucio, Glauber, Guilherme, Humberto, João Henrique, Josiane, Lígia, Lilian, Lys, Marcio, Maria Ida, Mirian, Olagide, Roberta Kwiatkoski, Vagner e aos demais alunos da pós-graduação.
 - Aos funcionários do biotério da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Leonardo e Eduardo, pelo cuidado com os animais durante toda a evolução experimental.
 - Aos funcionários da secretaria da Fisiologia, Carlos, Cláudia, Elisa e Fernando, pela competência e prontidão para ajudar.
 - Aos docentes do curso de pós-graduação da Fisiologia pelo excelente convívio e aprendizagem, pelo carinho e dedicação.
 - A todos que contribuíram direta ou indiretamente para realização deste trabalho.
-

Sumário

SUMÁRIO	4
1. INTRODUÇÃO	12
2. OBJETIVOS	25
3. MATERIAL E MÉTODOS	27
4. RESULTADOS	37
5. DISCUSSÃO	53
6. CONCLUSÕES	67
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69
9. APÊNDICE	78

Resumo

SABINO, JPJ; SALGADO, HC. MODULAÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL E FREQUÊNCIA CARDÍACA PELA VIA ÓXIDO NÍTRICO/GUANOSINA MONOFOSFATO CÍCLICO DA MEDULA ESPINHAL

A ativação da via óxido nítrico/guanosina monofosfato cíclico (NO/GMPc) em neurônios pré-ganglionares simpáticos (NPGS) ainda não está bem caracterizada. Assim, o objetivo deste estudo foi examinar os efeitos das alterações da via NO/GMPc na medula espinhal sobre as respostas de pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC). MÉTODOS: Foram utilizados ratos (n=6-7) submetidos à canulação intratecal e da artéria femoral. Foram registradas a PAM (mmHg) e FC (bpm) basais durante 25 min, e durante 10 ou 30 min após a administração das drogas. As drogas foram administradas intratecalmente. RESULTADOS: O bloqueio da NO sintase com N ω -Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride (L-NAME) aumentou a PAM (10 \pm 1 mmHg) e não alterou a FC (7 \pm 12 bpm), enquanto que o isômero inativo N ω -Nitro-D-arginine methyl ester hydrochloride (D-NAME) não alterou a PAM (0 \pm 1 mmHg) e nem a FC (5 \pm 5 bpm). O inibidor da guanilato ciclase solúvel 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one (ODQ) não alterou a PAM (0 \pm 2 mmHg) e nem a FC (0 \pm 6 bpm). O veículo dimetilsulfóxido (DMSO) não alterou a PAM (-3 \pm 4 mmHg) e nem a FC (-1 \pm 6 bpm). O antagonista do receptor N-Metil-D-Aspartato (NMDA), ácido aminofosfonopentanoico (AP5), não alterou a PAM (0 \pm 2 mmHg), mas reduziu a FC (-17 \pm 7 bpm). A administração intratecal do fluido cerebrospinal artificial (veículo) não alterou a PAM (2 \pm 1 mmHg) e nem a FC (4 \pm 4 bpm). A administração de L-NAME+AP5 não afetou o aumento da PAM (8 \pm 1 mmHg) promovido pelo L-NAME. O precursor da síntese de NO, (S)-2-Amino-5-guanidinopentanoic acid; S(+)-2-Amino-5-[(aminoiminomethyl) amino]pentanoic acid (L-arginina), promoveu

redução da PAM (-5 ± 2 mmHg) e FC (-29 ± 9 bpm), e seu isômero inativo, (R)-2-Amino-5-guanidinopentanoic acid (D-arginina), não alterou a PAM (1 ± 1 mmHg) e FC (3 ± 8 bpm). A administração de ODQ+L-arginina aboliu a queda na PAM (3 ± 2 mmHg) promovida pela L-arginina, enquanto que sobre a FC houve uma redução parcial da bradicardia promovida pela L-ARGININA (-14 ± 4 bpm). CONCLUSÃO: Os resultados obtidos em ratos acordados indicam que o NO atua como neuromodulador inibitório tônico sobre os NPGS, cuja ação parece não envolver receptores NMDA e nem depender do GMPc. Todavia, a resposta à injeção de L-arginina foi dependente de GMPc.

Abstract

SABINO, JPS; SALGADO, HC. ARTERIAL PRESSURE AND HEART RATE MODULATION BY NITRIC OXIDE/CYCLIC GUANOSINE MONOPHOSPHATE SPINAL CORD PATHWAYS

The role played by the nitric oxide/cyclic guanosine monophosphate pathway (NO/cGMP) on Sympathetic Preganglionic Neurons (SPN) is not well understood. The purpose of the present study was to examine the effects of changes in NO/cGMP pathway in the spinal cord on the hemodynamic responses of mean arterial blood pressure (MAP) and heart rate (HR). METHODS: The rats (n= 6-7) were subjected to intrathecal and femoral artery cannulation. MAP (mmHg) and HR (bpm) were recorded for 25 min and for 10 or 30 min after administration of intrathecal injections of drugs. RESULTS: Blockade of NO synthase with N ω -Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride (L-NAME) increased MAP (10 ± 1 mmHg) and did not affect HR (7 ± 12 bpm), while the inactive isomer D-arginine methyl ester hydrochloride (D-NAME) did not change either MAP (0 ± 1 mmHg) or HR (5 ± 5 bpm). The soluble guanylate cyclase inhibitor 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one (ODQ) did not change MAP (0 ± 2 mmHg) and HR (0 ± 6 bpm). The vehicle dimethyl sulfoxide (DMSO) did not change MAP (-3 ± 4 mmHg) and HR (-1 ± 6 bpm). The antagonist of N-methyl-D-aspartic acid receptors (NMDA), D,L-2-amino-5-phosphonopentanoic acid (AP5) did not change the MAP (0 ± 2 mmHg), but reduced the HR (-17 ± 7 bpm). Intrathecal administration of artificial cerebrospinal fluid (vehicle) did not change the MAP (2 ± 1 mmHg) and HR (4 ± 4 bpm). Administration of L-NAME + AP5 did not affect the increase in MAP (8 ± 1 mmHg) promoted by L-NAME. The precursor of the synthesis of NO, (S)-2-Amino-5-guanidinopentanoic acid; S(+)-2-Amino-5-[(aminoiminomethyl) amino]pentanoic acid (L-arginine), reduced both MAP (-5 ± 2

mmHg) and HR (-29 ± 9 bpm), while its inactive isomer, (R)-2-Amino-5-guanidinopentanoic acid (D-arginine), did not change MAP (1 ± 1 mmHg) and HR (3 ± 8 bpm). Administration of ODQ + L-arginine prevented the decrease in MAP (3 ± 2 mmHg) promoted by L-arginine, while the L-arginine-induced bradycardia was partially reduced (-14 ± 4 bpm). CONCLUSION: The results indicate that NO acts as a tonic inhibitory neuromodulator on SPN, whose action does not involve NMDA receptors and does not depend on cGMP. Nevertheless, the hemodynamic response to intrathecal L-arginine (MAP and HR) depended on cGMP.

1.Introdução

BARORREFLEXO

O organismo utiliza mecanismos reflexos para manter a pressão arterial dentro de limites estáveis e para assegurar a perfusão dos tecidos em situações fisiológicas. Existem três mecanismos reflexos importantes envolvidos na modulação cardiocirculatória: barorreceptores arteriais (alta pressão), os receptores cardiopulmonares (baixa pressão) e os quimiorreceptores arteriais (Sheperd, 1980; Persson, 1996).

O reflexo mediado pelos barorreceptores arteriais, os quais estão localizados no arco aórtico e no seio carotídeo, é o mais importante mecanismo de controle reflexo da pressão arterial, momento a momento (Krieger e cols. 1982; Kirchheim, 1976) [Figura 1]. A Figura 1 destaca os principais elementos aferentes, centrais e eferentes do controle autonômico simpático do reflexo barorreceptor. As vias eferentes vagais que atuam sobre a frequência cardíaca não estão representadas.

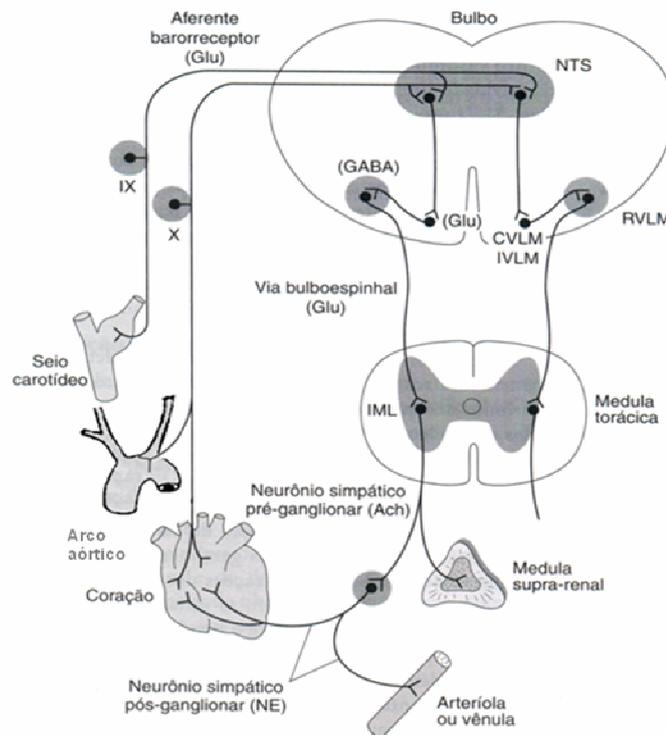


Figura 1. Principais vias do arco barorreceptor no controle da atividade simpática. Os neurotransmissores do arco reflexo estão indicados entre parênteses. Glu, glutamato; GABA, ácido gamaaminobutírico; Ach, acetilcolina; NE, noradrenalina; IML, coluna intermediolateral; NTS, núcleo do trato solitário; CVLM, IVLM e RVLM: regiões caudal, intermediária e rostral do bulbo ventrolateral; IX e X, nervos glossofaríngeo e vago (modificado de Ganong, 2006).

A elevação da pressão arterial (PA) provoca aumentos na frequência de descarga dos barorreceptores. Estas informações são conduzidas ao núcleo do trato solitário (NTS) por neurônios cujos corpos celulares estão localizados no gânglio nodoso (barorreceptores aórticos) ou no gânglio petroso (barorreceptores carotídeos), que se juntam aos nervos vago e glossofaríngeo, respectivamente (Krieger, 1970; Krieger e cols. 1982; Koike e cols. 2006). A partir do NTS, neurônios de segunda ou terceira ordem se projetam para dois grupamentos de neurônios no bulbo ventrolateral: 1) Neurônios inibitórios na área caudal ventrolateral do bulbo (CVLM), que por sua vez se projetam para a área rostral ventrolateral do bulbo (RVLM), a qual estimula os neurônios pré-ganglionares simpáticos (NPGS); 2) Neurônios localizados no núcleo ambíguo (NA) e/ou núcleo dorsal motor do nervo vago que contêm os corpos celulares dos neurônios pré-ganglionares do sistema nervoso parassimpático (SNP). Portanto, o reflexo barorreceptor controla o tônus simpático para o coração e vasos e o parassimpático para o coração. Dessa forma, a estimulação dos barorreceptores arteriais produz uma redução reflexa da atividade simpática e um aumento da atividade vagal, resultando em dilatação arteriolar, venodilatação, bradicardia e redução da contratilidade miocárdica (Krieger e cols. 1982; Chapleau e cols. 1988).

A eferência simpática cardiovascular pode ser classificada em três grupos de acordo com sua característica dominante: termosensitiva; glicosensitiva ou barosensitiva (Janig & Habler, 2003). O grupo de eferentes cardiovasculares termosensitivos consiste de vasoconstritores cutâneos, os quais são ativados por hipotermia, estímulo emocional e hiperventilação (Janig & Habler, 2003). O grupo glicosensitivo controla a liberação de adrenalina, a qual é ativada pela

hipoglicemia e exercício físico (Cao & Morrison, 2001; Guyenet, 2006). Entretanto, esses dois grupos têm papel secundário na regulação da PA a curto e a longo prazo (Guyenet, 2006). A eferência simpática barosensitiva regula a atividade autonômica para coração, rins, liberação de noradrenalina das adrenais e constrição arteriolar (Janig & Habler, 2003). Os órgãos e tecidos que os neurônios barosensitivos inervam apresentam atividade basal (tônus simpático). Além disso, a frequência de despolarização do nervo simpático é altamente sincronizada com o pulso arterial e a respiração (Janig & Habler, 2003). Os eferentes barosensitivos são responsáveis pelas flutuações da PA a curto prazo (Janig & Habler, 2003), e, provavelmente, também possuem papel determinante no controle neural da PA a longo prazo. Em parte devido à eferência simpática controlar a secreção de renina, reabsorção renal de sódio e o fluxo sanguíneo renal (DiBona & Kopp, 1997). Além disso, a atividade simpática parece estar elevada na hipertensão (Goldstein, 1983). Portanto, considerando o papel modulatório da eferência simpática barosensitiva sobre o sistema cardiocirculatório tornam-se relevantes estudos que têm como objetivo entender os mecanismos pelos quais as regiões envolvidas na geração do tônus simpático podem ser excitadas ou inibidas.

Como relatado anteriormente, os NPGS estão situados no arco barorreflexo, fazendo parte da eferência simpática barosensitiva, e estão localizados no funículo lateral, núcleo intercalado, núcleo autonômico central e, principalmente, na coluna intermédio-lateral (IML) (Petras & Cummings, 1972), entre os segmentos C₈ e L₃ da medula espinhal (Strack e cols. 1988). A frequência de despolarização dos NPGS determina o tônus simpático para os vasos sanguíneos e coração, e resulta da integração de estímulos neuronais supra-espinhais

(Guyenet & Stornetta, 2004). As regiões supra-espinhais que enviam projeções aos NPGS são: região rostral ventromedial do Bulbo (RVMM), núcleo caudal da rafe, células do grupo A5 localizados na ponte, núcleo paraventricular (PVN) do hipotálamo e, principalmente, o RVLM (Strack e cols. 1989, Strack & Loewy, 1990). Além dos estímulos supra-espinhais existem evidências indicando que os NPGS são, também, modulados por via intra-espinhais, ou seja, por interneurônios inibitórios e excitatórios (Dun & Mo, 1989).

Além de estudos neuroanatômicos (Jansen e cols. 1992), mostrando que as regiões supra-espinhais envolvidas no barorreflexo enviam projeções, diretamente, aos NPGS, modulando, conseqüentemente, o tônus simpático para o coração e vasos sanguíneos, existem estudos neurofisiológicos, nos quais observou-se, também, que regiões supra-espinhais enviam estímulos aos NPGS da medula espinhal (Bazil & Gordon 1991,1993). A região do RVLM é a principal região supra-espinhal que estimula os NPGS. Portanto, o RVLM parece ser o principal mediador da regulação do tônus simpático (Calaresu & Yardley 1988). Além disso, a excitação dos NPGS pelo RVLM ocorre por meio da ativação de receptores glutamatérgicos ionotrópicos N-Metil-D-Aspartato, NMDA, (Bazil & Gordon 1991,1993). Entretanto, existem evidências em NPGS, *in vitro*, que sugerem que as correntes pós-sinápticas excitatórias dos NPGS são mediadas, também, por receptores AMPA/KAINATO (Wu e cols. 1997). Além disso, existem estudos sugerindo a participação dos receptores metabotrópicos glutamatérgicos na modulação dos NPGS (Li e cols. 1999; Celuch & García 2002).

Portanto, existe na literatura uma preocupação constante em se entender quais neurotransmissores estão envolvidos na manutenção da atividade dos NPGS. Assim, após ter sido demonstrado que 70% dos NPGS de ratos *Sprague-*

Dawley possuíam a enzima óxido nítrico sintase neuronal, nNOS (Anderson, 1992), a qual sintetiza o óxido nítrico, (NO) a partir da L-arginina (Garthwaite e cols. 1988), estudos vêm sendo realizados, ainda, com o intuito de melhor caracterizar se a ação do NO sobre os NPGS é excitatória ou inibitória.

CATETERIZAÇÃO ESPINHAL DO ESPAÇO SUBARACNÓIDE

Os estudos realizados até o momento, nos quais tinham como objetivo avaliar as respostas hemodinâmicas, após a administração intratecal de diferentes substâncias, utilizaram o método de cateterização do espaço subaracnóide, chamado Atlanto-Occipital (Yaksh & Rudy, 1976). Neste método o cateter é implantado no espaço subaracnóide através da membrana atlanto-occipital, o qual é introduzido no sentido caudal até atingir o nível da vértebra T12. Entretanto, existem evidências na literatura (Storkson e cols. 1996; Prado, 2003), que mostraram que o método atlanto-occipital provoca alguns efeitos colaterais, tais como: alterações neurológicas (paralisia de um ou mais membros); redução da massa corporal do animal após a cirurgia; (Storkson e cols. 1996); geração de processos inflamatórios, os quais aumentam a sensibilidade à dor (Prado, 2003). Contudo, existe o método de cateterização lombar do espaço subaracnóide, no qual o animal após a cirurgia, não apresentou redução da massa corporal, não houve alterações neurológicas (Storkson e cols. 1996) e nem a geração de processos inflamatórios (Prado, 2003). Desta forma, não foi encontrado na literatura estudo anterior que tenha utilizado o método de cateterização lombar da medula espinhal, com objetivo de avaliar respostas hemodinâmicas de PA e FC, após a administração de diferentes compostos.

PAPEL DO ÓXIDO NÍTRICO (NO) SOBRE NPGS

Como mencionado anteriormente, a NOS é responsável pela síntese de NO a partir da L-arginina (Palmer e cols. 1987; Garthwaite e cols. 1988) e possui três isoformas, duas das quais são constitutivas e são encontradas, normalmente, na célula (Marletta, 1994). A enzima NOS que foi inicialmente descrita no endotélio vascular é conhecida como NOS endotelial (eNOS), ao passo que aquela encontrada no cérebro e no sistema nervoso periférico é chamada de NOS neuronal (nNOS). A terceira enzima é a NOS induzida (iNOS), a qual é ativada por um estímulo imunológico ou inflamatório (Förstermann & Kleinert 1995; Vincent, 1994).

Como relatado anteriormente os NPGS possuem a nNOS (Anderson, 1992), a qual catalisa a síntese de NO a partir da L-arginina (Garthwaite e cols. 1988); esta enzima é ativada pela ligação do neurotransmissor glutamatérgico (liberado pelo neurônio pré-sináptico) ao receptor pós-sináptico glutamatérgico ionotrópico N-Metil-D-Aspartato, NMDA, (Garthwaite e cols 1988). Segundo Garthwaite e cols. (1988), o receptor NMDA faz parte do mecanismo envolvido na geração de NO por meio da nNOS. Após a ligação do glutamato ao receptor NMDA ocorre à abertura de canais para cálcio, com isso, aumenta a permeabilidade a este íon, aumentando a concentração deste íon no meio intracelular. Em seguida, o cálcio se liga à calmodulina formando o complexo cálcio/calmodulina. O cálcio que se liga à calmodulina pode ser proveniente, também, de fontes intracelulares ou de canais para cálcio. O complexo cálcio/calmodulina, por sua vez, ativa a nNOS, a qual converte L-arginina+O₂ em citrulina e NO (Palmer e cols. 1987; Garthwaite, 1988), com a participação da forma reduzida do fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídio (NADPH) como doador de elétron (Figura 2). O NO ativa a guanilato

ciclase solúvel (GCs) a qual catalisa a conversão de guanosina trifosfato (GTP) em guanosina monofosfato cíclico (GMPc). Após a síntese do NO, o mesmo pode ativar a GCs de sua própria célula, de células adjacentes, ou da célula de onde foi liberado o neurotransmissor glutamatérgico (Garthwaite, 1991). O GMPc, molécula efetora da via NO/GMPc atua modulando a proteína Kinase G (PKG), canais iônicos ativados por nucleotídeos cíclicos (CNGC), e fosfodiesterases (PDE) (Ahern e cols. 2002) [Figura 2]. O GMPc é, também, formado pela guanilato ciclase acoplada à membrana (GCm), a qual é ativada por peptídeos natriuréticos (Krumenacker e cols. 2004).

Anteriormente acreditava-se que NO modulava a atividade neuronal, apenas, pela via NO/GMPc (Ahern e cols. 2002). Entretanto, é crescente o número de evidências sugerindo uma via pela qual o NO modula, diretamente, a atividade neuronal sem ativar a GCs, ou seja, independentemente da conversão de GTP a GMPc (Lei e cols. 1992; Davis e cols. 2001; Ahern e cols. 2002). Este complexo mecanismo químico, o qual independe de ação enzimática, recebe o nome de S-nitrosilação (Lei e cols. 1992; Davis e cols. 2001). Portanto, necessita-se de uma maior concentração de NO, comparada à usual, para ativar a GCs (Davis e cols. 2001). Os canais que podem ser modulados diretamente pelo NO são: CNGC; canais para potássio sensíveis a cálcio (BK); canais para sódio (Ahern e cols. 2002) e os receptores do tipo NMDA (Lei e cols. 1992). Desta forma os receptores NMDA exercem importante papel no processo de síntese de NO por meio da nNOS (Garthwaite, 1988), ao mesmo tempo os receptores NMDA podem ser modulados pelo NO (Lei e cols. 1992; Davis e cols. 2001; Ahern e cols. 2002) [Figura 2].

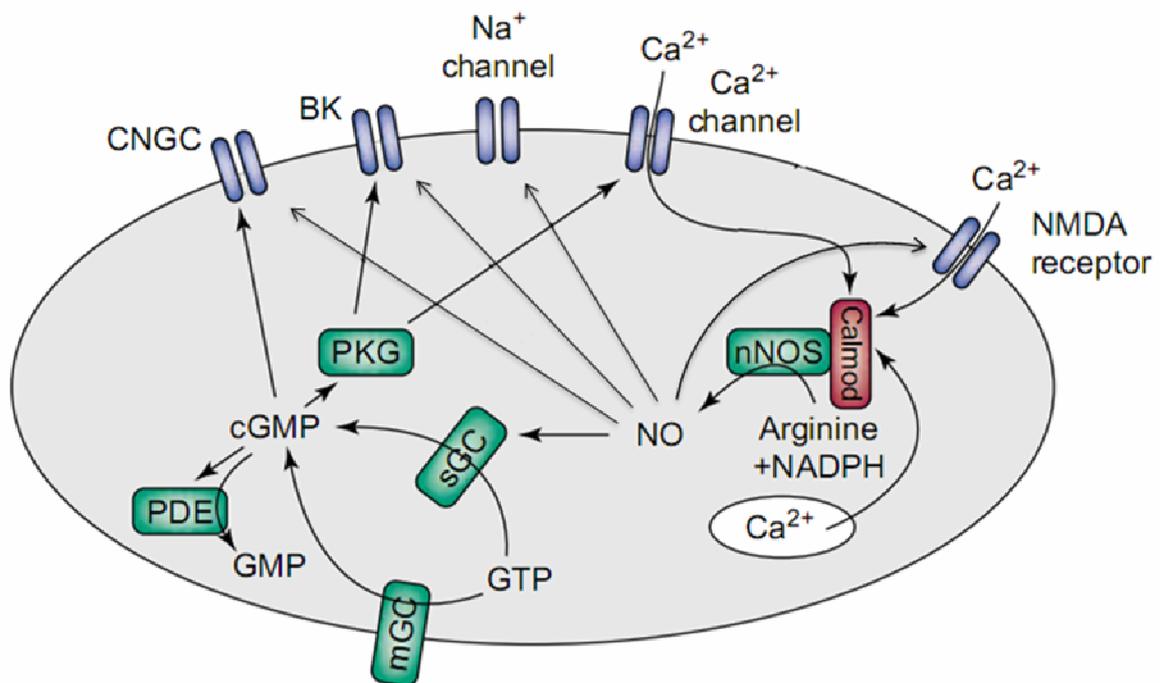


Figura 2. Metabolismo do NO e GMPc. Abreviações: BK, canais para K⁺ sensíveis a cálcio; Calmod, calmodulina; CNGC, canais ativados por nucleotídeos cíclicos; GCm, guanilato ciclase de membrana; nNOS, óxido nítrico sintase neuronal; PDE, fosfodiesterase moduladas por nucleotídeos cíclicos; PKG, proteína Kinase G; GCs, guanilato ciclase solúvel (modificado de Ahern e cols. 2002).

Como descrito anteriormente, após a demonstração da atividade da nNOS nos NPGS (Anderson, 1992), estudos vêm sendo realizados com o objetivo de se compreender se a ação do NO sobre os NPGS é excitatória ou inibitória.

Estudo realizado em coelhos, anestesiados com pentobarbital sódico, nos quais se administrou o precursor da síntese de NO (L-arginina) e um inibidor não seletivo da NOS (L-NAME) na coluna torácica, mostrou que a atividade simpática renal aumentou com a administração de L-arginina e diminuiu com a administração de L-NAME, sugerindo que o NO tem ação excitatória sobre a atividade simpática renal (Hakim e cols. 1995). Além disso, estudo realizado em ratos anestesiados com uretana, mostrou que a administração intratecal de doador de NO (nitroprussiato de sódio) levou a um aumento da PA, sem alterar a FC, cujo efeito foi atribuído à ativação de NPGS (Lee, e cols. 1996). Resultado semelhante foi obtido por Malik e cols. (2007), com a administração intratecal de L-arginina, os quais atribuíram, também, a resposta hemodinâmica à ativação da via NO/GMPc, uma vez que a administração prévia do inibidor da GCs (ODQ) impediu o aumento da PA e FC promovido pela L-arginina. García & Celuch (2002) administraram noradrenalina por via intratecal em ratos anestesiados, e obtiveram aumento da PA sem alterar a FC. Esta resposta foi inibida quando foi administrado, previamente à noradrenalina, um antagonista do receptor NMDA (AP5) ou o L-NAME. Esta observação permitiu sugerir que o NO gerado após a ligação do glutamato ao receptor NMDA parece estar envolvido no aumento da PA provocado pela administração intratecal de noradrenalina. Assim, existe um conjunto de evidências em coelhos e ratos anestesiados que sugere uma ação excitatória do NO na medula espinhal.

Por outro lado, Koga e cols. (1999) e García e cols. (1997) observaram que após a administração de L-NAME por via intratecal ocorreu um aumento na PA, e que esta resposta foi abolida nos ratos que receberam, previamente, antagonistas dos receptores NMDA, sugerindo um papel inibitório do NO sobre o receptor NMDA. Efeito inibitório do NO foi, também, observado por Arnolda e cols. (2000), em ratos anestesiados com transecção espinhal ao nível de C1, nos quais a administração intratecal de agonista do receptor NMDA induziu aumento da PA. Ação inibitória do NO foi relatada, ainda, em ratos acordados, por meio do aumento da PA sem alteração da FC após a administração de L-NAME intratecal (Feldman e cols. 1996). Powers-Martin e cols. (2006) relataram, também, que ratos Wistar Kyoto possuem maior atividade da enzima NOS nos NPGS quando comparados aos ratos espontaneamente hipertensos (SHR). Estes autores sugeriram que a menor síntese de NO diminui o efeito inibitório do óxido nítrico sobre os NPGS, o que permite o aumento da atividade simpática, FC e PA observada nos SHR (Powers-Martin e cols. 2006).

Portanto, existe uma clara contradição na literatura sobre o papel do NO na modulação dos NPGS na medula espinhal. Parte dos relatos sugerem que o NO tem em condições basais um efeito simpatoexcitatório sobre os NPGS (Hakim e cols. 1995; Lee e cols. 1996; García & Celuch 2002), e que o aumento de PA e FC, após a administração intratecal de L-arginina é dependente de GMPc (Malik e cols. 2007). Entretanto há, também, relatos que indicam um efeito simpatoinibitório do NO (Feldman e cols., 1996; Arnolda e cols. 2000; Yang e cols. 2004), possivelmente, sobre os receptores NMDA dos NPGS (Koga e cols. 1999; e García e cols. 1997). Esta contradição sobre a ação do NO nos NPGS, também, foi evidenciada em trabalhos sobre NPGS *in vitro*, quando se observou uma ação

inibitória do NO sobre os NPGS (Wu & Dun, 1996) e uma ação excitatória pelos mesmos autores (Wu e cols. 1997).

Assim, esta contradição observada na literatura por meio de estudos *in vivo* (ratos anestesiados) e *in vitro* sobre a ação do NO nos NPGS, justifica a condução de estudos em ratos acordados, com objetivo de melhor caracterizar a ação do NO sobre os NPGS. Desta forma, julga-se oportuno avaliar, também, em ratos acordados se a ação do NO ocorre por meio de receptores NMDA, como proposto em animais anestesiados (Koga e cols. 1999; e García e cols. 1997). Além disso, julga-se, também importante, avaliar o papel desenvolvido pela via NO/GMPc em condições basais, por meio da inibição da GCs pelo ODQ, ou ainda, avaliar a via NO/GMPc numa situação onde a geração de NO está aumentada devido à administração intratecal de L-arginina.

2.Objetivos

OBJETIVO GERAL

Avaliar a ação modulatória da via NO/GMPc possivelmente sobre os NPGS, nas respostas hemodinâmicas de PAM e FC, por meio da administração de diferentes substâncias por via intratecal.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Examinar os efeitos do bloqueio da síntese de NO por meio da administração intratecal de L-NAME na medula espinhal, sobre as respostas hemodinâmicas de PAM e FC;
 - Avaliar se a inibição da GCs altera os parâmetros hemodinâmicos, PAM e FC. Ou seja, examinar se a ação do NO sobre os NPGS em condições basais, na medula espinhal, é via GMPc ou via independente de GMPc;
 - Avaliar se a modulação do NO sobre os NPGS na medula espinhal se faz por meio de receptores NMDA;
 - Avaliar qual é o efeito do aumento da geração de NO, por meio da administração de L-arginina intratecal, na medula espinhal, sobre as respostas hemodinâmicas de PAM e FC;
 - Analisar se as respostas hemodinâmicas de PAM e FC promovidas pela administração intratecal de L-arginina depende, ou não, de GMPc.
-

3. Material e Métodos

Animais

Foram utilizados ratos Wistar, com peso entre 300 e 350 gramas, provenientes do Biotério Central do Campus da USP de Ribeirão Preto. Estes animais foram inicialmente mantidos no biotério do Departamento de Fisiologia, acondicionados em caixas com no máximo 5 animais, as quais foram mantidas em uma sala com temperatura de 23°C, umidade de 40 a 70% e ciclo claro-escuro de 12 horas, com livre acesso à ração e água. Os experimentos foram realizados no período das 7 às 16 horas, os animais foram levados previamente ao laboratório para adaptação. O estudo é constituído de 10 grupos, os quais receberam a administração de drogas por meio do espaço subaracnóide.

Este trabalho está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CETEA) da FMRP em reunião de 03 de dezembro de 2007(nº protocolo 157/2007).

Procedimentos cirúrgicos

Cateterização lombar do espaço subaracnóide da medula espinhal

Seis dias antes dos experimentos os animais foram submetidos à anestesia com tribromo-etanol (250 mg/kg de massa corpórea, i.p.) para a canulação intratecal lombar. Os animais foram colocados em decúbito ventral sobre um objeto cilíndrico (seringa 20ml) para que a região lombar ficasse hiper-flexionada (Figura 3A). Foram localizadas as espinhas ilíacas póstero-superiores, as quais permitiram a localização do espaço intervertebral entre L5 e L6, onde, foi realizada uma pequena incisão cutânea. Através da incisão foi realizada uma punção com agulha Weiss 20G (Becton, Dickinson and Company, New Jersey

USA) até o nível do espaço subaracnóide (Figura 3B). O abalo típico da cauda do animal foi usado como indicativo do correto posicionamento da agulha. Um segmento de polietileno PE 10 (Becton, Dickinson and Company, New Jersey USA) foi introduzido através da agulha, até alcançar 2,0 cm do espaço subaracnóide, a fim de posicioná-lo na altura da intumescência lombo-sacra [Figura 3B (seta vermelha)] (Storkson e cols. 1996). A agulha foi então retirada cuidadosamente e o cateter preenchido com 10 μ l de salina heparinizada (pH 7,4). Em seguida, o cateter foi exteriorizado no dorso do animal, para posterior administração de drogas, com os animais acordados. Ao final do procedimento cirúrgico os animais receberam analgésico (Flunixin Meglumina, 2,5 mg/kg, i.m.) e antibiótico (Benzilpenicilina, 24 UI/g, i.m.) e, em seguida, foram colocados em gaiolas individuais e levados ao Biotério do Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (USP).

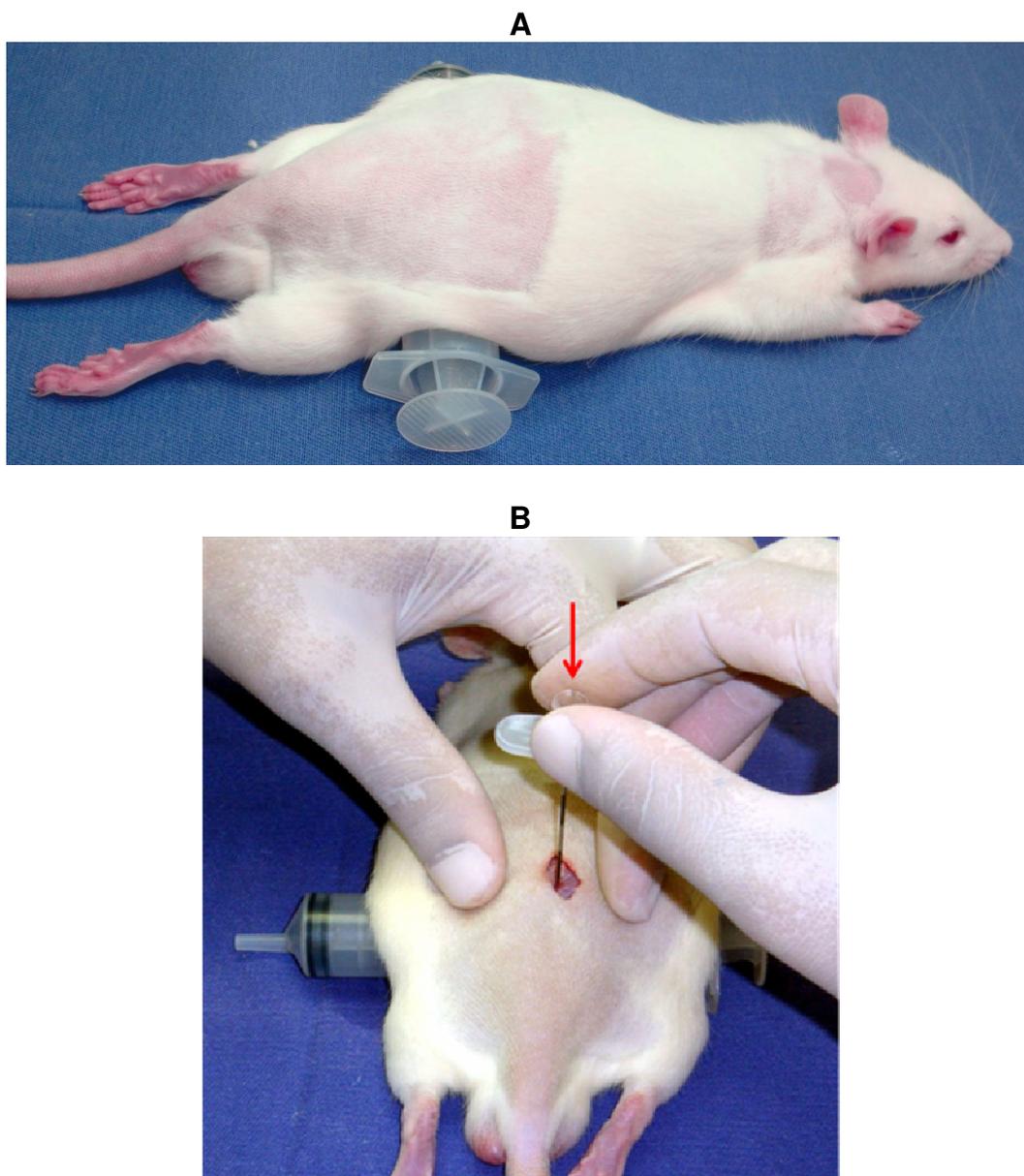


Figura 3. Cirurgia de cateterização lombar do espaço subaracnóide da medula espinhal. **A**, os animais foram colocados em decúbito ventral sobre um objeto cilíndrico (seringa 20ml) para que a região lombar ficasse hiper-flexionada; **B**, foi realizada uma punção com agulha Weiss 20G até o nível do espaço subaracnóide; **B** (seta vermelha), introdução de um segmento de polietileno PE 10 através da agulha, até alcançar 2,0 cm do espaço subaracnóide, a fim de posicioná-lo na altura da intumescência lombo-sacra.

Implantação da cânula na artéria femoral

Cinco dias após a cateterização subaracnóide os animais foram submetidos à anestesia com tribromo-etanol (250 mg/kg de massa corpórea, i.p.). Em seguida foi implantada uma cânula de polietileno (Becton Dickinson, New Jersey, USA), PE-10 soldada a um PE-50, na artéria femoral esquerda. Esta cânula foi exteriorizada no dorso do animal, para registro da pressão arterial pulsátil (PAP) com os animais acordados. A seguir, os animais foram, novamente, colocados gaiolas individuais para recuperação da cirurgia.

Registro da Pressão Arterial

No dia do experimento (vinte quatro horas após a cirurgia de implantação da cânula arterial) o animal foi levado ao laboratório de registro, pelos menos 60 minutos antes do início da coleta de dados, para que o mesmo se habituassem às condições experimentais. Os experimentos foram realizados sob condições apropriadas (luz e temperatura) para registro da PAP em animais acordados.

A cânula arterial foi conectada a um transdutor de pressão (Statham, modelo P23XL, Valley View, OH, USA). O sinal, depois de devida amplificação (Pré-amplificador Hewlett-Packard modelo 8805B, Chicago, IL, USA), foi digitalizado por meio de uma interface analógico-digital Windaq (Dataq Instruments, Akron, OH, USA) e amostrado a 2000 Hz em um microcomputador onde foi analisado. Durante a análise, a pressão arterial média (PAM) e a frequência cardíaca (FC) foram derivadas, a partir da PAP.

Confirmação do posicionamento da cânula intratecal

Ao final do experimento foi administrado, via intratecal, 10 µl de azul de metileno no animal. A seguir, o animal foi submetido à anestesia com tribromo-etanol (250 mg/kg de massa corpórea, i.p.) e perfundido transcordialmente, para que sua medula espinhal fosse exposta. Desta forma, os experimentos foram considerados válidos, somente, quando a medula espinhal do animal foi corada pelo o azul de metileno (Figura 4).



Figura 4. Confirmação da administração intratecal de diferentes compostos.

Grupos experimentais

Os grupos estudados foram identificados de acordo com o tratamento a que foram submetidos.

Grupo L-NAME – Inibidor não seletivo da enzima NOS [250 nmol, dissolvido em 10 µl fluido cérebroespinal artificial (aCSF)] (Feldman e cols. 1996).

Grupo D-NAME – Isômero inativo do L-NAME (250 nmol/10 µl aCSF).

Grupo ODQ – Inibidor da Guanilato Ciclase Solúvel (100 mmol, dissolvido em 10 µl do veículo DMSO 1%) (Malik e cols. 2007).

Grupo DMSO 1% (10 µl)

Grupo AP5 – Antagonista dos receptores NMDA (50 nmol/10 µl aCSF) (Koga e cols. 1999).

Grupo aCSF – (10 µl)

Grupo L-NAME+AP5 – [(250 nmol/10 µl aCSF)/(50 nmol/10 µl aCSF)]

Grupo L-arginina (L-ARG) – Precursor da síntese de NO (100µmol/10 µl aCSF) (Malik e cols. 2007).

Grupo D-arginina (D-ARG) – Isômero inativo da L-arginina (100µmol/10 µl aCSF)

Grupo ODQ+L-ARG – [(100 mmol/10 µl aCSF)/(100µmol/10 µl aCSF)]

Protocolos Experimentais

No presente estudo foram utilizados 2 protocolos experimentais.

Protocolo 1: Após a adaptação do animal ao ambiente laboratorial foi realizado o registro da PAP. Os primeiros 25 minutos foram considerados como registro basal, em seguida um volume 10 μ l contendo um dos compostos citado acima (droga ou veículo) que define o grupo, foi injetado de forma a preencher, apenas, o interior da cânula de intratecal. Assim, com esta primeira manobra os 10 μ l de salina heparinizada contidos no interior da cânula intratecal foram “empurrados” para o interior do espaço subaracnóide. A seguir, um segundo registro basal de 15 minutos foi realizado (Basal 2), e após este período a droga que estava contida, agora, no interior da cânula intratecal foi então “empurrada” para interior do espaço subaracnóide com 10 μ l aCSF. A seguir, o registro da PAP prosseguia por 10 ou 30 minutos (Figura 5).

Protocolo 2: A diferença entre os protocolos experimentais é que no segundo protocolo foi administrado uma segunda droga 10 minutos após primeiro composto. A seguir, o registro da PAP prosseguia por 30 minutos [Figura 6] (modificado de Yang e cols. 2004).

Figura 5: Protocolo Experimental 1.

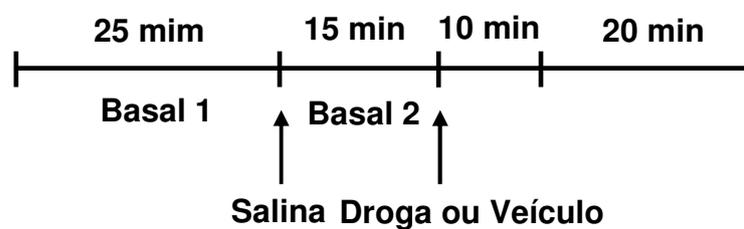
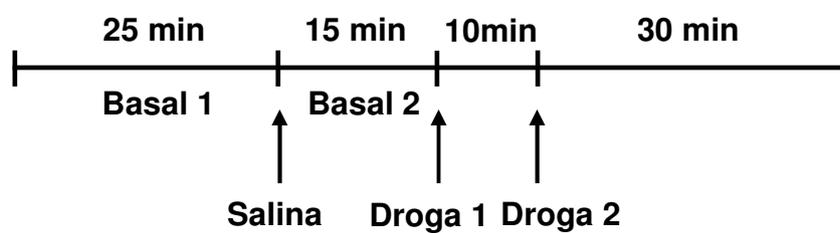


Figura 6: Protocolo Experimental 2.



Análise Estatística

Os resultados são expressos como média \pm EPM (erro padrão da média). Para se avaliar o efeito do tratamento (drogas vs veículo) sobre a PAM e FC, foi utilizado o teste ANOVA Two way, seguido do pós teste de Newman-Keuls Student. O Test-t de Student foi utilizado para comparar os valores basais de PAM e FC entre grupo tratado e seu grupo controle. A diferença entre os parâmetros avaliados foi considerada significativa quando $p < 0,05$.

4.Resultados

Os resultados estão apresentados como média \pm EPM sob a forma de figuras e tabelas. Os valores individuais são apresentados no apêndice sob a forma de tabelas (I – XL.B).

4.1 Respostas da PAM e da FC à administração intratecal de L-NAME ou do isômero inativo D-NAME.

A evolução (minutos) das respostas da PAM (Δ PAM) e da FC (Δ FC) à administração intratecal de L-NAME ou D-NAME é apresentada na Tabela 1 e ilustrada na Figura 7, enquanto que as respostas individuais estão nas tabelas I – VIII. Os resultados mostram que ambos os grupos apresentaram valores basais similares de PAM e FC (Tabela 1). Entretanto, o L-NAME provocou aumento da PAM, mas não alterou os valores de FC, enquanto que o D-NAME não alterou a PAM e FC.

4.2. Respostas da PAM e da FC à administração intratecal de ODQ ou do veículo (DMSO).

A evolução (minutos) das respostas da PAM (Δ PAM) e da FC (Δ FC) à administração intratecal de ODQ ou DMSO é apresentada na Tabela 2 e ilustrada na Figura 8, enquanto que as respostas individuais estão nas tabelas IX – XVI. Os resultados mostram que ambos os grupos apresentaram valores basais similares de PAM e FC (Tabela 2). O ODQ e o veículo (DMSO) não alteraram a PAM e FC.

Tabela 1. Evolução (minutos) das respostas da pressão arterial média (Δ PAM) e da frequência cardíaca (Δ FC) à administração intratecal de L-NAME (n=6) ou D-NAME (n=7).

		Basal	2	4	6	8	10 min
Δ PAM (mmHg)	L-NAME	102 \pm 3	7 \pm 2 ^{*#}	9 \pm 3 ^{*#}	8 \pm 2 ^{*#}	8 \pm 2 ^{*#}	10 \pm 1 ^{*#}
	D-NAME	101 \pm 3	2 \pm 1	1 \pm 1	0 \pm 1	1 \pm 1	0 \pm 1
Δ FC (bpm)	L-NAME	380 \pm 9	2 \pm 3	1 \pm 4	-1 \pm 5	-5 \pm 6	7 \pm 12
	D-NAME	378 \pm 6	13 \pm 6	4 \pm 5	-1 \pm 4	2 \pm 4	5 \pm 5

*P \leq 0,05 em relação ao controle. #P \leq 0,05 em relação ao basal.

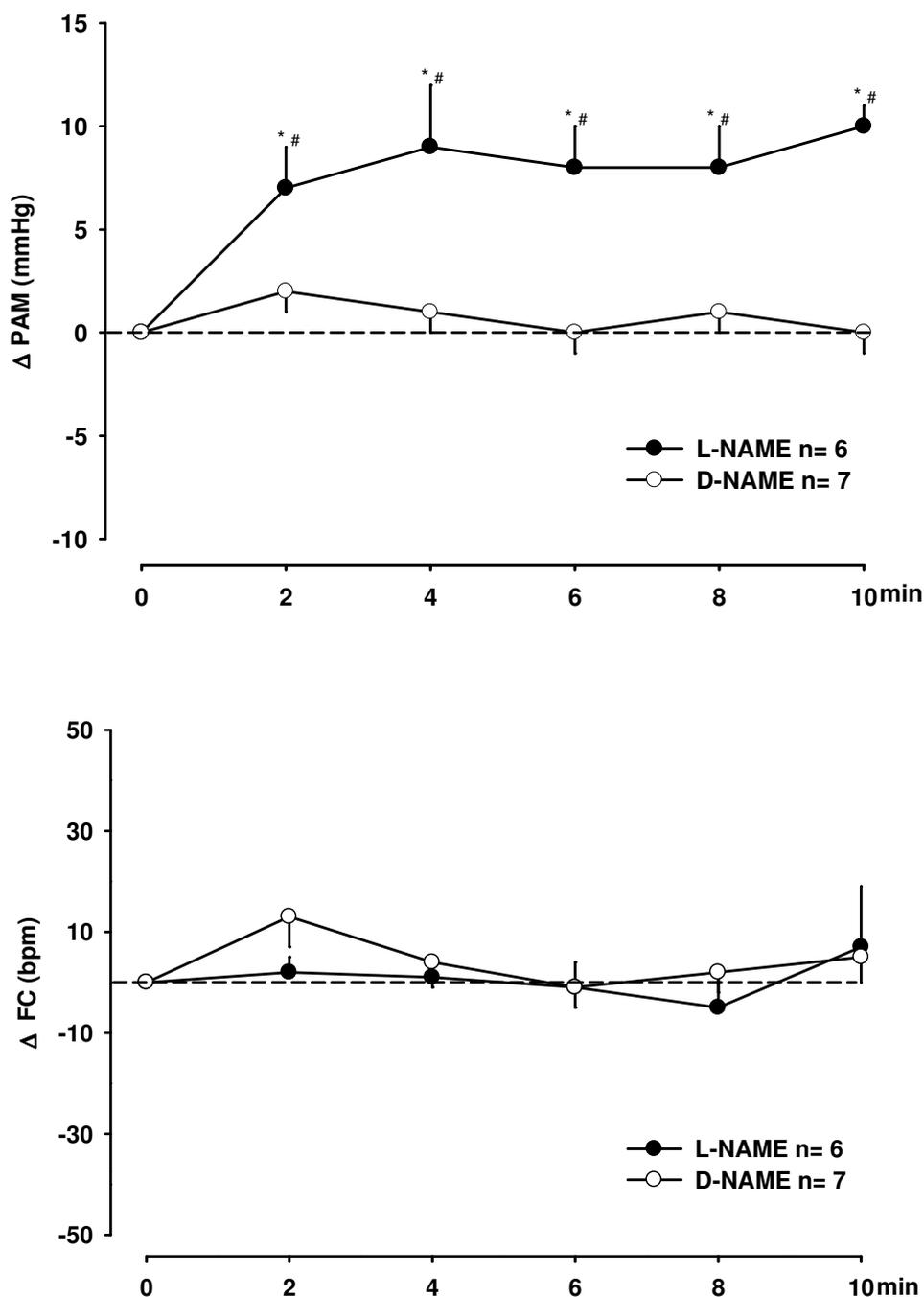


Figura 7: Evolução (minutos) das respostas da pressão arterial média (Δ PAM) e da frequência cardíaca (Δ FC) à administração intratecal de L-NAME (n=6) ou D-NAME (n=7). * $P \leq 0,05$ em relação ao controle; # $P \leq 0,05$ em relação ao basal (0 min).

Tabela 2: Evolução (minutos) das respostas da pressão arterial média (Δ PAM) e da frequência cardíaca (Δ FC) à administração intratecal de ODQ (n=7) ou DMSO (n=6).

		Basal	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30 min
Δ PAM (mmHg)	ODQ	108 \pm 3	1 \pm 1	-1 \pm 2	0 \pm 2	1 \pm 2	2 \pm 2	1 \pm 1	0 \pm 2	0 \pm 2	-1 \pm 2	-1 \pm 2
	DMSO	104 \pm 2	0 \pm 4	-2 \pm 4	-3 \pm 4	-1 \pm 3	-3 \pm 5	-1 \pm 4	1 \pm 3	0 \pm 3	-1 \pm 4	1 \pm 4
Δ FC (bpm)	ODQ	386 \pm 14	0 \pm 4	-7 \pm 6	0 \pm 6	1 \pm 6	6 \pm 7	6 \pm 10	-7 \pm 7	-7 \pm 8	-3 \pm 6	-8 \pm 7
	DMSO	381 \pm 6	3 \pm 5	4 \pm 5	-1 \pm 6	-4 \pm 6	1 \pm 6	5 \pm 6	6 \pm 10	9 \pm 10	7 \pm 11	9 \pm 12

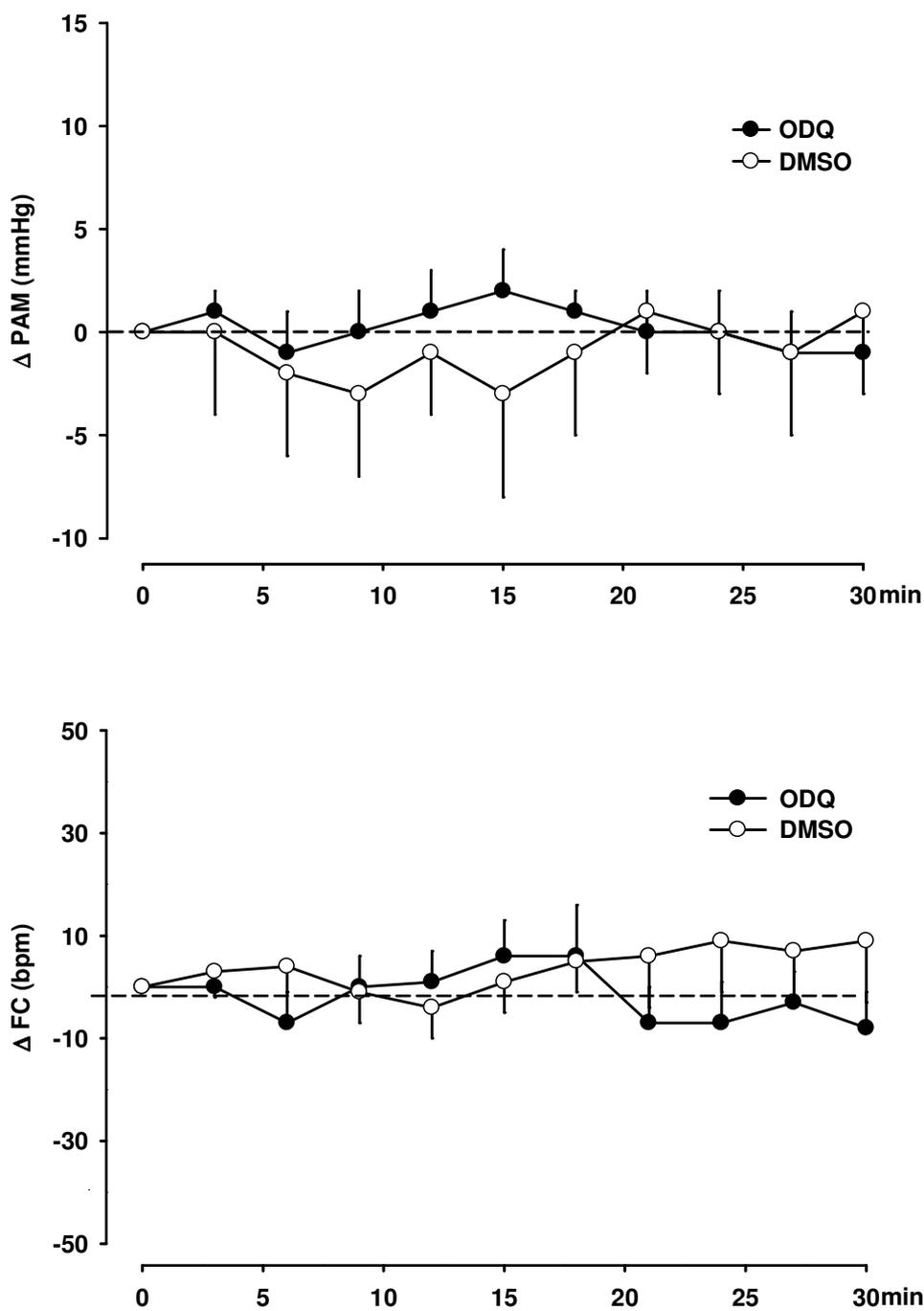


Figura 8: Evolução (minutos) das respostas da pressão arterial média (Δ PAM) e da frequência cardíaca (Δ FC) à administração intratecal de ODQ (n=7) ou DMSO (n=6).

4.3. Respostas da PAM e da FC à administração intratecal de AP5 ou veículo (aCSF).

A evolução (minutos) das respostas da PAM (Δ PAM) e da FC (Δ FC) à administração intratecal de AP5 ou aCSF é apresentada na Tabela 3 e ilustrada na Figura 9, enquanto que as respostas individuais estão nas tabelas XVII – XXIV. Os resultados mostram que ambos os grupos apresentaram valores basais similares de PAM e FC (Tabela 3). O AP5 não alterou a PAM, mas promoveu redução da FC. O veículo (aCSF) não alterou a PAM e a FC basais.

4.4. Respostas da PAM e da FC à administração intratecal de L-NAME seguida da administração de AP5.

A evolução (minutos) das respostas da PAM (Δ PAM) e da FC (Δ FC) à administração intratecal de L-NAME seguida da administração de AP5 é apresentada na Tabela 4 e ilustrada na Figura 10, enquanto que as respostas individuais estão nas tabelas XXV – XXVIII. A Tabela 4 mostra, ainda, que os valores basais de PAM e da FC são similares aos demais grupos apresentados até o momento. Os resultados mostram que o AP5 não afetou a elevação da pressão arterial causada pelo L-NAME. A FC não foi alterada nem pelo L-NAME e nem pelo AP5.

Tabela 3. Evolução (minutos) das respostas da pressão arterial média (Δ PAM) e da frequência cardíaca (Δ FC) à administração intratecal de AP5 (n=6) ou veículo (aCSF) (n=7).

		Basal	2	4	6	8	10 min
Δ PAM (mmHg)	AP5	100 \pm 4	-1 \pm 1	-1 \pm 1	-1 \pm 2	-1 \pm 2	0 \pm 2
	aCSF	100 \pm 2	2 \pm 1	2 \pm 2	1 \pm 1	1 \pm 1	2 \pm 1
Δ FC (bpm)	AP5	359 \pm 12	-16 \pm 7*#	-17 \pm 7*#	-15 \pm 6*#	-9 \pm 7#	-12 \pm 7*#
	aCSF	379 \pm 10	1 \pm 5	4 \pm 7	4 \pm 4	6 \pm 4	4 \pm 4

*P \leq 0,05 em relação ao controle. #P \leq 0,05 em relação ao basal.

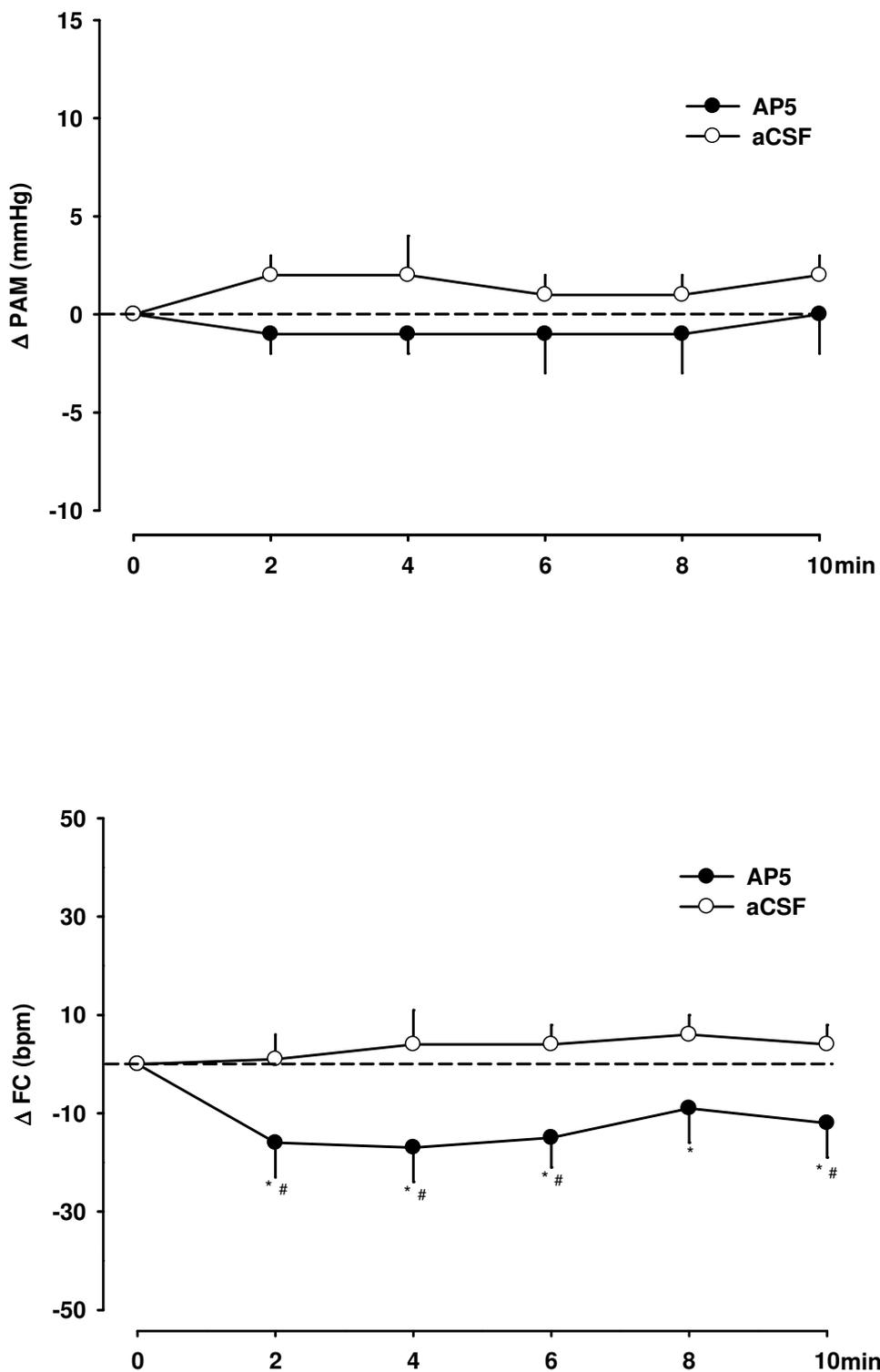


Figura 9: Evolução (minutos) das respostas da pressão arterial média (Δ PAM) e da frequência cardíaca (Δ FC) à administração intratecal de AP5 (n=6) ou aCSF (n=7). * $P \leq 0,05$ em relação ao controle; # $P \leq 0,05$ em relação ao basal (0 min).

Tabela 4: Evolução (minutos) das respostas da pressão arterial média (Δ PAM) e da frequência cardíaca (Δ FC) à administração intratecal de L-NAME seguida de AP5 (N=6).

	L-NAME				AP5						
	Basal	-6	-3	0 min	3	6	9	12	15	18	21 min
Δ PAM (mmHg)	102 \pm 3*	8 \pm 2*	9 \pm 2*	8 \pm 1*	7 \pm 0*	8 \pm 1*	7 \pm 1*	7 \pm 1*	7 \pm 1*	6 \pm 2*	6 \pm 1*
Δ FC (bpm)	380 \pm 9	2 \pm 3	-1 \pm 4	-1 \pm 8	9 \pm 7	-7 \pm 11	4 \pm 12	14 \pm 10	6 \pm 7	2 \pm 10	5 \pm 8

*P \leq 0,05 em relação ao basal.

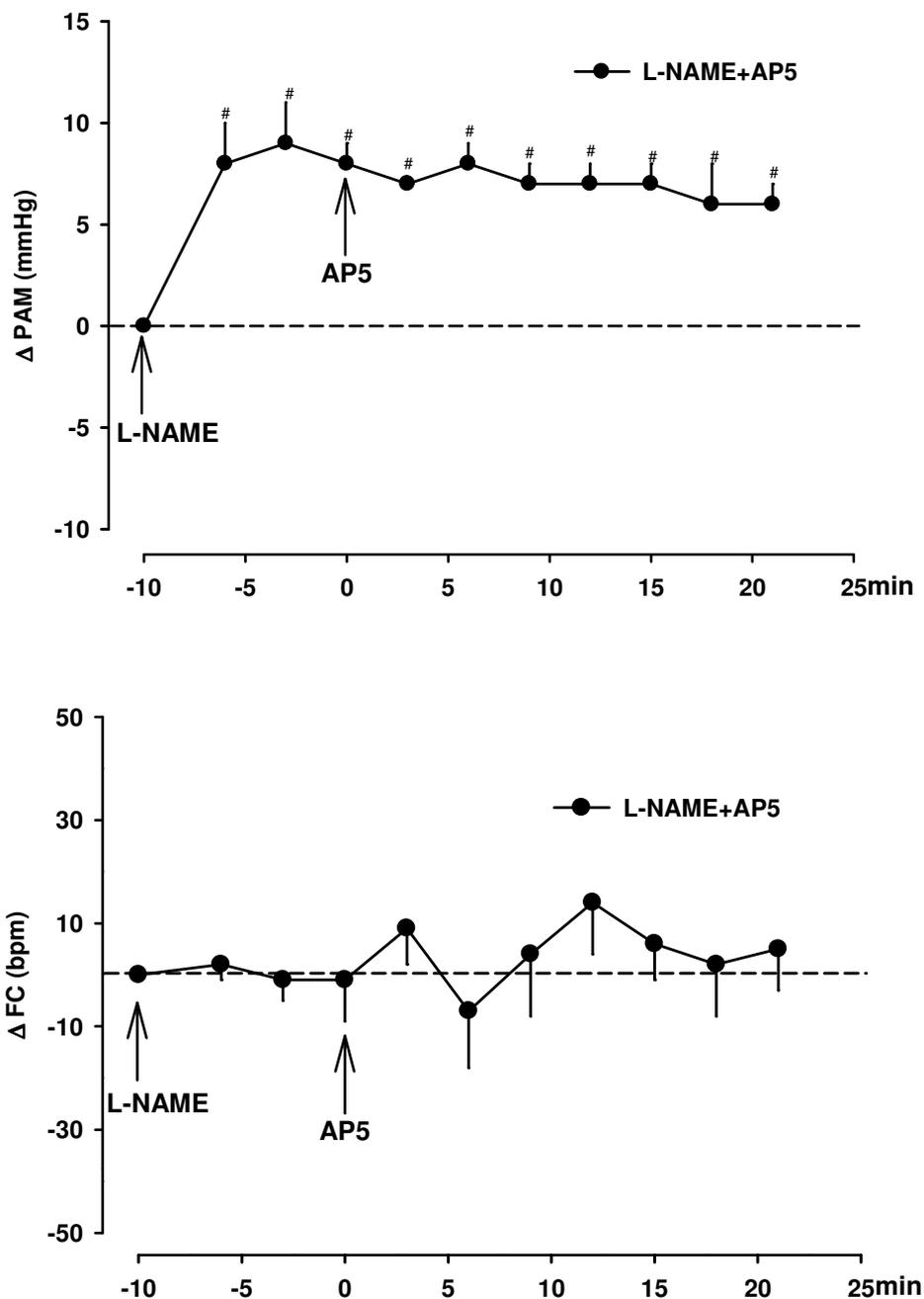


Figura 10: Evolução (minutos) das respostas da pressão arterial média (Δ PAM) e da frequência cardíaca (Δ FC) à administração intratecal de L-NAME seguida de AP5 (n=6). #P \leq 0,05 em relação ao basal (-10 min).

4.5. Respostas da PAM e da FC à administração intratecal de L-ARG ou isômero inativo D-ARG.

A evolução (minutos) das respostas da PAM (Δ PAM) e da FC (Δ FC) à administração intratecal de L-ARG ou D-ARG é apresentada na Tabela 5 e ilustrada na Figura 11, enquanto que as respostas individuais estão nas tabelas XXIX – XXXVI. Os resultados mostram que ambos os grupos apresentaram valores basais similares de PAM e FC (Tabela 5). A L-ARG promoveu uma redução tanto na PAM quanto na FC, enquanto que a D-ARG não alterou a PAM e a FC.

4.6. Respostas da PAM e da FC à administração intratecal de ODQ seguida de L-ARG ou administração de apenas L-ARG.

A evolução (minutos) das respostas da PAM (Δ PAM) e da FC (Δ FC) à administração intratecal de ODQ seguida de L-ARG ou administração de apenas de L-ARG é apresentada na Tabela 6 e ilustrada na Figura 12, enquanto que as respostas individuais estão nas tabelas XXXIII – XL.B. A Tabela 6 mostra, ainda, que os valores basais de PAM e da FC são similares aos demais grupos apresentados até o momento. Os resultados mostram que o ODQ seguido da L-ARG, não alterou a PAM e nem a FC, enquanto que a L-ARG promoveu uma redução tanto na PAM quanto na FC.

Tabela 5: Evolução (minutos) das respostas da pressão arterial média (Δ PAM) à administração intratecal de L-ARG ou D-ARG.

		Basal	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30min
Δ PAM (mmHg)	L-ARG	101 \pm 3	-2 \pm 1 [*]	-3 \pm 1 [*]	-5 \pm 1 ^{*#}	-5 \pm 2 ^{*#}	-6 \pm 1 ^{*#}	-5 \pm 1 ^{*#}	-5 \pm 1 ^{*#}	-6 \pm 2 ^{*#}	-5 \pm 2 ^{*#}	-5 \pm 2 ^{*#}
	D-ARG	98 \pm 1	4 \pm 1	3 \pm 1	4 \pm 1	3 \pm 1	2 \pm 1	1 \pm 1	0 \pm 1	2 \pm 1	0 \pm 1	1 \pm 1
Δ FC (bpm)	L-ARG	396 \pm 9	-16 \pm 5 ^{*#}	-20 \pm 5 ^{*#}	-23 \pm 5 ^{*#}	-22 \pm 7 ^{*#}	-28 \pm 6 ^{*#}	-24 \pm 8 ^{*#}	-28 \pm 6 ^{*#}	-24 \pm 8 ^{*#}	-32 \pm 6 ^{*#}	-29 \pm 9 ^{*#}
	D-ARG	380 \pm 11	7 \pm 7	6 \pm 8	2 \pm 8	6 \pm 7	6 \pm 6	9 \pm 8	12 \pm 7	12 \pm 9	2 \pm 8	3 \pm 8

*P \leq 0,05 em relação ao controle. #P \leq 0,05 em relação ao basal.

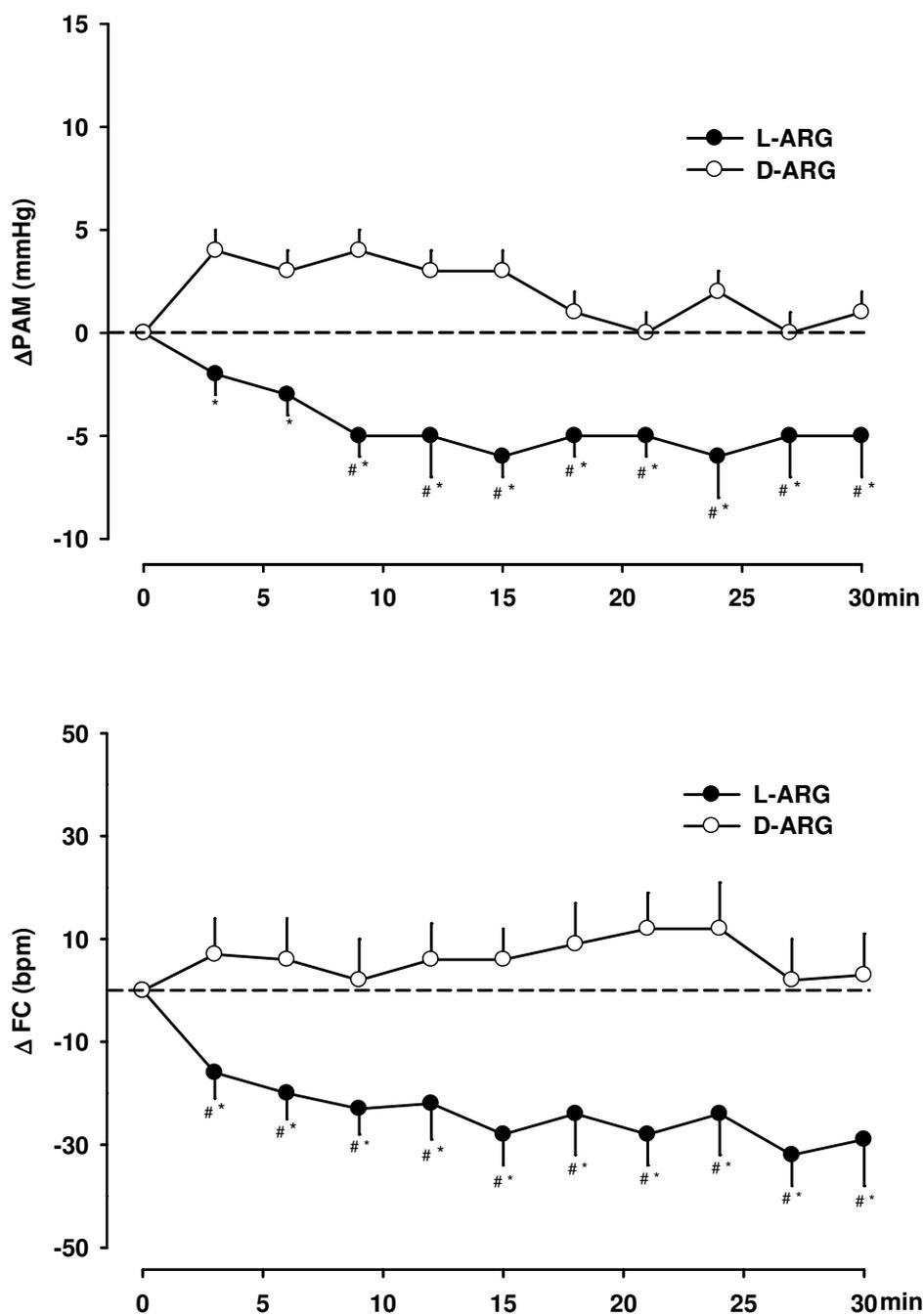


Figura 11: Evolução (minutos) das respostas da pressão arterial média (Δ PAM) e da frequência cardíaca (Δ FC) à administração intratecal de L-ARG (n=6) ou D-ARG (n=6). * $P \leq 0,05$ em relação ao controle. # $P \leq 0,05$ em relação ao basal (0min).

Tabela 6: Evolução (minutos) das respostas da pressão arterial média (Δ PAM) e da frequência cardíaca (Δ FC) à administração intratecal de ODQ seguida de L-ARG (n=6) ou administração de apenas L-ARG (n=6).

		Basal	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30min
Δ PAM (mmHg)	ODQ+L-ARG	105 \pm 1	3 \pm 1	3 \pm 1	1 \pm 2	0 \pm 2	0 \pm 2	-1 \pm 2	-1 \pm 2	1 \pm 2	1 \pm 2	3 \pm 2
	L-ARG	101 \pm 3	-2 \pm 1	-3 \pm 1	-5 \pm 1 [#]	-5 \pm 2 [#]	-6 \pm 1 [#]	-5 \pm 1 [#]	-5 \pm 1 [#]	-6 \pm 2 [#]	-5 \pm 2 [#]	-5 \pm 2 [#]
Δ FC (bpm)	ODQ+L-ARG	376 \pm 11	1 \pm 7	-3 \pm 8	-7 \pm 8	-9 \pm 10	-9 \pm 11	-11 \pm 11	-11 \pm 9	-13 \pm 9	-14 \pm 6	-14 \pm 4
	L-ARG	396 \pm 9	-16 \pm 5 [#]	-20 \pm 5 [#]	-23 \pm 5 [#]	-22 \pm 7 [#]	-28 \pm 6 [#]	-24 \pm 8 [#]	-28 \pm 6 [#]	-24 \pm 8 [#]	-32 \pm 6 [#]	-29 \pm 9 [#]

[#]P \leq 0,05 em relação ao basal.

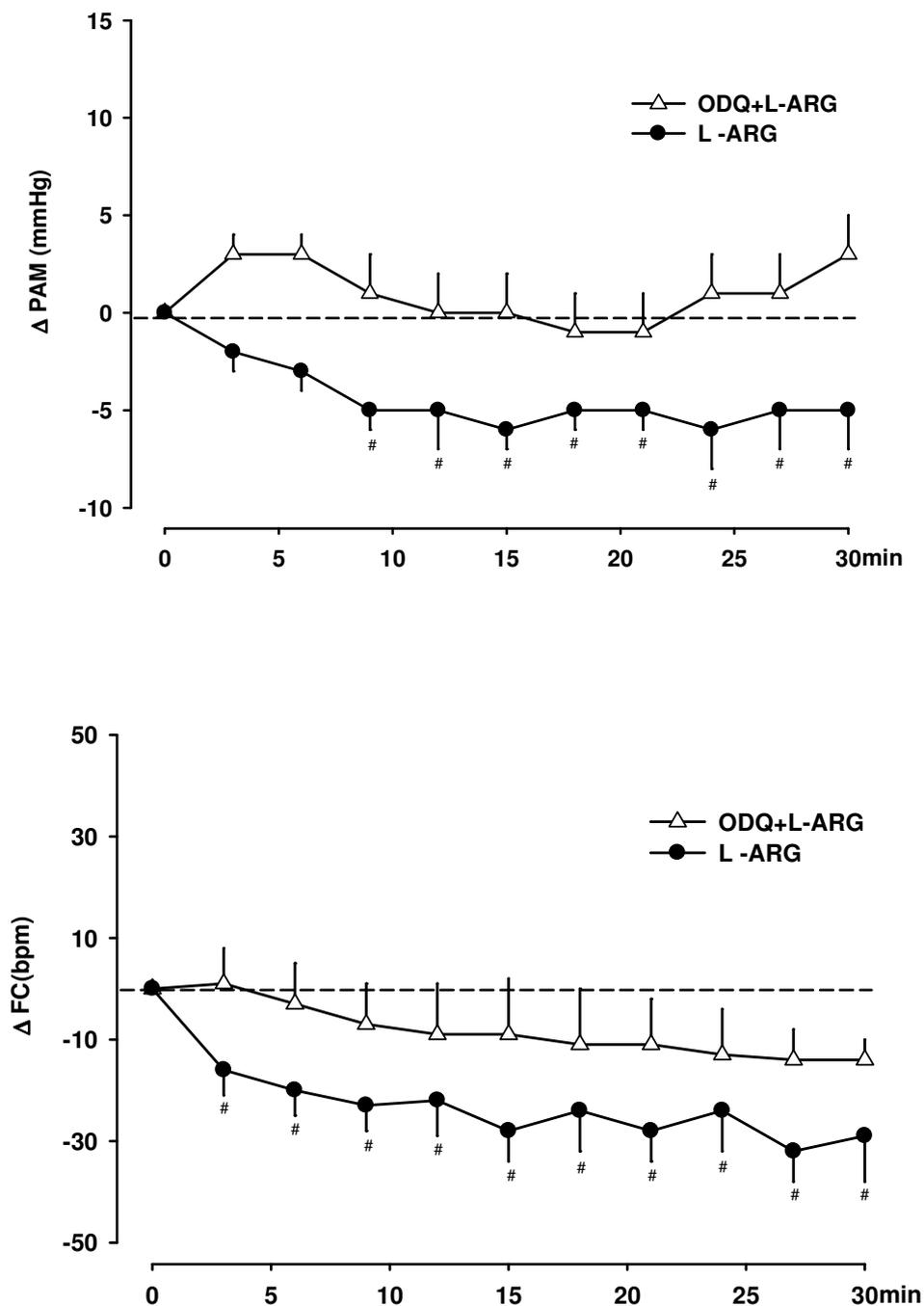


Figura 12: Evolução (minutos) das respostas da pressão arterial média (Δ PAM) e da frequência cardíaca (Δ FC) à administração intratecal de ODQ seguida de L-ARG (n=6) ou administração de apenas L-ARG (n=6). # $P \leq 0,05$ em relação ao basal.

5. Discussão

Os resultados da administração intratecal de compostos que atuam na via NO/GMPc mostram: 1) O L-NAME aumentou a PAM e não alterou a FC; 2) O ODQ não alterou os valores basais de PAM e FC; 3) O AP5 não alterou a PAM, mas provocou uma redução da FC; 4) O AP5 não afetou o aumento da PAM causado pelo L-NAME; 5) A L-ARG causou redução da PAM e da FC; 6) A L-ARG administrado após o ODQ não alterou a PAM e a FC.

O primeiro protocolo realizado neste estudo teve por objetivo examinar em ratos acordados o papel do NO endógeno na modulação da PA e da FC basais, possivelmente, pela ação sobre os NPGS. Assim, a administração intratecal de L-NAME, um inibidor não seletivo da NOS, promoveu um aumento da PAM. Esta resposta indica que o NO é produzido tonicamente na medula espinhal e atua de forma inibitória, possivelmente, sobre os NPGS. Entretanto, é importante destacar que o L-NAME não alterou a FC basal, o que pode estar refletindo uma menor participação simpatoinibitória do NO sobre os NPGS situados nos níveis, T1-T4, os quais se dirigem ao coração. Estas observações contestam com aquelas obtidas em estudo anterior realizado em ratos anestesiados com uretana, nos quais foi observado que a administração intratecal de L-NAME provocou uma redução da PAM sem alteração dos valores basais de FC (Lee e cols. 1996). Estes autores sugeriram que, em condições basais, o NO endógeno possui uma ação excitatória sobre os NPGS. Em outro estudo realizado em coelhos anestesiados com pentobarbital sódico (Hakin e cols. 1995), nos quais o L-NAME foi administrado na medula espinhal torácica (T10-T12) promoveu uma redução da atividade do nervo simpático renal, as observações estão em concordância com a hipótese de Lee e cols (1996), que o NO exerce uma ação excitatória sobre os neurônios pré-ganglionares simpáticos renais de coelhos anestesiados. Assim,

o NO estaria atuando na manutenção da atividade tônica dos NPGS renais em condições basais (Hakim e cols. 1995). Entretanto, os resultados do presente estudo estão de acordo com a maior parte das evidências encontradas na literatura, as quais indicam um papel inibitório do NO sobre os NPGS (Chen & Shyr, 2005). Estudo realizado em ratos anestesiados com pentobarbital sódico, no qual L-NAME foi administrado, também, por via intratecal, foi observado um aumento da PAM e bradicardia (García e cols. 1997). Da mesma forma, Koga e cols (1999) observaram em ratos anestesiados com uretana um aumento da PAM após a administração intratecal de L-NAME.

Por outro lado, há relatos na literatura do papel inibitório do NO durante a administração intratecal de agonistas dos receptores NMDA, os quais provocaram um aumento da PAM em ratos anestesiados com pentobarbital sódico (Arnolda e cols. 2000). A co-administração L-NAME+NMDA potenciou a resposta pressora promovida pelo NMDA, enquanto que a administração de um doador de NO, cloreto de 3-morpholinylsydnoneimine (SIN-1), atenuou o aumento da PAM promovido pelo NMDA (Arnolda e cols. 2000). A ação do NO endógeno foi, também, examinada em estudo com ratos anestesiados com a mistura de uretana/ α cloralose, nos quais houve um aumento da PAM e da atividade do nervo simpático renal após a administração intratecal de glutamato. Quando um inibidor não seletivo da NOS, LNMMA (*N^G-Methyl-L-arginine acetate salt*), foi administrado, previamente, por via intratecal, a resposta pressórica promovida pelo glutamato foi potenciada (Yang e cols. 2004). Assim, estes autores sugeriram que a ativação dos neurônios simpáticos espinhais leva à liberação de NO, o qual reduz a excitabilidade simpática (Yang e cols. 2004). Em síntese, os estudos realizados em ratos anestesiados por Arnolda e cols (2000) e Yang e cols (2004),

também sugerem que o NO pode ter uma ação inibitória sobre a atividade simpática ao nível da medula espinhal.

É importante ressaltar que os resultados no presente estudo foram obtidos em animais acordados e, portanto, não apresentam os efeitos indesejáveis da anestesia. Estes resultados estão de acordo com aqueles obtidos por Feldman cols. (1996) e Lu e cols. (1999) realizados, também, em ratos acordados. Ressalta, ainda, que a dose de L-NAME utilizada no presente estudo foi idêntica à do trabalho de Feldman e cols. (1996), e que o aumento da PAM promovido pelo L-NAME intratecal no presente estudo foi muito semelhante à observada por estes autores.

Há, também, na literatura, evidências indiretas de uma modulação do NO sobre a atividade simpática. Assim, por meio de técnica de imuno-histoquímica foi avaliada a atividade da nNOS nos NPGS de ratos WKY e SHR, tendo sido observado que os ratos WKY apresentavam uma maior atividade da nNOS quando comparado aos ratos SHR (Powers-Martin e cols. 2006). Desse modo, foi sugerido que a menor atividade da nNOS poderia estar associada com o aumento da atividade simpática encontrada nos ratos SHR (Powers-Martin e cols. 2006).

Em síntese, os resultados obtidos no presente estudo estão de acordo com as evidências da literatura, tanto em ratos acordados quanto anestesiados, que receberam administração intratecal de L-NAME. Estes resultados indicam que o NO gerado, endogenamente, exerce um papel simpatoinibitório tônico, possivelmente, por uma ação inibitória sobre os NPGS.

A próxima etapa do presente trabalho foi examinar o mecanismo pelo qual o L-NAME intratecal produziu uma resposta pressórica. Como relatado anteriormente, há evidências na literatura que sugerem a existência de duas vias

diretas, pelas quais o NO modula a atividade neuronal: uma via dependente de GMPc e outra via que independe de GMPc (Ahern e cols. 2002; Davis e cols. 2001). Para avaliar se a resposta pressórica do L-NAME envolve, possivelmente, uma ação do NO dependente de GMPc, ou não, administrou-se por via intratecal o ODQ, um inibidor da enzima guanilato ciclase solúvel, que por sua vez é ativada pelo NO, e, a seguir converte GTP em GMPc.

O presente estudo foi o primeiro a administrar ODQ em ratos acordados, por via intratecal. O ODQ, *per se*, não promoveu alteração significativa na PAM e FC basais. Portanto, estes resultados indicam que o possível efeito inibitório tônico do NO sobre os NPGS, em condições basais, não depende de GCs/GMPc, uma vez que a administração intratecal do ODQ não alterou os valores basais de PAM e FC. As observações do presente estudo dão suporte, também, àquelas obtidas em ratos anestesiados, nos quais a administração de ODQ, por via intratecal, não promoveu alteração dos valores basais de PAM e FC (Malik e cols. 2007). Desta forma, Malik e cols. (2007) sugeriram que a GCs, possui uma baixa atividade sobre os NPGS em condições basais. Foi demonstrada, também, reduzida atividade basal da enzima GCs, *in vitro*, uma vez que a administração de ODQ não promoveu mudança significativa na corrente de fixação (*holding currents*) e na amplitude das correntes inibitórias pré-sinápticas dos NPGS estudados (Wu & Dun, 1996).

Existe, também, na literatura estudos das respostas da PAM e FC após a administração de outro inibidor da GCs, ou seja, o azul de metileno (Lee e cols. 1996; García e cols. 1997; García & Celuch, 2002). Entretanto, há limitações para o uso do azul de metileno como inibidor da GCs, uma vez que o mesmo pode inibir a síntese de NO por meio do bloqueio da NOS (Mayer e cols. 1993). Apesar

das limitações do uso do azul de metileno como inibidor seletivo da GCs, os resultados obtidos com este inibidor, mesmo em ratos anestesiados, são semelhantes ao do presente estudo. Lee e cols. (1996) e García & Celuch (2002) administraram intratecalmente azul de metileno em ratos anestesiados e não observaram alteração significativa da PAM e FC.

Portanto, os resultados obtidos no presente estudo em ratos acordados indicam que o papel simpatoinibitório tônico exercido pelo NO, endógeno, sobre os NPGS não é mediado pela GCs, uma vez que a inibição desta enzima pelo ODQ não alterou a PAM e FC, sugerindo, assim, que em condições de repouso a via NO/GMPc possui uma atuação pouco evidente.

A seguir, no presente estudo, avaliou o possível envolvimento dos receptores NMDA sobre o efeito inibitório do NO sobre os NPGS, como sugerido por García e cols. (1997) e Koga e cols. (1999) em ratos anestesiados.

Todavia, antes de se avaliar o papel do NO sobre os receptores NMDA foi examinada uma possível atividade tônica destes receptores sobre os NPGS. Assim, a administração intratecal de AP5 não promoveu alteração nos valores basais de PAM, mas provocou significativa redução da FC. Portanto, esta resposta sugere que, em condições basais, os receptores NMDA exercem uma modulação no tônus simpático cardíaco.

A hipótese de que os receptores NMDA participam da modulação do tônus simpático cardíaco é respaldada pelo estudo de Sundaram e cols. (1989) no qual injetou-se L-glutamato, ou agonistas dos receptores NMDA, no lado direito da coluna IML nos níveis T1-T3, e observou-se apreciável taquicardia e discreto aumento do índice de contratilidade cardíaca. Entretanto, quando injetou-se L-glutamato no lado esquerdo da coluna IML observou-se um significativo aumento

no índice de contratilidade cardíaca acompanhada de discreta taquicardia. Ainda neste estudo as respostas do L-glutamato e do NMDA foram bloqueadas, respectivamente, pela administração prévia de ácido glutâmico dietil éster (antagonista não seletivo dos aminoácidos excitatórios) e D-AP-7 (antagonista seletivo dos receptores NMDA). Assim, estes autores sugeriram que as microinjeções de L-glutamato ou agonistas NMDA, os quais estimulam, apenas, corpos neuronais (Zieglgangersberger & Puil, 1973), podem ser utilizados para a identificação dos neurônios que participam do controle simpático da medula espinhal (Sundaram e cols. 1989). Estas observações permitem sugerir que, a bradicardia observada no presente estudo, após a administração de AP5, foi mediada por neurônios simpáticos da medula espinhal.

Os resultados obtidos no presente estudo estão em desacordo com aqueles obtidos em ratos anestesiados com pentobarbital sódico, nos quais observou-se que a administração intratecal de um antagonista de receptores NMDA, AP5, promoveu redução da PAM sem alteração da FC (García e cols. 1997; García & Celuch 2002), enquanto que no presente estudo observou-se uma bradicardia. Todavia, a diferença entre os resultados do presente estudo e aqueles obtidos em ratos anestesiados pode ser em decorrência da anestesia, uma vez que há evidências na literatura de que a anestesia pode alterar os parâmetros cardiovasculares, e com isso, alterar, sensivelmente os resultados (Shimokawa e cols 1998).

Por outro lado, os resultados do presente estudo dão suporte, parcialmente, a observações prévias obtidas em ratos anestesiados com uretana, e que foram bilateralmente vagotomizados (Bazil & Gordon 1990,1991,1993). Nestes estudos a administração intratecal do antagonista dos receptores NMDA

(D-AP-7) promoveu redução da PAM, FC (Bazil & Gordon 1990,1991) e redução da atividade do nervo simpático esplâncnico (Bazil & Gordon 1993). Assim, os autores sugeriram que os receptores NMDA localizados nos NPGS e/ou nos interneurônios da medula espinhal participam da manutenção do tônus simpático para o coração e vasos sangüíneo. Entretanto, os resultados obtidos no presente estudo, em animais intactos (acordados), sugerem que os receptores NMDA participam, apenas, da modulação do tônus simpático para o coração. Portanto, a diferença entre os resultados do presente estudo e aqueles encontrados por Bazil & Gordon (1990, 1991) se deve, provavelmente, à influência da vagotomia e/ou anestesia, uma vez que, como mencionado anteriormente, esta última pode afetar, sensivelmente, as respostas cardiocirculatórias (Shimokawa e cols 1998).

Além disso, é importante destacar que há evidências provenientes de ratos acordados sugerindo que receptores de aminoácidos excitatórios modulam a atividade simpática ao nível da medula espinhal (Verberne e cols. 1990). Dentre os subtipos de receptores de aminoácidos excitatórios, existem relatos que sugerem a participação dos receptores não-NMDA (Wu e cols. 1997) e metabotrópicos glutamatérgicos (Li e cols. 1999; Celuch & García 2002), assim como do neurotransmissor noradrenérgico no controle do tônus simpático na medula espinhal (García & Celuch 2002).

Portanto, existe um conjunto de evidências, sugerindo que o glutamato exerce um papel excitatório na atividade simpática na medula espinhal, e que essa ação parece envolver receptores glutamatérgicos NMDA, não-NMDA e metabotrópicos, assim como, o neurotransmissor noradrenérgico.

Avaliou-se, a seguir, se o efeito inibitório do NO sobre os NPGS, em condições basais, se faz por meio dos receptores NMDA como sugeriram García

e cols. (1997) e Koga e cols. (1999). Para testar esta hipótese foi injetado L-NAME via intratecal e dez minutos após foi administrado AP5. O AP5 não atenuou o aumento da PAM promovido pelo L-NAME e nem na FC, a qual havia sido alterada pelo L-NAME. Estes resultados sugerem que, em ratos acordados, o efeito inibitório tônico da atividade dos NPGS, examinado por meio da resposta da PAM, não se faz por meio da atenuação de receptores NMDA.

Os resultados do presente estudo, em ratos acordados, não dão suporte àqueles obtidos em ratos anestesiados com uretana, nos quais a administração de AP5 foi capaz de inibir o aumento da PAM promovido pelo L-NAME (Koga e cols. 1999), o que levou os autores a sugerir que o L-NAME reduz o NO na medula espinhal excitando os neurônios simpáticos (Koga e cols. 1999). Vale ressaltar, também, que os resultados do presente estudo não confirmam aqueles obtidos em ratos anestesiados com pentobarbital sódico, onde também foi observado que a administração intratecal do antagonista dos receptores NMDA, AP5, inibiu o aumento da PAM promovido pela administração de L-NAME (García e cols. 1997). Existem evidências na literatura indicando que a produção de NO no SNC é dependente da ativação da nNOS, a qual é ativada pela ligação do glutamato aos receptores NMDA (Garthwaite e cols. 1988). Foi demonstrado que os NPGS, na medula espinhal, recebem estímulos excitatórios glutamatérgicos do RVLM (Bazil & Gordon, 1991), e que, estes estímulos excitatórios glutamatérgicos nos NPGS envolvem receptores NMDA (Bazil & Gordon, 1991). Assim, García e cols. (1997) sugeriram que os NPGS sintetizam e liberam o NO em resposta à ativação tônica dos receptores NMDA pelo glutamato. Entretanto, no presente estudo, o qual foi realizado em ratos acordados, o AP5 não alterou o aumento da PAM promovido pelo L-NAME sugerindo que o efeito inibitório do NO não deva

envolver os receptores NMDA. Entende-se, portanto, que há necessidade de mais estudos com animais acordados com objetivo de se procurar compreender em que tipo de receptor o NO atua inibindo os NPGS.

Os protocolos utilizados no presente estudo, até o momento, procuraram avaliar o papel do NO na modulação da atividade simpática basal. A seguir, examinou-se o papel do NO na modulação da atividade simpática, por meio das respostas de PAM e FC, decorrentes da administração intratecal do precursor do NO, ou seja, a L-arginina.

No presente estudo a L-arginina provocou uma redução da PAM e FC. Estas respostas dão suporte ao papel inibitório do NO na medula espinhal, possivelmente, sobre os NPGS. Estes resultados estão de acordo com estudo de NPGS "*in vitro*", no qual o NO promoveu um aumento na amplitude da corrente inibitória pré-sináptica, possivelmente, por meio da liberação de glicina via mecanismo dependente de GMPc (Wu & Dun, 1996). Entretanto, há evidências "*in vitro*" mostrando que o NO pode aumentar a amplitude da corrente excitatória pré-sináptica de NPGS, possivelmente, por mecanismo dependente de GMPc (Wu e cols. 1997). Os resultados do presente estudo estão de acordo, ainda, com aqueles obtidos em ratos anestesiados, nos quais observou-se que a administração intratecal de L-arginina provocou redução da PAM, FC (García e cols. 1997) e da atividade do nervo simpático renal (Yang e cols. 2004). Entretanto, a administração de nitruprussiato de sódio provocou queda da PAM seguida de uma posterior elevação. Além disso, a resposta do nitruprussiato de sódio foi abolida pela administração prévia, do inibidor da GCs, ou seja, o azul de metileno (Garcia e cols. 1997). Assim, Garcia e cols. (1997) sugeriram que o NO endógeno possui uma ação inibitória, mas a resposta bifásica observada após a

administração de nitruprussiato de sódio sugere que o NO na medula espinhal pode ter uma ação excitatória, ou inibitória, dependente da ativação da GCs. Desta forma, estudos *in vivo* e *in vitro* permitem sugerir que o NO desenvolve uma ação excitatória, ou inibitória. Todavia, nas condições experimentais do presente estudo (ratos acordados), quando a administração de L-arginina deve ter ativado a geração de NO endógeno, observou-se, com base na queda da PAM e FC, uma ação inibitória do NO, possivelmente, sobre os NPGS. Por outro lado, os resultados do presente estudo não dão suporte às observações prévias em ratos anestesiados, nos quais o nitruprussiato de sódio foi administrado por via intratecal (Lee e cols. 1996) e L-arginina (Malik e cols. 2007), e promoveu um aumento da PAM. Assim, estes autores sugeriram que o NO tem um papel tônico excitatório na regulação PAM na medula espinhal. A diferença entre os resultados do presente estudo e aqueles observados por Lee e cols. (1996) e Malik e cols. (2007) pode ser em decorrência da anestesia, a qual, como ressaltado anteriormente, pode alterar, significativamente, as respostas dos parâmetros cardiovasculares (Shimokawa e cols 1998). Assim, apesar de existirem evidências “*in vitro*” e “*in vivo*” (animais anestesiados) sugerindo uma ação excitatória do NO na medula espinhal, os resultados do presente estudo, e de outros laboratórios, realizados em animais acordados (Feldman e cols. 1996; Lu e cols. 1999) indicam um efeito inibitório do NO sobre os NPGS na medula espinhal.

O fato de que as evidências “*in vitro*” e em animais anestesiados são pouco conclusivas quanto à atuação do NO nos NPGS da medula espinhal, isso faz com que os resultados obtidos no presente estudo, e juntamente com os de outros laboratórios (Feldman e cols. 1996; Lu e cols. 1999), realizados em animais

acordados, atribuem ao NO uma ação inibitória sobre os NPGS da medula espinhal.

Como relatado anteriormente, o NO possui duas principais via de atuação (Ahern e cols. 2002; Davis e cols. 2001): 1) dependente de GMPc; 2) independente de GMPc. Assim, a próxima etapa deste trabalho foi avaliar por meio de qual via o NO modulou as respostas hemodinâmicas (PAM e FC) após a administração de L-arginina por via intratecal. Para isso, fez-se a administração do inibidor da GCs, ODQ, previamente à administração do de L-arginina intratecal. O ODQ bloqueou, totalmente, a queda da PAM promovida pela L-arginina, mas, bloqueou, parcialmente, a queda na FC promovida pela L-arginina. Assim, os resultados do presente estudo indicam que a hipotensão promovida pela administração de L-arginina intratecal envolveu, possivelmente, a ativação da GCs, enquanto que a bradicardia causada pela L-arginina, e que foi parcialmente atenuada pelo ODQ, parece envolver a via dependente de GMPc e outra via independente de GMPc, possivelmente, o mecanismo de S-nitrosilação.

Foi mencionado, anteriormente, na presente discussão, que a administração de AP5 provocou uma redução na FC, indicando que os receptores NMDA têm um papel importante na modulação do tônus simpático cardíaco. Existem relatos sugerindo que o NO modula os receptores NMDA por um mecanismo não dependente de GMPc, denominado S-nitrosilação (Lei e cols. 1992; Davis e cols. 2001; Ahern e cols. 2002). Assim, a tendência à bradicardia observada após a administração de ODQ+L-ARG pode ter sido devido à ação do NO pelo mecanismo de S-nitrosilação sobre os receptores NMDA, os quais regulam o tônus simpático cardíaco.

Os resultados do presente estudo são semelhantes àqueles observados em ratos anestesiados (García e cols. 1997), nos quais a administração de L-arginina via intratecal promoveu redução da PAM e FC. Quando o azul de metileno, inibidor da GCs, foi administrado via intratecal, previamente à administração de L-arginina, observou-se uma atenuação da resposta hipotensiva. Vale ressaltar que não houve relato de nenhuma resposta do azul de metileno sobre a FC (García e cols. 1997). Os resultados do presente estudo estão de acordo, também, com aqueles obtidos em NPGS *in vitro* (Wu & Dun, 1996), os quais mostraram que a L-arginina aumentou a amplitude da corrente pós-sináptica inibitória, resposta esta que foi inibida pela administração de ODQ, sugerindo, assim, que, a ação inibitória do NO sobre os NPGS foi dependente de GMPc (Wu & Dun, 1996).

Portanto, os resultados do presente trabalho indicam que a hipotensão promovida pela administração intratecal de L-arginina depende de GMPc, enquanto que a redução da FC parece envolver uma via dependente de GMPc e uma independente de GMPc, possivelmente, através do mecanismo de S-nitrosilação.

Assim, os resultados obtidos neste estudo mostraram que a administração intratecal de L-NAME promoveu aumento da PAM, sugerindo que o NO tem um efeito inibitório tônico sobre os NPGS. Além disso, a inibição dos NPGS em ratos acordados parece não se dar por meio de receptores NMDA, uma vez que a administração intratecal de AP5 não inibiu o aumento da PAM promovida pelo L-NAME intratecal. Pode se concluir, ainda, que, em condições basais, a via NO/GMPc não exerce um papel modulatório no tônus simpático tão evidente, uma vez que a administração intratecal de ODQ não alterou os valores basais de PAM

e FC. Todavia, numa situação onde a síntese de NO está aumentada, devido à administração exógena, intratecal, de L-arginina, a resposta hipotensora foi dependente de GMPc, enquanto que a resposta bradicárdica foi, aparentemente, dependente das duas principais vias de atuação do NO.

6. Conclusões

- O NO atua como neuromodulador inibitório tônico, possivelmente, sobre NPGS;
 - A simpatoinibição promovida pelo NO parece não envolver receptores NMDA;
 - A resposta hipertensora após administração intratecal de L-NAME, em ratos acordados, parece não ser dependente do GMPc;
 - A resposta hipotensora observada após a estimulação da síntese de óxido nítrico, pela administração de L-arginina intratecal, foi dependente de GMPc, enquanto que a resposta bradicárdica foi parcialmente dependente de GMPc.
-

7.Referências Bibliográficas

AHERN, G. P; KLYACHKO, V. A; JACKSON, M. B. cGMP and s-nitrosylation; two routes for modulation of neuronal excitability by NO review. *Trends Neuroscience* 25: 510-517, 2002.

ANDERSON, C. R. NAPDH diaphorase-positive neurons in the rat spinal cord include a subpopulation of autonomic preganglionic neurons. *Neuroscience Letters*. 139:280-284, 1992.

ARNOLDA, L. F; MCKITRICK, D. J; LLEWELLYN-SMITH, I. J; MINSON, J. B. Nitric oxide limits pressor responses to sympathetic activation in rat spinal cord. *Hypertension*. 36: 1089–1092, 2000.

BAZIL, M. K; GORDON, F. J. Blockade of parabrachial pressor responses by spinal administration of an N-methyl-D-aspartic acid receptor antagonist. *Neuropharmacology*. 29/10: 923-930, 1990.

BAZIL, M. K; GORDON, F. J. Spinal NMDA receptors mediate pressor response evoked from the rostral ventrolateral medulla. *Am. J. Physiol.* 206 (Heart Circ. Physiol. 29): H267-H275, 1991.

BAZIL, M. K; GORDON, F. J. Sympathoexcitation From the Rostral Ventrolateral Medulla is Mediated by Spinal NMDA Receptors. *Brain Research Bulletin*. 31: 273-278, 1993.

CALARESU, F. R; YARDLEY, C. P. Medullary basal sympathetic tone. *Annu. Rev. Physiol.* 50: 511-524, 1988.

CAO, W. H; MORRISON, S. F. Differential chemoreceptor reflex responses of adrenal preganglionic neurons. *Am J. Physiol. Regul. Integra. Comp. Physiol.* 281: R1825-1832, 2001.

CHAPLEAU, M. W; HAJDUCZOCK, G; ABBOUD, F. M. Mechanism of resetting of arterial baroreceptors: an overview. *Am J. Med. Sci.* 295:327-334, 1988.

CHEN, C. H; SHYR, M. H. Blockade of spinal nitric oxide synthase on blood pressure variability and hepatic microcirculation(Resumo). *Acta Anaesthesiol Taiwan* 43:67-72, 2005.

CELUCH, S. M; GARCÍA, M. DEL C. Activation of spinal metabotropic glutamate receptors elicits cardiovascular responses in pentobarbital anesthetized rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 366:343-349, 2002.

DAVIS, K. L; MARTIN, E; TURKO, I. V; MURAD, F. Novel effects of nitric oxide. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 41:203-36, 2001.

DIBONA, G. F; KOPP, U. C. Neural control of renal function. *Physiol. Rev.* 77: 75-197, 1997.

DUN, N.J; MO, N. Inhibitory postsynaptic potentials in neonatal rat sympathetic preganglionic neurones in vitro. *Journal Physiology.* 410: 267-281, 1989.

FELDMAN, D. S; TERRY JR., A. V; BUCCAFUSCO, J. J. Spinal muscarinic cholinergic and nitric oxide systems in cardiovascular regulation. *European Journal of Pharmacology.* 313: 211-220, 1996.

FÖRSTERMANN, U; KLEINERT, H. Nitric oxide synthase: expression and expressional control of the three isoforms. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 352: 351-364, 1995.

GANONG, W. F. *Fisiologia Médica.* Cap. 31, pag. 540, 22^a edição-Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil, 2006.

GARCÍA DEL C. M; CELUCH, S. M; ADLER-GRASCHINSKY, E. Possible participation of spinal nitric oxide in the control of the blood pressure in anesthetized rats. *Brain Research* 764:67-74, 1997.

GARCÍA DEL C. M; CELUCH, S. M. Participation of nitric oxide and N-methyl-D-aspartic acid receptors in the pressor response to intrathecal injected noradrenaline at the spinal cord of the rat. *Neuroscience Letters* 329:125-128, 2002.

GARTHWAITE, J; CHARLES, S. L; CHESS-WILLIAMS, R. Endothelium derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain. *Nature* 336: 385–388, 1988.

GARTHWAITE, J., Glutamate, nitric oxide and cell–cell signalling in the nervous system, *Trends Neurosci.* 14: 60–67, 1991.

GOLDSTEIN, D. S. Plasma catecholamines and essential hypertension. An analytical review. *Hypertension* 5: 86-99, 1983.

GUYENET, P. G. The sympathetic control of blood pressure *Nature Reviews/Neuroscience* 7(5): 335-346, 2006.

GUYENET, P. G; STORNETTA, R. L. The presympathetic cells of the rostral ventrolateral medulla (RVLM): Anatomy, Physiology and role in the control of circulation. Cap. 9, pag. 188, Livro – Neural Mechanisms of cardiovascular regulation, Dun, N. J; Machado, B. H; Pilowsky, P. M. Editora. Kluwer Academic Publishers 2004.

HAKIM, M. A; HIROOKA, Y; COLEMAN, M. J; BENNETT, M. R; DAMPNEY, R. A. L. Evidence for a critical role of nitric oxide in the tonic excitation of rabbit renal sympathetic preganglionic neurons. *Journal of Physiology* 482/2: 401-407, 1995.

JANIG, W; HABLER, H. J. Neurophysiological analysis of target-related sympathetic pathways-from animal to human: similarities and differences. *Acta Physiol. Scand.* 177: 255-274, 2003.

JANSEN, A. S; TER HORST; G. J; METTENLEITER, T. C; LOEWY, A. D. CNS cell groups projecting to the submandibular parasympathetic preganglionic neurons in the rat: a retrograde transneuronal viral cell body labeling study. *Brain Res.* 572: 253-260, 1992.

KIRCHHEIM, H. R. Systemic Arterial Baroreceptor Reflexes. *Physiological Reviews.* 56/1: 100-176, 1976.

KOGA, N; TAKANO, Y; HONDA, K; SAITO, R; KAMIYA, H. Roles of nitric oxide in the spinal cord in cardiovascular regulation in rats. *Neuroscience Letters.* 267:173-176, 1999.

KOIKE, M. K; MOREIRA, E. D; DA SILVA G. J; CONSOLIM-COLOMBO F. M; IDA, F; IRIGOYEN, M. C; KRIEGER E. M. Resetting of aortic baroreceptors in response to hypotension does not alter gain sensitivity. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 33:679-684, 2006.

KRIEGER, E. M. Time course of baroreceptor resetting in acute hypertension. *Am J Physiol.* 218:486-490, 1970.

KRIEGER, E. M; SALGADO, H. C; MICHELINI, L. C. Resetting of the baroreceptors. Em: International Review of Physiology, ed. Guyton AC, Hall JE 26: 119-146, University Park Press, Baltimore, 1982.

KRUMENACKER, J. S; HANAFY, K. A; MURAD, F. Regulation of nitric oxide and soluble guanylyl cyclase. Brain Research Bulletin. 62:Issue 6: 505-515, 2004.

LEE, S. B; KOH, H. C; KIM, O. N; SUNG, K. W; KIM, S. Y. Intrathecal administration of sodium nitroprusside, a nitric oxide donor, increases blood pressure in anesthetized rats. Neurosci. Lett. 203: 53–56, 1996.

LEI, S. Z; PAN, Z; AGGARWAL, S. K; CHEN, H. V; HARTMAN, J; SUCHER, N. J; LIPTON, S. A. Effect of nitric oxide production on the redox modulatory site of the NMDA receptor-channel complex. Neuron. 8:1087-1099, 1992.

LI, X. C; BEART, P. M; MONN, J. A; JONES, N. M; WIDDOP, R. E. Type I and II metabotropic glutamate receptor agonists and antagonists evoke cardiovascular effects after intrathecal administration in conscious rats. British Journal of Pharmacology. 128: 823-829, 1999.

LU, P; SHEE, J; CHEN, H; LIN, C; SHYR, M. Spinal nitric oxide participates in the control of the blood pressure during graded hemorrhage in the conscious rat (Resumo). Shock. 12:222-226, 1999.

MALIK, V; HOLOBOTOVSKYY, V. V; PHILLIPS J. K; MCKITRICK, D. J; ARNOLDA, L. F. Intrathecal cGMP elicits pressor responses and maintains mean blood pressure during haemorrhage in anaesthetized rats. Journal of Physiology. 581/2: 543-552, 2007.

MARLETTA, M. A. Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis. *Cell*. 78(6): 927-30, 1994.

MAYER, B; BRUNNER, F. S; SCHMIDT, K. Inhibition of nitric oxide synthesis by Methylene blue. *Biochem. Pharmacol.* 45: 367-374, 1993.

PALMER, R. M. J; FERRIGE, A. G; MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*. 327: 524-526, 1987.

PETRAS, J. M; CUMMING, J. F. Autonomic neurons in the spinal Cord of the Rhesus monkey: a correlation of the findings of cytoarchitectonics and sympathectomy with fiber degeneration following dorsal rhizotomy. *J. Comp. Neurol.* 146: 189-218, 1972.

PERSSON, P. B. Modulation of cardiovascular control mechanisms and their interaction. *Physiol Rev.* 76:193-244, 1996.

POWERS-MARTIN, K; MCKITRICK, J. D; ARNOLDA, L. F; PHILLIPS, J. K. Distinct Subpopulations of Cyclic Guanosine Monophosphate (cGMP) and Neuronal Nitric Oxide Synthase (nNos) Containing Sympathetic Preganglionic Neurons in Spontaneously Hypertensive and Wistar-Kyoto Rats. *The Journal of Comparative Neurology*. 497:566-574 2006.

PRADO, W. A. Antinociceptive potency of intrathecal morphine in the rat tail flick test: a comparative study using acute lumbar catheter in rats with or without a chronic atlanto-occipital catheter. *Journal of Neuroscience Methods*. 129: 33-39, 2003.

SHEPERD, J. T. Neurohumoral regulation. In: The human cardiovascular system, edited by Sheperd J.T. New York: Raven Press. 107-155, 1980.

SHIMOKAWA, A; KUNITAKE, T; TAKASAKI, M; KANNAN, H. Differential effects of anesthetics on sympathetic nerve activity and arterial baroreceptor reflex in chronically instrumented rats. *Journal of the Autonomic Nervous System*. 72: 46-54, 1998.

STORKSON, R. V; KJORSVIK, A; TJOLSEN, A; HOLE K. Lumbar catheterization of the spinal subarachnoid space in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*. 65: 167-172, 1996.

STRACK, A. M; SAWYER, W. B; MARUBIO, L. M; LOWEY, A. D. Spinal origin of sympathetic preganglionic neurons in the rat. *Brain Research*. 455:187-191, 1988.

STRACK, A. M; SAWYER, W. B; HUGHES, J. H; PLATT, K. B; LOEWY, A. D. A general pattern of CNS innervation of the sympathetic outflow demonstrated by transneuronal pseudorabies viral infections. *Brain Research*. 491: 156-162, 1989.

STRACK, A. M; LOEWY, A.D. Pseudorabies virus: a highly specific transneuronal cell body marker in the sympathetic nervous system. *Journal Neuroscience*. 10: 2139-2147, 1990.

SUNDARAM, K; MURUGAIAN, J; SAPRU, H. Cardiac responses to the microinjections of excitatory amino acids into the intermediolateral cell column of the rat spinal cord. *Brain Research*. 482:12-22, 1989.

VERBENE, A. J. M; WIDDOP, R. E. W; MACARRONE, C; JARROTT, B; BEART, P. M; LOUIS, W. J. Intrathecal kynurenate reduces arterial pressure, heart rate and baroreceptor-heart rate reflex in conscious rats. 114:309-315, 1990.

VICENTE, S. R. Nitric oxide: a radical neurotransmitter in the central nervous system. *Prog. Neurobiol.* 42:129-160, 1994.

WU, S. Y; DUN, N. J; Potentiation of IPSCs by nitric oxide in immature rat sympathetic preganglionic neurones in vitro. *J. Physiol.* 495:469–490, 1996.

WU, S. Y; DUN, S. L; FÖRSTERMANN, U; DUN, N. J. Nitric oxide and excitatory postsynaptic currents in immature rat sympathetic pre-ganglionic neurons in vitro. *Neuroscience.* 79: 237–245, 1997.

YAKSH, T. L; RUDY, T. A. Chronic Catheterization of the Spinal Subarachnoid Space. *Physiology & Behavior.* 17: 1031-1036, 1976.

YANG, Z; SMITH, L; COOTE, J. H. Paraventricular nucleus activation of renal sympathetic neurons is synaptically depressed by nitric oxide and glycine acting at a spinal level. *Neuroscience.* 124:421-428, 2004.

ZIEGLGANGSBERGER, W; PUIL, E. A. Actions of glutamic acid on spinal neurons. *Exp. Brain Research.* 17:35-49, 1973.

8. Apêndice

Tabela I: Valores individuais da pressão arterial média (mmHg) à administração intratecal de D-NAME.

	Basal	2 min	4 min	6min	8 min	10 min
1	91	97	97	95	94	94
2	110	112	111	111	114	111
3	106	113	113	111	112	110
4	96	99	96	95	97	98
5	88	88	86	86	85	85
6	109	109	108	106	106	106
7	104	103	101	100	101	102
Média	101	103	102	101	101	101
EPM	3	3	4	4	4	4

Tabela II: Valores individuais de variação da pressão arterial média (Δ PAM; mmHg) à administração intratecal de D-NAME.

	Basal	2 min	4 min	6min	8 min	10 min
1	91	6	6	4	3	3
2	110	2	1	1	4	1
3	106	7	7	5	6	4
4	96	3	0	-1	1	2
5	88	0	-2	-2	-3	-3
6	109	0	-1	-3	-3	-3
7	104	-1	-3	-4	-3	-2
Média	101	2	1	0	1	0
EPM	3	1	1	1	1	1

Tabela III: Valores individuais de frequência cardíaca (FC; bpm) à administração intratecal de D-NAME.

	Basal	2 min	4 min	6 min	8 min	10 min
1	382	399	396	393	395	393
2	380	376	375	365	387	390
3	362	380	374	371	370	369
4	370	392	361	365	376	391
5	360	398	382	364	358	360
6	394	410	406	400	399	402
7	399	385	384	385	377	379
Média	378	391	383	378	380	383
EPM	6	5	6	6	5	6

Tabela IV: Valores individuais de variação da frequência cardíaca (Δ FC; bpm) à administração intratecal de D-NAME.

	Basal	2 min	4 min	6 min	8 min	10 min
1	382	17	14	11	13	11
2	380	-4	-5	-15	7	10
3	362	18	12	9	8	7
4	370	22	-9	-5	6	21
5	360	38	22	4	-2	0
6	394	16	12	6	5	8
7	399	-14	-15	-14	-22	-20
Média	378	13	4	-1	2	5
EPM	6	6	5	4	4	5

Tabela V: Valores individuais da pressão arterial média (mmHg) à administração intratecal de L-NAME.

	Basal	2 min	4 min	6min	8 min	10 min
1	91	101	104	101	100	99
2	107	119	125	124	122	121
3	101	115	115	110	109	110
4	113	113	115	118	117	120
5	99	103	102	101	104	111
6	98	101	104	105	104	105
Média	102	109	111	110	109	111
EPM	1	1	2	2	1	1

Tabela VI: Valores individuais de variação da pressão arterial média (Δ PAM; mmHg) à administração intratecal de L-NAME.

	Basal	2 min	4 min	6min	8 min	10 min
1	91	10	13	10	9	8
2	107	12	18	17	15	14
3	101	14	14	9	8	9
4	113	0	2	5	4	7
5	99	4	3	2	5	12
6	98	3	6	7	6	7
Média	102	7	9	8	8	10
EPM	3	2	3	2	2	1

Tabela VII: Valores individuais da frequência cardíaca (FC; bpm) à administração intratecal de L-NAME.

	Basal	2 min	4 min	6 min	8 min	10 min
1	402	415	407	402	400	400
2	378	369	379	389	384	385
3	385	392	398	399	387	401
4	370	367	367	351	346	331
5	342	344	344	338	355	394
6	400	401	387	394	375	410
Média	380	381	380	379	375	387
EPM	4	4	4	5	3	5

Tabela VIII: Valores individuais de variação da frequência cardíaca (Δ FC; bpm) à administração intratecal de L-NAME.

	Basal	2 min	4 min	6 min	8 min	10 min
1	402	13	5	0	-2	-2
2	378	-9	1	11	6	7
3	385	7	13	14	2	16
4	370	-3	-3	-19	-24	-39
5	342	2	2	-4	13	52
6	400	1	-13	-6	-25	10
Média	380	2	1	-1	-5	7
EPM	9	3	4	5	6	12

Tabela IX: Valores individuais da pressão arterial média (mmHg) à administração intratecal de DMSO.

	Basal	3 min	6 min	9 min	12 min	15 min	18 min	21min	24 min	27 min	30 min
1	110	113	116	111	111	113	116	112	112	113	114
2	100	107	103	103	106	106	107	107	108	107	107
3	105	109	106	107	105	105	105	109	106	105	112
4	99	102	101	101	102	103	104	105	103	104	105
5	104	105	103	100	99	99	102	100	101	103	105
6	108	91	86	87	95	80	88	99	94	87	89
Média	104	105	103	102	103	101	104	105	104	103	105
EPM	2	3	4	3	2	5	4	2	3	4	4

Tabela X: Valores individuais de variação da pressão arterial média (Δ PAM; mmHg) à administração intratecal de DMSO.

	Basal	3 min	6 min	9 min	12 min	15 min	18 min	21min	24 min	27 min	30 min
1	110	3	6	1	1	3	6	2	2	3	4
2	100	7	3	3	6	6	7	7	8	7	7
3	105	4	1	2	0	0	0	4	1	0	7
4	99	3	2	2	3	4	5	6	4	5	6
5	104	1	-1	-4	-5	-5	-2	-4	-3	-1	1
6	108	-17	-22	-21	-13	-28	-20	-9	-14	-21	-19
Média	104	0	-2	-3	-1	-3	-1	1	0	-1	1
EPM	2	4	4	4	3	5	4	3	3	4	4

Tabela XI: Valores individuais de frequência cardíaca (FC; bpm) à administração intratecal de DMSO.

	Basal	3 min	6 min	9 min	12 min	15min	18 min	21 min	24 min	27 min	30min
1	385	368	380	372	363	374	383	366	368	372	375
2	396	408	399	392	399	403	400	397	408	401	402
3	361	354	363	364	362	353	361	363	358	365	362
4	383	395	373	364	369	382	391	396	404	419	428
5	395	403	398	402	386	389	383	382	386	364	365
6	367	378	395	389	387	393	398	419	418	405	411
Média	381	384	385	381	378	382	386	387	390	388	391
EPM	6	9	6	7	6	7	6	9	10	10	11

Tabela XII: Valores individuais de variação da frequência cardíaca (Δ FC; bpm) à administração intratecal de DMSO.

	Basal	3 min	6 min	9 min	12 min	15min	18 min	21 min	24 min	27 min	30min
1	385	-17	-5	-13	-22	-11	-2	-19	-17	-13	-10
2	396	12	3	-4	3	7	4	1	12	5	6
3	361	-7	2	3	1	-8	0	2	-3	4	1
4	383	12	-10	-19	-14	-1	8	13	21	36	45
5	395	8	3	7	-9	-6	-12	-13	-9	-31	-30
6	367	11	28	22	20	26	31	52	51	38	44
Média	381	3	4	-1	-4	1	5	6	9	7	9
EPM	6	5	5	6	6	6	6	10	10	11	12

Tabela XIII: Valores individuais da pressão arterial média (mmHg) à administração intratecal de ODQ.

	BASAL	3 min	6 min	9 min	12 min	15 min	18 min	21min	24 min	27 min	30 min
1	115	119	117	120	121	120	118	119	120	118	118
2	103	106	106	107	105	106	106	110	113	109	106
3	107	101	100	100	102	104	106	104	101	100	100
4	96	102	101	101	101	100	100	99	100	98	98
5	118	117	116	117	117	117	116	114	114	113	113
6	113	113	108	108	109	108	109	104	105	109	109
7	101	103	101	102	106	110	107	103	101	102	100
Média	108	109	107	108	109	109	109	108	108	107	106
EPM	3	3	3	3	3	3	2	3	3	3	3

Tabela XIV: Valores individuais de variação da pressão arterial média (Δ PAM; mmHg) à administração intratecal de ODQ.

	BASAL	3 min	6 min	9 min	12 min	15 min	18 min	21min	24 min	27 min	30 min
1	115	4	2	5	6	5	3	4	5	3	3
2	103	3	3	4	2	3	3	7	10	6	3
3	107	-6	-7	-7	-5	-3	-1	-3	-6	-7	-7
4	96	6	5	5	5	4	4	3	4	2	2
5	118	-1	-2	-1	-1	-1	-2	-4	-4	-5	-5
6	113	0	-5	-5	-4	-5	-4	-9	-8	-4	-4
7	101	2	0	1	5	9	6	2	0	1	-1
Média	108	1	-1	0	1	2	1	0	0	-1	-1
EPM	3	1	2	2	2	2	1	2	2	2	2

Tabela XV: Valores individuais de frequência cardíaca (FC; bpm) à administração intratecal de ODQ.

	Basal	3 min	6 min	9 min	12 min	15min	18 min	21 min	24 min	27 min	30min
1	372	377	381	387	386	388	387	385	385	386	383
2	341	354	356	360	354	351	345	350	354	357	355
3	442	449	438	451	443	466	482	431	412	428	410
4	400	394	370	383	386	381	374	362	366	373	390
5	421	414	413	424	418	415	420	415	430	426	410
6	384	370	359	361	361	373	361	364	363	364	356
7	343	345	339	336	364	372	375	349	345	345	340
Média	386	386	379	386	387	392	392	379	379	383	378
EPM	14	14	13	15	12	14	17	12	12	12	11

Tabela XVI: Valores individuais de variação da frequência cardíaca (Δ FC; bpm) à administração intratecal de ODQ.

	Basal	3 min	6 min	9 min	12 min	15min	18 min	21 min	24 min	27 min	30min
1	372	5	9	15	14	16	15	13	13	14	11
2	341	13	15	19	13	10	4	9	13	16	14
3	442	7	-4	9	1	24	40	-11	-30	-14	-32
4	400	-6	-30	-17	-14	-19	-26	-38	-34	-27	-10
5	421	-7	-8	3	-3	-6	-1	-6	9	5	-11
6	384	-14	-25	-23	-23	-11	-23	-20	-21	-20	-28
7	343	2	-4	-7	21	29	32	6	2	2	-3
Média	386	0	-7	0	1	6	6	-7	-7	-3	-8
EPM	14	4	6	6	6	7	10	7	8	6	7

Tabela XVII: Valores individuais da pressão arterial média (mmHg) à administração intratecal de aCSF.

	BASAL	2 min	4 min	6 min	8 min	10 min
1	100	104	105	101	101	102
2	96	93	94	94	93	98
3	98	100	100	97	98	98
4	98	105	110	105	104	103
5	105	108	108	107	105	107
6	96	96	94	95	94	94
7	109	109	108	111	113	113
Média	100	102	103	101	101	102
EPM	2	2	2	2	2	2

Tabela XVIII: Valores individuais de variação da pressão arterial média (Δ PAM; mmHg) à administração intratecal de aCSF.

	Basal	2 min	4 min	6 min	8 min	10 min
1	100	4	5	1	1	2
2	96	-3	-2	-2	-3	2
3	98	2	2	-1	0	0
4	98	7	12	7	6	5
5	105	3	3	2	0	2
6	96	0	-2	-1	-2	-2
7	109	0	-1	2	4	4
Média	100	2	2	1	1	2
EPM	2	1	2	1	1	1

Tabela XIX: Valores individuais de frequência cardíaca (FC; bpm) à administração intratecal de aCSF.

	Basal	2 min	4 min	6 min	8 min	10min
1	403	417	426	418	408	406
2	390	371	375	379	391	392
3	404	403	399	399	397	392
4	399	413	433	418	417	418
5	347	353	344	349	358	360
6	354	363	356	353	351	349
7	356	337	349	362	372	363
Média	379	380	383	383	385	383
EPM	10	12	14	11	9	10

Tabela XX: Valores individuais de variação da frequência cardíaca (Δ FC; bpm) à administração intratecal de aCSF.

	Basal	2 min	4 min	6 min	8 min	10min
1	403	14	23	15	5	3
2	390	-19	-15	-11	1	2
3	404	-1	-5	-5	-7	-12
4	399	14	34	19	18	19
5	347	6	-3	2	11	13
6	354	9	2	-1	-3	-5
7	356	-19	-7	6	16	7
Média	379	1	4	4	6	4
EPM	10	5	7	4	4	4

Tabela XXI: Valores individuais da pressão arterial média (mmHg) à administração intratecal de AP5.

	Basal	2 min	4 min	6 min	8 min	10 min
1	114	108	109	109	107	107
2	93	92	91	91	92	91
3	109	107	105	105	105	106
4	96	99	99	99	99	100
5	92	89	89	89	89	90
6	95	97	98	99	102	103
Média	100	99	99	99	99	100
EPM	4	3	3	3	3	3

Tabela XXII: Valores individuais de variação da pressão arterial média (Δ PAM; mmHg) à administração intratecal de AP5.

	Basal	2 min	4 min	6 min	8 min	10 min
1	114	-6	-5	-5	-7	-7
2	93	-1	-2	-2	-1	-2
3	109	-2	-4	-4	-4	-3
4	96	3	3	3	3	4
5	92	-3	-3	-3	-3	-2
6	95	2	3	4	7	8
Média	100	-1	-1	-1	-1	0
EPM	4	1	1	2	2	2

Tabela XXIII: Valores individuais de frequência cardíaca (FC; bpm) à administração intratecal de AP5.

	Basal	2 min	4 min	6 min	8 min	10 min
1	376	362	360	359	356	359
2	326	327	321	322	323	324
3	337	315	310	314	326	316
4	337	324	323	329	340	325
5	380	381	385	382	391	394
6	395	349	353	356	361	363
Média	359	343	342	344	350	347
EPM	12	10	12	11	10	12

Tabela XXIV: Valores individuais de variação da frequência cardíaca (Δ FC; bpm) à administração intratecal de AP5.

	Basal	2 min	4 min	6 min	8 min	10min
1	376	-14	-16	-17	-20	-17
2	326	1	-5	-4	-3	-2
3	337	-22	-27	-23	-11	-21
4	337	-13	-14	-8	3	-12
5	380	1	5	2	11	14
6	395	-46	-42	-39	-34	-32
Média	359	-16	-17	-15	-9	-12
EPM	12	7	7	6	7	7

Tabela XXV: Valores individuais da pressão arterial média (mmHg) à administração de L-NAME seguido de AP5.

	L-NAME						AP5				
	Basal	-6 min	-3 min	0 min	3 min	6 min	9 min	12min	15 min	18 min	21 min
1	113	113	117	119	121	119	119	122	125	123	121
2	99	103	101	106	106	106	105	104	103	101	103
3	98	102	105	104	105	109	105	106	106	104	104
4	91	102	102	99	98	98	96	98	97	100	97
5	101	114	112	109	107	110	111	109	108	113	111
6	107	121	124	121	115	117	113	110	109	105	109
Média	102	109	110	110	109	110	108	108	108	108	108
EPM	3	3	4	4	3	3	3	3	4	4	3

Tabela XXVI: Valores individuais de variação da pressão arterial média (Δ PAM; mmHg) à administração intratecal de L-NAME seguido de AP5.

	L-NAME						AP5				
	Basal	-6 min	-3min	0 min	3 min	6 min	9 min	12min	15 min	18 min	21 min
1	113	0	4	6	8	6	6	9	12	10	8
2	99	4	2	7	7	7	6	5	4	2	4
3	98	4	7	6	7	11	7	8	8	6	6
4	91	11	11	8	7	7	5	7	6	9	6
5	101	13	11	8	6	9	10	8	7	12	10
6	107	14	17	14	8	10	6	3	2	-2	2
Média	102	8	9	8	7	8	7	7	7	6	6
EPM	3	2	2	1	0	1	1	1	1	2	1

Tabela XXVII: Valores individuais de frequência cardíaca (FC; bpm) à administração intratecal de L-NAME seguido de AP5.

	L-NAME						AP5				
	BASAL	-6 min	-3 min	0 min	3 min	6 min	9 min	12 min	15min	18 min	21 min
1	370	366	358	334	375	343	347	371	364	330	347
2	342	343	338	368	372	366	383	390	350	359	363
3	400	400	388	392	390	352	375	388	392	403	398
4	402	413	402	400	394	395	390	395	397	404	394
5	385	394	399	393	411	407	420	417	419	421	407
6	378	371	386	385	386	371	384	399	393	369	397
Média	380	381	379	379	388	372	383	393	386	381	384
EPM	9	11	10	10	6	10	10	6	10	14	10

Tabela XXVIII: Valores individuais de variação da frequência cardíaca (Δ FC; bpm) à administração intratecal de L-NAME seguido de AP5.

	L-NAME						AP5				
	BASAL	-6 min	-3 min	0 min	3 min	6 min	9 min	12 min	15min	18 min	21 min
1	370	-4	-12	-36	5	-27	-23	1	-6	-40	-23
2	342	1	-4	26	30	24	41	48	8	17	21
3	400	0	-12	-8	-10	-48	-25	-12	-8	3	-2
4	402	11	0	-2	-8	-7	-12	-7	-5	2	-8
5	385	9	14	8	26	22	35	32	34	36	22
6	378	-7	8	7	8	-7	6	21	15	-9	19
Média	380	2	-1	-1	9	-7	4	14	6	2	5
EPM	9	3	4	8	7	11	12	10	7	10	8

Tabela XXXI: Valores individuais de frequência cardíaca (FC; bpm) à administração intratecal de D-Arginina.

	Basal	3 min	6 min	9 min	12 min	15min	18 min	21 min	24 min	27 min	30min
1	333	341	341	345	347	355	366	371	380	358	356
2	360	391	396	390	388	387	397	375	373	357	360
3	405	392	390	379	386	391	389	389	382	381	385
4	399	395	402	395	411	396	389	393	391	382	384
5	392	387	375	380	381	390	400	410	414	395	388
6	391	416	414	402	402	396	395	411	413	418	425
Média	380	387	386	382	386	386	389	392	392	382	383
EPM	11	9	10	8	8	6	5	6	7	9	9

Tabela XXXII: Valores individuais de variação da frequência cardíaca (Δ FC; bpm) à administração intratecal de D-Arginina.

	Basal	3 min	6 min	9 min	12 min	15min	18 min	21 min	24 min	27 min	30min
1	333	8	8	12	14	22	33	38	47	25	23
2	360	31	36	30	28	27	37	15	13	-3	0
3	405	-13	-15	-26	-19	-14	-16	-16	-23	-24	-20
4	399	-4	3	-4	12	-3	-10	-6	-8	-17	-15
5	392	-5	-17	-12	-11	-2	8	18	22	3	-4
6	391	25	23	11	11	5	4	20	22	27	34
Média	380	7	6	2	6	6	9	12	12	2	3
EPM	11	7	8	8	7	6	8	7	9	8	8

Tabela XXXIV: Valores individuais de variação da pressão arterial média (Δ PAM; mmHg) à administração intratecal de L-Arginina.

	Basal	3 min	6 min	9 min	12 min	15 min	18 min	21 min	24 min	27 min	30 min
1	108	-2	1	-4	-5	-5	-6	-8	-7	-8	-8
2	105	-7	-8	-8	-7	-12	-8	-7	-11	-9	-12
3	95	-1	-2	-3	-2	-5	-6	-7	-7	-7	-7
4	95	-1	0	-4	-3	-4	-3	-1	2	1	4
5	92	1	-4	-7	-12	-4	-4	-5	-5	-1	-1
6	112	-1	-5	-2	-3	-4	-4	-4	-5	-3	-7
Média	101	-2	-3	-5	-5	-6	-5	-5	-6	-5	-5
EPM	3	1	1	1	2	1	1	1	2	2	2

Tabela XXXV: Valores individuais de frequência cardíaca (FC; bpm) à administração intratecal de L-Arginina.

	Basal	3 min	6 min	9 min	12 min	15min	18 min	21 min	24 min	27 min	30min
1	395	366	363	362	356	370	360	365	364	367	373
2	424	417	397	412	432	402	425	395	423	396	399
3	361	331	333	321	324	321	332	326	330	319	320
4	417	401	393	403	390	385	391	401	390	394	400
5	393	384	391	363	366	347	344	343	340	337	328
6	388	383	382	381	379	387	383	382	387	375	382
Média	396	380	377	374	375	369	373	369	372	365	367
EPM	9	12	10	13	15	12	14	12	14	13	14

Tabela XXXVI: Valores individuais de variação da frequência cardíaca (Δ FC; bpm) à administração intratecal de L-Arginina.

	Basal	3 min	6 min	9 min	12 min	15min	18 min	21 min	24 min	27 min	30min
1	395	-29	-32	-33	-39	-25	-35	-30	-31	-28	-22
2	424	-7	-27	-12	8	-22	1	-29	-1	-28	-25
3	361	-30	-28	-40	-37	-40	-29	-35	-31	-42	-41
4	417	-16	-24	-14	-27	-32	-26	-16	-27	-23	-17
5	393	-9	-2	-30	-27	-46	-49	-50	-53	-56	-65
6	388	-5	-6	-7	-9	-1	-5	-6	-1	-13	-6
Média	396	-16	-20	-23	-22	-28	-24	-28	-24	-32	-29
EPM	9	5	5	5	7	6	8	6	8	6	9

Tabela XXXIX.A: Valores individuais de frequência cardíaca (FC; bpm) à administração intratecal de ODQ, seguido de L-ARGININA.

	ODQ			
	Basal	-6 min	-3 min	0 min
1	360	358	362	348
2	404	360	390	388
3	351	378	364	349
4	412	448	446	437
5	383	408	409	418
6	347	325	315	315
Média	376	380	381	376
EPM	11	18	18	19

Tabela XXXIX.B: Valores individuais de frequência cardíaca (FC; bpm) à administração intratecal de ODQ, seguido de L-ARGININA.

L-ARGININA									
3min	6min	9min	12min	15min	18min	21min	24min	27min	30min
352	368	367	361	353	359	365	365	352	343
416	404	372	361	360	350	362	357	367	400
373	340	353	362	341	352	354	332	334	342
406	402	407	398	414	403	387	413	412	387
391	410	401	401	414	407	398	389	384	377
325	315	315	318	319	320	326	322	323	324
377	373	369	367	367	365	365	363	362	362
14	16	14	12	16	14	10	14	13	12

Tabela XL.A: Valores individuais de variação da frequência cardíaca (Δ FC; bpm) à administração intratecal de ODQ, seguido de L-ARGININA.

	ODQ			
	BASAL	-6 min	-3 min	0 min
1	360	-2	2	-12
2	404	-44	-14	-16
3	351	27	13	-2
4	412	36	34	25
5	383	25	26	35
6	347	-22	-32	-32
Média	376	3	5	0
EPM	11	13	10	10

Tabela XL.B: Valores individuais de variação da frequência cardíaca (Δ FC; bpm) à administração intratecal de ODQ, seguido de L-ARGININA.

	L-ARGININA									
	3 min	6 min	9 min	12min	15min	18min	21min	24min	27min	30min
	-8	8	7	1	-7	-1	5	5	-8	-17
	12	0	-32	-43	-44	-54	-42	-47	-37	-4
	22	-11	2	11	-10	1	3	-19	-17	-9
	-6	-10	-5	-14	2	-9	-25	1	0	-25
	8	27	18	18	31	24	15	6	1	-6
	-22	-32	-32	-29	-28	-27	-21	-25	-24	-23
1	-3	-7	-9	-9	-11	-11	-13	-14	-14	-14
7	8	8	10	11	11	9	9	6	4	4

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](#)