

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
Fisiologia e Farmacologia**

TESE DE DOUTORADO

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA SUBSTÂNCIA P NA ÁREA BULBAR
VENTROLATERAL ROSTRAL DE RATOS NORMOTENSOS E
HIPERTENSOS**

Gisele Maia Etelvino Stefan

Orientadora: Professora Dra. Andréa Siqueira Haibara

Belo Horizonte-MG - 2008

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

GISELE MAIA ETELVINO STEFAN

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA SUBSTÂNCIA P NA ÁREA BULBAR
VENTROLATERAL ROSTRAL DE RATOS NORMOTENSOS E
HIPERTENSOS**

*Tese de Doutorado apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Ciências Biológicas em
Fisiologia e Farmacologia do Instituto de
Ciências Biológicas da Universidade Federal de
Minas Gerais, para a obtenção do Título de
Doutor em Ciências Biológicas.*

ORIENTADORA: Profa. Dra. ANDRÉA SIQUEIRA HAIBARA

**O temor do Senhor,
é o princípio do saber**
(Provérbios 1:7)

AGRADECIMENTOS

- A Deus por nos fornecer o caminho e a força para percorrê-lo.
- A Minha mãe e a meu pai pelo amor incondicional e companhia constante.
- Ao meu irmão pelo apoio.
- Ao meu marido Fischer pelo amor, apoio, compreensão e cumplicidade.
- A minha orientadora, Andréa, pela orientação, paciência e amizade.
- Aos meus irmãos de fé pela amizade e orações, em especial ao José Geraldo, Rose, Valdir e Cintia.
- Às minhas companheiras, as quais considero irmãs: Aline, Lenice, Marina e Tatiane.
- Aos professores do laboratório de Hipertensão: Robson, Maria José e Marco Antônio pela convivência agradável e amizade.
- Aos meus amigos especiais: Edson, Guilherme, Ana Paula Nadu, Cynthia, Soninha, Betinha, Ana Quênia, Renata Vieira, Fabiana, Rose, Kyan e Rodrigo.
- Ao Kinulpe e professor André que se dispuseram a me ajudar nos experimentos de Imunohistoquímica.
- Ao Zezé pelo apoio e ajuda.
- A todos os companheiros do laboratório de Hipertensão.
- A Celinha pela disposição de sempre ajudar-me e pela amizade.

ÍNDICE

RESUMO	1
ABSTRACT	3
INTRODUÇÃO	5
1- Substância P	7
2- Substância P e Reflexos Cardiovasculares	11
3- Substância P na RVLM e Reflexos Cardiovasculares	13
4- Substância P e Hipertensão	16
OBJETIVOS	19
MATERIAL E MÉTODOS	21
1- Animais	22
2- Implante de cânulas-guia em direção a RVLM	22
3- Canulação da artéria e veia femoral	23
4- Registro da pressão arterial e frequência cardíaca	24
5- Técnica para microinjeção de drogas na RVLM	24
6- Estimulação dos barorreceptores	25
7- Estimulação dos quimiorreceptores periféricos	25
8- Bloqueio dos componentes do Sistema Nervoso Autônomo	26
9- Drogas utilizadas	26
10- Histologia	27
11- Imunofluorescência de Receptores NK1 na RVLM	27
11.1-Técnica de Imunofluorescência para o receptor NK1 na RVLM	27

11.2-Identificação do receptor NK1 em neurônios catecolaminérgicos e gabaérgicos na RVLM	28
11.3-Análise das Imagens	29
11.4-Anticorpos utilizados	30
12- Imunohistoquímica de receptores NK1 na RVLM	30
12.1- Análise Imunohistoquímica	32
13- Análise estatística	32
14- Protocolos experimentais	32
14.1-Efeitos cardiovasculares induzidos pela microinjeção unilateral de doses crescentes do Fragmento N-terminal de Substância P [SP-(1-7)] na RVLM em ratos normotensos não-anestesiados	32
14.2-Efeitos cardiovasculares induzidos pela microinjeção unilateral de doses crescentes do Fragmento C-terminal de Substância P [SP-(5-11)] na RVLM em ratos normotensos não-anestesiados	33
14.3-Efeito do bloqueio do componente vagal sobre o aumento da sensibilidade do barorreflexo induzido pela microinjeção bilateral de Substância P na RVLM em ratos não-anestesiados	34
14.4-Efeito do bloqueio do componente simpático cardíaco sobre o aumento da sensibilidade do barorreflexo induzido pela microinjeção bilateral de Substância P na RVLM em ratos não-anestesiados	35
14.5-Efeito da microinjeção bilateral de Substância P na RVLM sobre as respostas cardiovasculares induzidas pela estimulação do barorreflexo em ratos espontaneamente hipertensos não-anestesiados	35
14.6-Efeito da microinjeção bilateral de Substância P na RVLM sobre as respostas cardiovasculares induzidas pela estimulação do quimiorreflexo em ratos espontaneamente hipertensos não-anestesiados	36
14.7-Efeito da microinjeção bilateral de CP 99,994 na RVLM sobre as respostas cardiovasculares induzidas pela estimulação do barorreflexo em ratos espontaneamente hipertensos não-anestesiados	37
14.8-Efeito da microinjeção bilateral de CP 99,994 na RVLM sobre as respostas cardiovasculares induzidas pela estimulação do quimiorreflexo em ratos espontaneamente hipertensos não-anestesiados	37
RESULTADOS	39

1-	Efeitos cardiovasculares induzidos pela microinjeção unilateral de doses crescentes do Fragmento N-terminal de Substância P [SP-(1-7)] na RVLM em ratos normotensos não-anestesiados	40
2-	Efeitos cardiovasculares induzidos pela microinjeção unilateral de doses crescentes do Fragmento C-terminal de Substância P [SP-(5-11)] na RVLM em ratos normotensos não-anestesiados	45
3-	Efeito do bloqueio do componente vagal sobre o aumento da sensibilidade do barorreflexo induzido pela microinjeção bilateral de Substância P na RVLM em ratos Wistar não anestesiados	49
4-	Efeito do bloqueio do componente simpático cardíaco sobre o aumento da sensibilidade do barorreflexo induzido pela microinjeção bilateral de Substância P na RVLM em ratos Wistar não-anestesiados	55
5-	Ensaio de Imunofluorescência do receptor de Substância P na RVLM	60
	5.1-Imunorreatividade para receptor NK1 na RVLM	60
	5.2-Identificação do tipo celular que expressa o receptor NK1 na RVLM	62
	5.3-Identificação de imunorreatividade para o receptor NK1 em neurônios gabaérgicos e catecolaminérgicos na RVLM	65
6-	Efeito da microinjeção bilateral de Substância P na RVLM sobre as respostas cardiovasculares induzidas pela estimulação do barorreflexo em ratos espontaneamente hipertensos não-anestesiados	68
7-	Efeito do bloqueio do componente vagal e simpático cardíaco sobre o aumento da sensibilidade do barorreflexo induzido pela microinjeção bilateral de Substância P na RVLM em ratos espontaneamente hipertensos	72
8-	Efeito da microinjeção bilateral de Substância P na RVLM sobre as respostas cardiovasculares induzidas pela estimulação do quimiorreflexo em ratos espontaneamente hipertensos não-anestesiados	76
9-	Efeito da microinjeção bilateral de CP 99,994 na RVLM sobre as respostas cardiovasculares induzidas pela estimulação do barorreflexo em ratos espontaneamente hipertensos não-anestesiados	80
10-	Efeito da microinjeção bilateral de CP 99,994 na RVLM sobre as respostas cardiovasculares induzidas pela estimulação do quimiorreflexo em ratos espontaneamente hipertensos não-anestesiados	85
11-	Análise Histológica dos sítios de microinjeção na RVLM	89
12-	Imunohistoquímica do receptor de Substância P na RVLM	91
	DISCUSSÃO	94
	SUMÁRIO E CONCLUSÕES	111
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	114
	APÊNDICE	128

RESUMO

Neste estudo investigamos em animais não-anestesiados: a) se o efeito bifásico sobre a pressão arterial da Substância P (SP) na área ventrolateral rostral do bulbo (RVLM) depende da formação de fragmentos N-terminal e C-terminal; b) o mecanismo pelo qual a SP modula os reflexos cardiovasculares na RVLM de ratos Wistar, através da análise da participação relativa dos componentes autonômicos simpático e parassimpático, e da identificação da localização do receptor da SP (receptor NK1) em vias catecolaminérgicas e gabaérgicas na RVLM por imunofluorescência; e ainda c) se a SP desempenha papel modulatório no controle reflexo cardiovascular em animais hipertensos, bem como a expressão dos receptores NK1 na RVLM desses animais. Para isso utilizamos ratos Wistar (290-310 g) e SHR (16 semanas) submetidos à cirurgia estereotáxica para implante de cânulas guias em direção a RVLM, e canulação da artéria e veia femoral, para registro dos parâmetros cardiovasculares e injeção sistêmica de drogas, respectivamente. Nossos resultados mostraram que o fragmento N-terminal da SP [SP-(1-7) 0,01; 0.5 e 1.0 nmol] promoveu apenas bradicardia (6 ± 3 vs. -10 ± 4 , -21 ± 4 e -30 ± 18 bpm) enquanto o fragmento C-terminal da SP [SP-(5-11) 0,01 e 1 nmol] promoveu aumento da pressão arterial (0.5 ± 1 vs. 27 ± 9 e 25 ± 9 mmHg) e bradicardia (2 ± 4 vs. -20 ± 6 e -21 ± 11 bpm). A ação facilitatória da SP sobre a bradicardia barorreflexa na RVLM de ratos Wistar parece ser devido à modulação do componente simpato-inibitório deste reflexo, uma vez que esse efeito foi abolido pelo pré-tratamento com o bloqueador $\beta 1$ -adrenérgico, Atenolol ($0,55\pm 0,1$ vs. $0,77\pm 0,1$; $0,52\pm 0,1$; $0,66\pm 0,2$; $0,61\pm 0,2$ e $0,61\pm 0,2$ ms/mmHg; controle e 10, 20, 30, 45 e 60 min após SP), mas não com o antagonista colinérgico, Metil-atropina ($0,16\pm 0,03$ vs. $0,37\pm 0,04$; $0,45\pm 0,1$ e $0,48\pm 0,1$ ms/mmHg; controle e 30, 45 e 60 min após SP). Observamos ainda que os receptores NK1 estão amplamente distribuídos em neurônios gabaérgicos na RVLM, embora também esteja localizado em neurônios catecolaminérgicos. A microinjeção bilateral de SP na RVLM de ratos SHR não-anestesiados promoveu aumento da sensibilidade da bradicardia barorreflexa ($0,3\pm 0,1$ vs. $0,8\pm 0,1$; $1,0\pm 0,1$ e $0,7\pm 0,1$ ms/mmHg, controle e 30,45 e 60 min. após SP) revertendo o prejuízo da função barorreflexa observada nesses animais. Esse efeito também foi abolido após o pré-tratamento com Atenolol ($0,24\pm 0,02$ vs. $0,34\pm 0,02$; $0,33\pm 0,1$; $0,20\pm 0,01$; $0,33\pm 0,1$ e $0,30\pm 0,05$ ms/mmHg; controle e 10, 20, 30, 45 e 60 min após SP) mas não com Metil-atropina ($0,07\pm 0,01$ vs. $0,11\pm 0,01$; $0,14\pm 0,02$ e $0,17\pm 0,02$ ms/mmHg; controle e 30, 45 e 60 min após SP). Entretanto não alterou a resposta pressora ou a bradicardia do quimiorreflexo em nenhum dos tempos analisados. A microinjeção bilateral do antagonista de SP, CP 99,994, na RVLM de animais hipertensos não promoveu nenhuma alteração sobre a pressão arterial basal, frequência cardíaca basal, na sensibilidade do barorreflexo e nem na resposta pressora e bradicárdica do quimiorreflexo. Nossos resultados mostram ainda que animais SHR apresentam maior densidade de receptores NK1 na RVLM em comparação com ratos normotensos ($9,4\pm 0,2$ vs. $8,6\pm 0,2\%$ de área marcada). Diante desses resultados podemos concluir que a Substância P e seu receptor NK1 participam do controle cardiovascular atuando tanto em vias inibitórias quanto excitatórias na RVLM, influenciando principalmente as respostas reflexas dos barorreceptores através da modulação do componente simpático, possivelmente por sua interação com neurônios gabaérgicos, facilitando a liberação de GABA. Sugerem ainda que as alterações observadas na expressão do receptor NK1 em animais hipertensos seja um mecanismo compensatório induzido pela redução do tônus taquicinérgico na RVLM, e, portanto consequência da hipertensão e não a sua causa. Possivelmente, essa redução do tônus taquicinérgico na RVLM de animais hipertensos pode contribuir para a disfunção barorreflexa observada nesses animais.

ABSTRACT

In this study we investigated in unanesthetized animals: a) if the biphasic effect on arterial pressure induced by Substance P (SP) into the Rostral Ventrolateral Medulla (RVLM) is due to the formation of N- and C-terminal fragments; b) mechanism through which the SP modulate cardiovascular reflexes into the RVLM in Wistar rats, evaluating the relative contribution of the sympathetic and parasympathetic autonomic components, and the localization of SP receptor (NK1 receptor) in catecholaminergic and gabaergic pathways into the RVLM by immunofluorescence, and c) if SP plays modulatory role on cardiovascular reflex control in hypertensive animals, as well expression of NK1 receptors into the RVLM of these animals. Thus we used Wistar (290-310g) and SHR (16 week-old) rats that were submitted to implantation of guide cannulas in direction to the RVLM, and cannulation of femoral artery and vein, for recording of cardiovascular parameters and drug administration, respectively. Our results show that SP N-terminal fragment [SP-(1-7) 0.01; 0.5 and 1.0 nmol] produced only bradycardia (6 ± 3 vs. -10 ± 4 , -21 ± 4 e -30 ± 18 bpm) whereas the SP C-terminal fragment [SP-(5-11) 0.01 and 1 nmol] produced increase in arterial pressure (0.5 ± 1 vs. 27 ± 9 e 25 ± 9 mmHg) and bradycardia (2 ± 4 vs. -20 ± 6 e -21 ± 11 bpm). The facilitatory action of SP on baroreflex bradycardia into the RVLM in Wistar rats can be due to modulation of the sympathetic-inhibitory component of this reflex, since this effect was abolished after pre-treatment with $\beta 1$ -adrenergic antagonist, Atenolol (0.55 ± 0.1 vs. 0.77 ± 0.1 ; 0.52 ± 0.1 ; 0.66 ± 0.2 ; 0.61 ± 0.2 and 0.61 ± 0.2 ms/mmHg; control and 10, 20, 30, 45 and 60 after SP), but not with the cholinergic antagonist, Methyl-atropine (0.16 ± 0.03 vs. 0.37 ± 0.04 ; 0.45 ± 0.1 and 0.48 ± 0.1 ms/mmHg; control and 30, 45 and 60 min after SP). We observed yet that NK1 receptors were broadly present in gabaergic neurons into the RVLM, although NK1 receptors also are localized in catecholaminergic neurons. The bilateral microinjection of SP into the RVLM of unanesthetized SHR improving the baroreflex bradycardia sensibility (0.3 ± 0.1 vs. 0.8 ± 0.1 ; 1.0 ± 0.1 and 0.7 ± 0.1 ms/mmHg, control and 30, 45 and 60 min. after SP), producing a reversion of the impairment in baroreceptor function observed in these animals. This effect was also abolished after pre-treatment with Atenolol (0.24 ± 0.02 vs. 0.34 ± 0.02 ; 0.33 ± 0.1 ; 0.20 ± 0.01 ; 0.33 ± 0.1 and 0.30 ± 0.05 ms/mmHg; control and 10, 20, 30, 45 and 60 min after SP) but not with Methyl-atropine (0.07 ± 0.01 vs. 0.11 ± 0.01 ; 0.14 ± 0.02 and 0.17 ± 0.02 ms/mmHg; control and 30, 45 and 60 min after SP). Nevertheless SP produced no changes on pressor response or bradycardia of chemoreflex. The bilateral microinjection of SP antagonist, CP 99,994, into the RVLM of spontaneously hypertensive rats did not produced any alteration on basal arterial pressure, basal heart rate, baroreflex sensibility and cardiovascular responses of chemoreflex. Our results also show that SHR animals exhibited higher density of NK1 receptors into the RVLM in comparison to normotensive rats (9.4 ± 0.2 vs. $8.6\pm 0.2\%$ of marked area). The data from present study reveal that Substance P and the NK1 receptors participate of cardiovascular control acting on inhibitory pathways as much as on excitatory pathways into RVLM, influencing reflexes responses of baroreceptors through modulation of sympathetic component, possibly by the interaction with gabaergic neurons, inducing liberation of GABA. Suggest yet that alteration observed on NK1 receptor expression in hypertensive rats can be a compensatory mechanism induced by reduction of tachykininergic tonus into RVLM, and therefore consequence of hypertension and not cause. Nevertheless, this reduction on tachykininergic tonus into the RVLM in hypertensive rats can contribute to baroreflex dysfunction observed in these animals.

INTRODUÇÃO

Núcleos e áreas do Sistema Nervoso Central (SNC), em especial as localizadas no bulbo, desempenham um importante papel no controle da função cardiovascular, dentre essas, podemos destacar a área ventrolateral rostral do bulbo, a RVLM (abreviação do inglês *rostral ventrolateral medulla*). A descoberta da importância da região bulbar na manutenção da pressão arterial iniciou-se com estudos de transecção do tronco cerebral realizado por Dittmar em 1873, que formulou o conceito de “Centro Vasomotor” (Guyenet, 1990). Porém a localização precisa da RVLM só foi evidenciada posteriormente através de experimentos com aplicações tópicas de drogas (Feldberg e Guertzenstein, 1972; Guertzenstein e Silver, 1974). Desde então vários estudos têm ressaltado o papel significativo dessa área também na manutenção da atividade simpática (Willette e cols., 1987; Calaresu, 1988; Gebber e Barman, 1988; Morrison and Reis, 1991) através da projeção direta para os neurônios pré-ganglionares simpáticos localizados na coluna intermédio-lateral da medula espinhal (CIML) (Amendt e cols., 1978 e 1979), na integração da transmissão de sinais para os neurônios pré-ganglionares simpáticos, já que recebe aferências de várias regiões do SNC, por exemplo: o núcleo do trato solitário (NTS) (Ross e cols., 1985), hipotálamo, núcleo central da amígdala, núcleo parabraquial (Takayama e Miura, 1991). Além disso, a RVLM é uma área crítica envolvida na via neural dos reflexos cardiovasculares, tal como do barorreflexo (Sun e Guyenet, 1985; Dampney e cols., 1988) e quimiorreflexo (Sun e Spyer, 1991; Sun e Reis, 1992).

A RVLM, apesar de constituir uma área de pequena extensão, cerca de um milímetro de acordo com o Atlas de Paxinos e Watson (1996), possui neurônios que sintetizam e/ou expressam uma grande variedade de neurotransmissores e/ou neuromoduladores, tais como adrenalina (Ross e cols., 1981 e 1984; Strack e cols.,

1989; Jeske e McKenna, 1992), aminoácidos excitatórios (Morrison e cols., 1989; Agarwal e Calaresu, 1992), aminoácido γ -aminobutírico (GABA) (Meeley e cols., 1985; Ruggiero e cols., 1985), acetilcolina (Willette e cols., 1984; Giuliano e cols., 1989), encefalinas (Punnen e cols., 1984), neuropeptídeo Y, angiotensina II e Substância P (Johansson e cols., 1981; Dampney 1994; Chalmers e Pilowsky, 1991), o que sugere que a atividade dos neurônios pré-motores simpáticos da RVLM é fortemente influenciada por uma variedade de substâncias, exercendo tanto efeitos excitatórios quanto inibitórios. Dentre esses vários neurotransmissores/neuromoduladores o nosso estudo tratará dos efeitos da Substância P na RVLM.

Substância P

A Substância P (SP), elemento mais conhecido da família das taquicininas (termo que significa “ação rápida”), é um peptídeo formado por onze aminoácidos, descoberto por Euler e Gaddum em 1931 no cérebro e intestino de eqüinos. A família das taquicininas é também composta pela neurokinina A, neurokinina A (3-10), neurokinina K, neurokinina γ e neurokinina B (Helke e Niederer, 1990). São produzidas por ribossomos dentro do corpo celular neuronal e estocadas em vesículas (Otsuka e Yoshioka, 1993). Existem três receptores para as taquicininas, todos acoplados a proteína G: receptor NK1 (interage preferencialmente com a Substância P), receptor NK2 (com NKA, NPK e NK γ , nessa ordem de afinidade), e receptor NK3 (com NKB) (Regoli e cols., 1988 e 1989), todos amplamente distribuídos no SNC (Ribeiro da Silva e cols., 2000).

A substância P tem sido intensivamente investigada como possível candidata a neurotransmissor e/ou neuromodulador no sistema nervoso central. Estudos

anatômicos e fisiológicos sugerem que neurônios contendo Substância P no cérebro podem estar associados com o controle da atividade do sistema nervoso autônomo, e mais especificamente com o controle central da função cardiovascular. Por exemplo, a Substância P está localizada em áreas do encéfalo envolvidas na função autonômica e na regulação cardiovascular (Cuello e Kanazawa, 1978; Helke e cols., 1984; Shults e cols., 1984). Além disso, a administração de Substância P em regiões anteriores do encéfalo (ventrículo lateral) ou posteriores (4^o ventrículo e NTS) aumenta a pressão arterial, a frequência cardíaca e nível de catecolaminas plasmáticas (Haeusler e Osterwalder, 1980; Unger e cols., 1981; Petty e Reid, 1982; Abdala e cols., 2003).

Várias evidências implicam a participação da Substância P na função cardiovascular na área de controle do tônus vasomotor. Helke (1982) demonstrou que a imunorreatividade à Substância P na CIML encontra-se reduzida após lesão da região ventral do bulbo. Loewy e Sawyer (1982) observaram que injeção intratecal de inibidores da Substância P reduz a pressão arterial para níveis espinais e bloqueia a resposta pressora resultante da estimulação da superfície ventral do bulbo, sugerindo que os neurônios que contém Substância P na área ventral do bulbo podem ser críticos na manutenção do tônus vasomotor. Estudos utilizando técnicas combinadas de hibridização *in situ*, imunohistoquímica e traçador retrógrado mostraram que o RNA mensageiro da pre-pro-taquicinina-A, gene precursor da Substância P, e a própria Substância P encontram-se co-localizados nos neurônios catecolaminérgicos da RVLM, sendo que alguns desses neurônios projetam-se para a CIML (Lorenz, 1985; Li e cols., 2005). Por outro lado, em outros estudos, Milner (1988) demonstrou que neurônios da RVLM que contém Substância P fazem sinapse diretamente com neurônios adrenérgicos da RVLM, sugerindo que

essa conexão possa ser à base do controle modulatório da Substância P sobre a atividade vasomotora na RVLM.

Além dessa origem intrínseca de Substância P na RVLM, Milner (1988) também mostrou que três regiões que se projetam para a RVLM, o núcleo do trato solitário, o núcleo pálido da rafe e o hipotálamo, também contêm neurônios com imunorreatividade à Substância P, sugerindo, portanto, a existência de uma origem extrínseca desse neuropeptídeo na RVLM. Em 1996 Milner relatou que o principal núcleo dentre esses que liberam Substância P na RVLM é o núcleo pálido da rafe.

Além das evidências neuroanatômicas, estudos funcionais também sugerem a participação da Substância P na RVLM no controle cardiovascular. Estudos *in vitro* utilizando fatias de bulbo de ratos neonatos mostraram que Substância P promove ação excitatória sobre a atividade dos neurônios bulboespinais da RVLM, sendo esse efeito mediado por receptores NK1 (Sun e Guyenet, 1989; Li e Guyenet, 1997). Urbanski e cols. (1989) mostraram ainda que a microinjeção de uma agonista da Substância P na RVLM de ratos anestesiados produz aumento da pressão arterial de forma dose-dependente.

Em estudos prévios realizados em nosso laboratório (Etelvino e Haibara, 2003) mostramos que a Substância P, microinjetada na RVLM de animais não-anestesiados, promoveu efeito bifásico sobre a pressão arterial, ou seja, resposta hipotensora inicial de curta duração seguida por resposta pressora de longa duração. Esse efeito bifásico da Substância P sobre a pressão arterial também foi observado por Traczyk e Kubicki (1980) e Hall e cols (1987) quando microinjetada no ventrículo lateral ou no 4º ventrículo, respectivamente. Hall e cols (1987), utilizando fragmentos de Substância P (fragmento N-terminal e fragmento C-terminal), observaram ainda que cada um dos efeitos promovidos pela Substância P

(isto é, resposta hipotensora e pressora) foi mimetizado por um dos seus fragmentos: enquanto o fragmento N-terminal da Substância P [SP-(1-7)] promoveu rápida queda da pressão arterial sem promover efeito pressor, o fragmento C-terminal [SP-(7-11)] promoveu apenas resposta pressora de longa duração. Em outro estudo, Urbanski e cols. (1989) também observaram que a microinjeção, de doses crescentes do fragmento C-terminal [SP (5-11)] modificado, na RVLM de ratos anestesiados promoveu apenas resposta pressora.

Sabe-se que a Substância P é rapidamente metabolizada em fragmentos menores em uma variedade de tecidos periféricos e centrais (Edwardson e McDermott, 1985). Essa degradação pode ocorrer pela ação de diferentes peptidases, tais como a endopeptidase 3.4.24.11 (também chamada de endopeptidase neutra – NEP), a endopeptidase 3.4.21.26 (também chamada de prolil-endopeptidase – PEP) e a dipeptidil aminopeptidase IV (3.4.14.15) (Figura I). Estudo de Matsas e cols. (1983) demonstraram que a NEP pode clivar a Substância P em diferentes pontos: entre os aminoácidos que estão na posição Gln⁶-Phe⁷, Phe⁷-Phe⁸ e Gly⁹-Leu¹⁰, dando origem à SP-(1-6), SP-(1-7) e SP-(1-9), respectivamente. Portanto, a ação dessa enzima sobre a Substância P origina como principal produto fragmentos N-terminal, uma vez que os fragmentos C-terminal formados são estruturalmente pequenos e inativos (Piercey e cols., 1982). Já a ação da PEP sobre a Substância P promove clivagem entre os aminoácidos Pro⁴-Gln⁵ formando o fragmento C-terminal, SP-(5-11) (Zolfaghari e cols., 1986). Apesar dessa variedade de fragmentos de Substância P, os fragmentos mais frequentemente encontrados no SNC são a SP-(1-7), fragmento N-terminal, e a SP-(5-11), fragmento C-terminal (Sakurada e cols., 1985).

Em conjunto, esses estudos sugerem que o efeito bifásico promovido pela Substância P na RVLM, por nós observado, possa ser mediado através da formação de seus fragmentos N- e C-terminal. Desta forma, o primeiro objetivo do presente estudo foi investigar o efeito dos fragmentos N-terminal, [SP-(1-7)], e C-terminal, [SP-(5-11)], da Substância P microinjetados na RVLM sobre a regulação cardiovascular em ratos não-anestesiados.

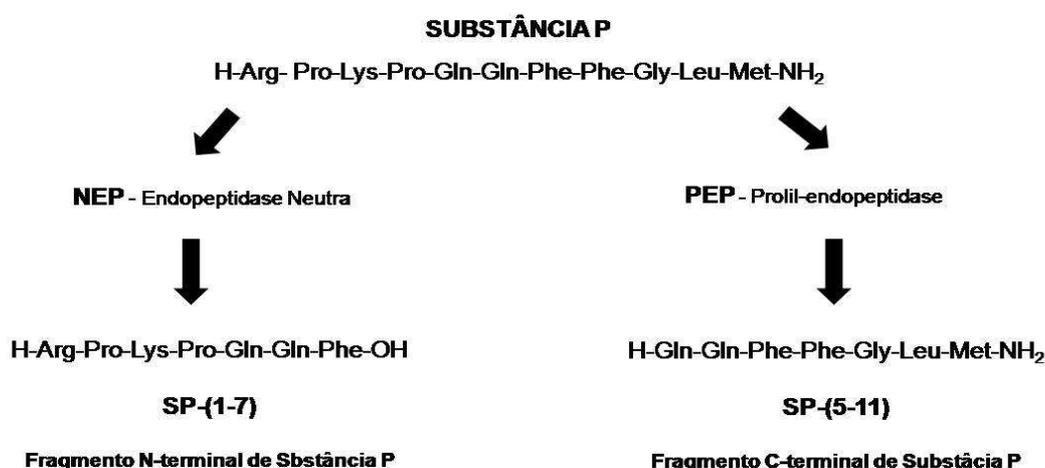


Figura I: Modelo esquemático da estrutura molecular e formação dos fragmentos de Substância P (Piercey e cols., 1982; Matsas e cols., 1983; Edwardson e McDermott, 1985; Zolfaghari e cols., 1986; Sakuma e cols., 1991; Freed e cols., 2002;)

Substância P e Reflexos Cardiovasculares

Uma série de estudos tem mostrado a presença de Substância P em vários dos componentes neuronais das vias do barorreflexo e do quimiorreflexo: células glomais e nervosas do corpo carotídeo (Cuello e McQueen, 1980; Jacobowitz e Helke, 1980), nos fascículos da adventícia no seio carotídeo e arco aórtico, nos nervos carotídeos e aórticos (Helke e cols., 1980; Jacobowitz e Helke, 1980), nos gânglios petroso (Gillis e cols., 1980) e nodoso (Gamse e cols., 1979; Helke e cols., 1980), nas terminações nervosas no NTS (Cuello e Kanazawa, 1978; Gillis e cols., 1980; Ljungdahl e cols., 1978), no núcleo ambíguo (Massari e cols., 1994) e

também na RVLM. A presença desse neuropeptídeo em todos os níveis do arco do barorreflexo e quimiorreflexo sugere que a Substância P possa desempenhar, pelo menos em parte, um papel modulatório no controle dos reflexos cardiovasculares.

Nesse sentido, estudos de Butcher e cols. (1998) mostraram que camundongos com deleção do receptor NK1 apresentam alteração da bradicardia barorreflexa, sem qualquer alteração nas respostas reflexas à estimulação do reflexo de Bezold-Jarisch. Appenrodt e cols (1993), administrando Substância P no ventrículo lateral de ratos, mostraram que baixas doses de substância P aumentam a sensibilidade do barorreflexo, enquanto que altas doses reduzem. Posteriormente, Martini e cols. (1995), utilizando coelhos, demonstraram que a microinjeção de Substância P no 4º ventrículo aumenta a bradicardia barorreflexa. Vários outros trabalhos relatam um papel importante da Substância P no NTS, também aumentando a sensibilidade do barorreflexo (Chan e cols., 1990; Kubo e Kihara, 1987; Morilak e cols., 1988; Seagard e cols., 2000). Já em relação ao quimiorreflexo o papel da Substância P no NTS permanece ainda controverso. Estudos de microdiálise detectaram aumento da concentração extracelular de Substância P no NTS durante a hipóxia (Lindefors e cols., 1986; Srinivasan e cols., 1991). Entretanto, Zhang e cols. (2000) não observaram alterações das respostas cardiovasculares induzidas por estimulação dos quimiorreceptores com cianeto de potássio após a microinjeção bilateral de um antagonista de receptores NK1 no NTS de ratos não-anestesiados.

Substância P na RVLM e Reflexos Cardiovasculares

A RVLM, além de sua importante função na manutenção do tônus vasomotor, também participa da integração dos reflexos cardiovasculares, incluindo o

barorreflexo (Sun e Guyenet, 1985; Dampney e cols., 1988), quimiorreflexo (Sun e Spyer, 1991; Sun e Reis, 1992), reflexo Bezold-Jarisch (Verberne e Guyenet, 1992), dentre outros.

Apesar da presença da Substância P na RVLM ter sido evidenciada em vários trabalhos, o papel deste neuropeptídeo na RVLM modulando os reflexos cardiovasculares tem sido pouco explorado. Recentemente foi demonstrado que o bloqueio dos receptores NK1 da RVLM com o antagonista WIN 51708 não promoveu alteração do barorreflexo, mas promoveu atenuação significativa da resposta simpatoexcitatória induzida por hipóxia em ratos anestesiados (Makeham e cols., 2005). Entretanto, surpreendentemente a microinjeção da Substância P na RVLM desses animais não promoveu alteração significativa sobre estes reflexos.

Diferente do observado nos estudos de Makeham e cols. (2005), estudos de nosso laboratório (Etelvino e Haibara, 2004) realizados em ratos não-anestesiados, mostraram que a microinjeção bilateral de Substância P na RVLM promoveu aumento da sensibilidade da bradicardia barorreflexa e diminuição da resposta pressora do quimiorreflexo. Além disso, mostramos que a microinjeção de um antagonista da Substância P na RVLM promoveu efeito oposto, ou seja, reduziu a sensibilidade da bradicardia barorreflexa e aumentou a resposta pressora do quimiorreflexo, sugerindo que a Substância P liberada endogenamente na RVLM participa da modulação dos reflexos cardiovasculares.

As respostas cardiovasculares do quimiorreflexo são caracterizadas por aumento da pressão arterial e redução da frequência cardíaca, decorrentes de aumento da atividade eferente simpática vascular e parassimpática cardíaca, respectivamente (Franchini e Krieger, 1993; Haibara e cols., 1995). Em nosso estudo observamos que a microinjeção bilateral de Substância P na área RVL

promoveu redução da resposta pressora do quimiorreflexo, sem promover qualquer alteração sobre a resposta bradicárdica deste reflexo, sugerindo que a Substância P desempenhe um papel simpatoinibitório sobre esse reflexo.

A frequência cardíaca é controlada pelo balanço entre a atividade do sistema nervoso autônomo parassimpático, que tem origem no núcleo ambíguo (NA), e sistema nervoso autônomo simpático, que tem origem na RVLM. A bradicardia reflexa observada quando o barorreflexo é estimulado é resultante principalmente da ativação do componente parassimpático, mas também é resultante, embora em menor grau, da inibição do componente simpático (Glick e Braunwai, 1965; Coleman, 1980). Assim uma possível interpretação dos efeitos da Substância P na RVLM sobre o aumento da sensibilidade da bradicardia barorreflexa, seria de que esse efeito seja mediado pela potenciação do efeito simpatoinibitório do barorreflexo na RVLM.

Sabe-se que a ativação dos barorreceptores promove inibição da atividade dos neurônios da RVLM (via CVLM), enquanto o quimiorreflexo, por sua vez, promove ativação desses neurônios, provavelmente através de uma via excitatória direta do NTS para a RVLM (Spyer, 1975; Loewy, 1990; Ross e cols., 1985). Um possível mecanismo pelo qual a Substância P na RVLM promoveria a potenciação da resposta simpatoinibitória do barorreflexo (aumentando a sensibilidade do barorreflexo), e inibição da resposta simpatoexcitatória do quimiorreflexo (reduzindo a resposta pressora do quimiorreflexo) seria através da ativação de vias inibitórias envolvidas na integração tanto do barorreflexo quanto do quimiorreflexo.

Nesse sentido, tem sido demonstrado que alguns dos efeitos da Substância P no SNC podem estar relacionados à estimulação de interneurônios inibitórios e, conseqüentemente, liberação do aminoácido inibitório γ -aminobutírico (GABA)

(Paton e Kasparov, 2000; Maubach e cols., 2001). De forma interessante Sakuma e cols. (1991) demonstraram que a perfusão de Substância P na medula espinhal de ratos promoveu aumento na liberação de GABA, sendo esse mesmo efeito observado com a perfusão de fragmentos N-terminal de Substância P, mas não com os fragmentos C-terminal. Assim uma possível hipótese levantada para explicar os efeitos da Substância P na RVLM sobre os reflexos cardiovasculares, seria através da interação dessa taquicinina com interneurônios inibitórios existentes na RVLM (Meeley e cols., 1985; Ruggiero e cols., 1985) e/ou com terminais sinápticos originados da área ventrolateral caudal do bulbo (CVLM), promovendo redução da atividade eferente simpática devido à liberação de GABA dentro da RVLM (Figura II). Porém, a existência de receptores para a Substância P na RVLM em neurônios gabaérgicos não foi ainda evidenciada. Assim, outro objetivo de nosso trabalho foi investigar a existência de receptores de Substância P (receptores NK1) localizados em neurônios gabaérgicos da RVLM.

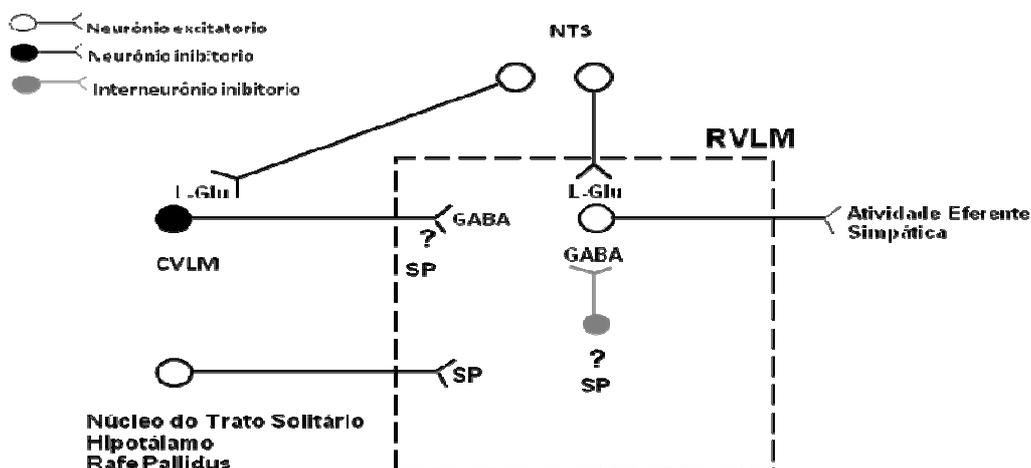


Figura II: Esquema demonstrativo das possíveis vias neurais nas quais a Substância P atua promovendo alterações sobre as respostas reflexas dos baro-e quimiorreceptores.

Outra hipótese que devemos considerar para tentar interpretar os efeitos promovidos pela Substância P na RVLM particularmente sobre o aumento da sensibilidade da bradicardia barorreflexa é que, devido à proximidade física da

RVLM com o NA, uma parte da Substância P microinjetada na RVLM possa ter atingido por difusão o NA. Massari e cols. (1994 e 1996) demonstraram a presença de terminais sinápticos contendo Substância P em neurônios do NA que se projetam para o gânglio cardíaco, bem como a presença de receptores NK1 nesses neurônios. Esses estudos mostraram ainda que a microinjeção de Substância P ou de um agonista seletivo de receptores NK1 no NA promovem bradicardia. Portanto existe a possibilidade de que os efeitos observados após a microinjeção de Substância P na RVLM sobre a bradicardia barorreflexa sejam decorrentes da modulação do componente parassimpático, através de sua ação no NA.

Desta forma, torna-se importante a avaliação da participação relativa dos componentes autonômicos simpático e parassimpático cardíacos na modulação da bradicardia barorreflexa promovida pela Substância P microinjetada na RVLM, o que consistiu em outro objetivo deste estudo.

Substância P e Hipertensão Arterial

Estudos anatômicos e farmacológicos sugerem que a função e expressão das taquicininas e seus receptores no SNC estão alteradas na hipertensão arterial. Por exemplo, Unger e cols. (1980) observaram hipersensibilidade da resposta pressora induzida pela microinjeção intracerebroventricular de Substância P em ratos espontaneamente hipertensos (SHR). Há também um significativo aumento da capacidade de ligação para Substância P, bem como da imunorreatividade para esta taquicinina, nos animais espontaneamente hipertensos em várias áreas do sistema nervoso central, algumas das quais relacionadas com a função cardiovascular (Shigematsu e cols., 1986; Chen e cols., 1990). Esses dados podem indicar uma alteração no metabolismo da Substância P endógena e/ou alteração na liberação

desse neuropeptídeo nos animais SHR. Takano e cols., em 1985, mostraram através de ensaios de ligação (“binding”) que a quantidade máxima de sítios de ligação para Substância P nos neurônios pré-ganglionares simpáticos localizados na CIML é 23% maior em ratos SHR, e a imunoreatividade de Substância P nesses neurônios também se encontra 20% aumentada nesses animais. Em 2000 Schoborg e cols. observaram que o nível de RNA mensageiro do receptor NK1 é aproximadamente três vezes maior no gânglio cervical superior de ratos SHR. Cloutier e cols. (2006) também mostraram aumento na densidade de receptores NK1 em toda a coluna espinhal em ratos SHR. O conjunto desses estudos sugere que a Substância P possa participar, pelo menos em parte, dos mecanismos envolvidos na gênese da hipertensão arterial, embora não seja possível a partir desses estudos estabelecer uma relação de causa ou consequência.

É sabido que um dos fatores responsáveis pelo desenvolvimento e manutenção da hipertensão arterial é a hiperatividade do sistema nervoso simpático (Wyss, 1993). Sabe-se ainda que a atividade da RVLM encontra-se aumentada na hipertensão arterial (Kubo e cols., 1986; Vasquez e cols., 1992; Minson e cols., 1996; Campos Júnior e cols., 2001), tal qual a função dos reflexos cardiovasculares está alterada nesta patologia: a sensibilidade dos barorreceptores arteriais está reduzida, o que promove prejuízo da função barorreflexa (Kumagai e cols., 1993; Chaves e cols., 2000), e o contrário é observado nos quimiorreceptores, que apresentam resposta aumentada a hipóxia (Fukuda e cols., 1987). Entretanto, não há relatos na literatura mostrando se a Substância P na RVLM participa de alguma forma da modulação dos reflexos cardiovasculares em animais hipertensos, ou ainda se a liberação da Substância P ou se o número de seus receptores possa estar alterado na RVLM desses animais. Desta forma, o presente estudo também se

propôs a avaliar o efeito da Substância P exógena e endógena na RVLM sobre o barorreflexo e quimiorreflexo em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) não-anestesiados, e comparar a expressão dos receptores NK1 na RVLM dos ratos normotensos e hipertensos.

OBJETIVOS

Objetivo Geral:

Investigar o mecanismo pelo qual a Substância P modula os parâmetros e reflexos cardiovasculares na Área Ventrolateral Rostral do Bulbo (RVLM) de ratos não-anestesiados.

Objetivos Específicos

- Avaliar as respostas cardiovasculares induzidas pela microinjeção unilateral dos fragmentos de Substância P, fragmentos N-terminal e C-terminal, na RVLM de ratos Wistar.
- Avaliar a participação relativa dos componentes autonômicos simpático e parassimpático no efeito promovido pela Substância P na RVLM sobre as respostas cardiovasculares induzidas pela estimulação do barorreflexo em ratos Wistar.
- Determinar por imunofluorescência a localização do receptor de Substância P, receptor NK1, na RVLM em ratos Wistar.
- Avaliar os efeitos da microinjeção bilateral de Substância P e de seu antagonista na RVLM sobre as respostas cardiovasculares induzidas pela estimulação do barorreflexo e quimiorreflexo em ratos SHR.
- Comparar através de imunohistoquímica a expressão dos receptores NK1 na RVLM dos ratos Wistar e SHR.

MATERIAL E MÉTODOS

1) Animais

Nesse projeto foram utilizados ratos Wistar (290-310 gramas) e ratos SHR (16 semanas) fornecidos pelo Centro de Bioterismo (CEBIO) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais e da Universidade de São Paulo (USP/SP), respectivamente. Foram mantidos em gaiolas e alimentados com ração comercial e água de torneira à vontade com ciclo de luminosidade claro-escuro 14/10 horas e temperatura controlada.

2) Implante de cânulas-guia em direção a RVLM

Os animais foram anestesiados com 2,2,2-tribromoetanol (250mg/Kg, Aldrich Chemical Company, Inc.), e em seguida os pêlos da região cranial foram depilados. Posteriormente, o animal foi colocado em decúbito ventral em estereotáxico para animais de pequeno porte (Stoelting), previamente preparado com uma ou duas cânulas de aço inoxidável (15mm) confeccionadas à partir de agulhas hipodérmicas (25x6mm), e fixadas no suporte da torre do estereotáxico. Através de duas barras auriculares a cabeça do animal foi colocada em posição fixa. Na região do escalpo a ser aberta foi injetado subcutaneamente xilocaína (anestésico local) contendo vasoconstrictor, a fim de se evitar sangramento após abertura do mesmo. Após a assepsia com álcool iodado, foi feita uma incisão longitudinal expondo-se a calota craniana, e através das cânulas-guia (com a torre do estereotáxico em angulação zero) a cabeça do animal foi ajustada até que os pontos bregma e lambda da calota craniana permanecessem no mesmo nível horizontal. Com ajuda de uma broca odontológica esférica, foram feitos dois orifícios onde foram fixados parafusos de aço inox, que serviram de suporte para o capacete de acrílico. Um terceiro orifício foi feito na linha média para se expor o seio venoso a fim de auxiliar na leitura do

parâmetro lateral. Logo após a fixação dos parafusos, foram feitas as leituras dos parâmetros ântero-posterior, dorso-ventral e látero-lateral. O ponto de introdução das cânulas foi determinado a partir de parâmetros previamente estabelecidos em nosso laboratório com auxílio do Atlas de Paxinos e Watson (1986). Os parâmetros para o implante de cânulas-guia em direção à RVLM foram: ântero-posterior = 3,3 mm posterior ao lambda; lateral = 2,0 mm a partir do seio venoso e dorso-ventral = -6,8 mm a partir do lambda, para ratos Wistar, sendo que para os ratos SHR apenas o parâmetro ântero-posterior foi alterado para 2,4 mm posterior ao lambda. Determinado os pontos de introdução das cânulas foi feita a trepanação da calota craniana com auxílio da broca odontológica esférica, e nesses orifícios foram introduzidas as cânulas-guias. Após a introdução das cânulas, as mesmas foram fixadas ao crânio através de resina acrílica odontológica autopolimerizável. Após a completa fixação da cânula, a torre do estereotáxico foi removida, e mandris de aço inoxidável (15 mm) foram introduzidos nas cânulas para evitar a obstrução das mesmas. Como medida profilática, após essa cirurgia, todos os animais receberam 0,2 ml de Pentabiótico Veterinário (Fontoura-Wyeth, 1.200.00 UI/3 ml) por via intramuscular. Em seguida, os animais foram mantidos em caixas coletivas, com água e ração à vontade, por um período de 8 dias, a fim de se recuperarem da cirurgia.

3) Canulação de artéria e veia femoral

Um dia antes do experimento, os animais foram submetidos à cirurgia de canulação da artéria e veia femoral. As cânulas utilizadas foram confeccionadas a partir de tubos de polietileno PE-10 (4,5 cm para artéria e 2 cm para veia) soldado em outro tubo de polietileno PE-50 (15 cm). Antes de serem implantadas, as cânulas

foram preenchidas com solução de salina fisiológica e obstruídas na extremidade livre do PE-50 com um pino de metal. O animal foi anestesiado com tribromoetanol (250 mg/Kg) e as cânulas foram introduzidas na aorta abdominal, através da artéria femoral, e na veia femoral. Após a introdução das cânulas, as mesmas foram dirigidas subcutaneamente com auxílio de um trocater para a cintura escapular, onde foram exteriorizadas e fixadas com linha de sutura. A cânula arterial foi utilizada para registro dos parâmetros cardiovasculares e a cânula venosa para administração sistêmica de drogas. Em seguida os animais foram colocados em gaiolas individuais e mantidos na sala de experimento para adaptação.

4) Registro da pressão arterial e da frequência cardíaca

O registro da pressão arterial e frequência cardíaca foi feito um dia após a canulação da artéria e veia femoral, e o experimento realizado com animal não-anestesiado e com livre movimentação. A cânula arterial foi conectada a um transdutor de pressão conectado a um amplificador e um conversor analógico/digital (A/D) MP100 (Biopac Systems, Inc.) com frequência de amostragem de 200 Hz. O software utilizado foi o AcqKnowledge 5 (Biopac Systems, Inc.). Após a prévia calibração do equipamento, a pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM), e frequência cardíaca (FC) foram registradas. A PAM e a FC foram calculadas via software a partir dos valores de pressão arterial pulsátil.

5) Técnica para microinjeção de drogas na RVLM

As drogas foram dissolvidas em salina (NaCl 0,9%), exceto os fragmentos de Substância P [SP-(1-7) – fragmento N-terminal, SP-(5-11) – fragmento C-terminal] que foram dissolvidos em Tampão Fosfato Isotônico (0.01M; pH 7.2). As drogas

foram microinjetadas unilateral ou bilateralmente, de acordo com o protocolo experimental, diretamente na RVLM. Para isso foi utilizada uma seringa de microlitro Hamilton (Hamilton, Reno, NV), conectada a uma cânula injetora [confeccionada a partir de um segmento da agulha 30G soldada em um tubo fino de aço inoxidável (33G; Hypo Tube – Small Parts)] por meio de um tubo de silicone PE-10. A cânula injetora foi 3,8 e 3,6 mm mais longa que a cânula-guia, para ratos Wistar e SHR respectivamente, afim de que as microinjeções atingissem diretamente a RVLM. A cânula injetora foi posicionada no interior da cânula-guia e introduzida lentamente no cérebro do animal até a RVLM. O volume microinjetado foi sempre de 100 nl.

6) Estimulação dos barorreceptores

Para estimulação dos barorreceptores foi utilizada solução do agonista alfa₁-adrenérgico fenilefrina (0.5µg/0.1ml) injetada através da cânula venosa previamente implantada. A fenilefrina é uma droga com potente ação vasoconstrictora capaz de produzir um rápido aumento da pressão arterial, estimulando desta forma os barorreceptores. A sensibilidade do barorreflexo foi avaliada pela razão entre as alterações reflexas de frequência cardíaca convertidas em intervalo de pulso ($IP = 60.000/FC$), induzidas por alterações transitórias da pressão arterial média ($\Delta IP/\Delta PAM$, ms/mmHg), denominado índice de sensibilidade barorreflexa.

7) Estimulação dos quimiorreceptores periféricos

Para estimulação dos quimiorreceptores periféricos foi utilizada solução de cianeto de potássio (KCN, 40µg/0,1 ml). Essa solução foi injetada através da cânula venosa previamente implantada. O cianeto de potássio é descrito na literatura como um potente estímulo para os quimiorreceptores periféricos (Biscoe e Duchon, 1990;

Franchini e Kriebler, 1993) por inibir a enzima citocromo-oxidase. Como consequência, ocorre déficit energético celular associado à indisponibilidade de oxigênio, promovendo hipóxia citotóxica, o que leva a estimulação das células quimiossensíveis do corpúsculo carotídeo.

8) Bloqueio dos componentes do Sistema Nervoso Autônomo

O bloqueio do Sistema Nervoso Autônomo Parassimpático e Simpático foi realizado com injeção intravenosa do antagonista colinérgico Metil-atropina (1mg/Kg), e antagonista β_1 -adrenérgico Atenolol (2mg/Kg), respectivamente. As doses escolhidas foram baseadas no estudo de Higa e cols., 2002.

9) Drogas utilizadas

- Solução salina estéril (NaCl 0.9%/100nl, veículo)
- SP-(1-7) – fragmento N-terminal (0,001; 0,01; 0,5 e 1nmol/100nl, Bachem, USA)
- SP-(5-11) – fragmento C-terminal (0,01 e 1 nmol, Bachem, USA)
- Substância P, SP (1pmol/100nl, Bachem, USA)
- CP 99,994, antagonista NK1 (5 μ M/100nl, Pfizer), gentilmente cedido pelo professor Julian F. R. Paton do Departameto de Fisiologia da Universidade de Bristol, UK.
- Fenilefrina (0,5 μ g/0.1ml, Sigma Chemical, St. Louis, MO)
- Cianeto de potássio (KCN 40 μ g/0.1 ml, Sigma Chemical, St. Louis, MO)
- Metil-Atropina (1mg/kg, Sigma Chemical, St. Louis, MO)
- Atenolol (2mg/Kg), gentilmente cedido pelo COINFAR Pesquisa e Desenvolvimento.

10) Histologia

Ao final dos experimentos foi microinjetada na RVLM o corante Alcian Blue (100nl), a fim de determinar os sítios específicos das microinjeções. A seguir, os animais foram profundamente anestesiados com Tiopental (40mg/Kg) e submetidos à abertura da região torácica para a exposição do coração, através do qual foi perfundido solução de formol a 10%. Para facilitar a perfusão cerebral, a aorta descendente foi bloqueada com uma pinça hemostática e a veia cava superior seccionada. O cérebro foi removido e mantido em solução de formol 10% por um período de no mínimo 48 horas. Após esse período o cérebro foi colocado em solução de sacarose 20%, para crioproteção do tecido. Posteriormente foi seccionado transversalmente através de um micrótomo de congelamento em fatias de 50µm de espessura. Os cortes histológicos foram corados através da Técnica de Nissl com vermelho neutro 1% e analisados por microscopia óptica, para verificação dos sítios de microinjeção na RVLM. Somente os animais com a confirmação histológica foram considerados neste estudo.

11) Imunofluorescência de Receptores NK1 na RVLM

11.1) Técnica de Imunofluorescência para o receptor NK1 na RVLM

O método utilizado para o ensaio de imunofluorescência foi padronizado por Becker e cols., 2007 a partir do método descrito anteriormente por Block e cols., 1988. Os animais foram anestesiados com tribromoetanol (250 mg/Kg) e submetidos à abertura da região torácica para a exposição do coração no qual foi injetado 0,2ml de heparina, em seguida foi realizada a perfusão transcardíaca com PBS (0,02 M, pH 7,4) durante 5 minutos e de paraformaldeído 10% em PBS durante 15 minutos. O cérebro foi retirado e mantido na mesma solução fixadora por 2 horas. A seguir o

tecido foi lavado 3 vezes em solução PBS e colocado em solução de sacarose (30% em PBS) por um período de no mínimo 12 horas. Foram realizados cortes no plano frontal de 30µm em criostato de congelamento a temperatura de -18° C. Os cortes de bulbo foram incubados livres em cubetas (método “free floating”) durante 15 minutos nas seguintes soluções: PBS para hidratação do tecido e PBS contendo Tween 0,5% para exposição do epitopo dos receptores. Em seguida foram incubados em solução bloqueio, PBS contendo BSA 5%, a fim de se bloquear ligações não-específicas, por 30 minutos. Após esse período os cortes foram incubados com anticorpo primário anti-NK1 (1:200) durante 48 horas a 4° C. O controle negativo foi realizado em cortes adjacentes incubados em solução diluidora de anticorpo da Dako (0,05mol/L Solução Tampão Tris-HCL contendo 0,1% Tween, proteínas estabilizadoras que reduzem “background” e 0.015mol/L de sódio ácido). Após as 48 horas os cortes foram lavados 3 vezes durante 5 minutos em solução PBS, e em seguida incubados com o anticorpo secundário (anti-IgG de coelho – 1:200) conjugado com composto fluorescente (Alexa 594) durante 60 minutos em temperatura ambiente. Depois desse período os cortes foram lavados, novamente, 3 vezes durante 5 minutos em PBS e montados em lâminas gelatinizadas e recobertas com lamínulas de vidro em solução de montagem contendo glicerol (75%) diluído em PBS na proporção 1:3.

11.2) Identificação do receptor NK1 em neurônios catecolaminérgicos e gabaérgicos na RVLM

Experimentos de dupla marcação foram realizados para identificar se os receptores de Substância P da RVLM, receptores NK1, estão localizados em neurônios catecolaminérgicos e/ou gabaérgicos. Para isso foram utilizados anticorpo anti-NK1 com o anticorpo primário contra tirosina hidroxilase (anti-THase, 1:500),

para a identificação da imunorreatividade em neurônios catecolaminérgicos (n= 3), ou com o anticorpo para a enzima decarboxilase ácida glutâmica (anti-GAD67; 1:1500), para identificação da imunorreatividade em neurônios gabaérgicos (n= 5). Pelo fato de todos os anticorpos primários utilizados terem sido fabricados em coelho as incubações foram realizadas separadamente, como descrito a seguir. Primeiro os cortes foram incubados em anticorpo primário anti-NK1 e em seu respectivo anticorpo secundário como descrito anteriormente. Após foi realizada uma nova etapa de bloqueio com BSA 5% durante 30 minutos, e em seguida os cortes foram incubados com o anticorpo primário anti-Tirosina ou anti-GAD67 durante 24 horas a 4° C, seguido pela incubação em seu respectivo anticorpo secundário. Os anticorpos secundários utilizados possuíam compostos fluorescentes diferentes (Alexa 594, para identificação do receptor NK1 e Alexa 488 para identificação da THase ou GAD67). Alguns experimentos foram realizados adicionando os seguintes anticorpos: Draq 5 (1:1000) marcador nuclear, anti-Neu-N conjugado com Alexa 488 para identificação de neurônios e anti-GFAP para identificação de astrócitos.

11.3) Análise das Imagens

As imagens fluorescentes foram obtidas utilizando microscópio confocal (Zeiss Confocal LSM 510), com filtros específicos de excitação e emissão para cada composto fluorescente utilizado. A detecção de imagens utilizando dois ou três marcadores em experimentos de colocalização foi realizada ao mesmo tempo com espectros de emissão e excitação diferenciados para não ocorrer sobreposição de ondas fluorescentes: Alexa 488 (excitação 495 - emissão 519), Alexa 594 (excitação 590 – emissão 617) e Draq 5 (excitação 633 – emissão 650). As imagens de cortes controle e marcados foram realizadas em cortes adjacentes e obtidas com o mesmo

padrão de captação. As imagens foram exportadas para o software Microsoft Office PowerPoint e editadas. Lâminas contendo cortes adjacentes aos submetidos ao ensaio de imunofluorescência foram coradas através da Técnica de Nissl com corante vermelho neutro 1% para confirmação da RVLM com auxílio do Atlas de Paxinos e Watson, 1986.

11.4) Anticorpos utilizados

- Diluente de Anticorpo (Dakocytomation, DEN)
- Anticorpo anti-neurokinin NK1 (1:200; rabbit; Abcam; UK)
- Anticorpo anti-Neu N conjugado com Alexa 488 (1:1000; mouse, Chemicon, USA), gentilmente cedido pelo professor André Massensini do Núcleo de Neurociências, UFMG.
- Anticorpo anti-Tirosina Hidroxilase (1:500; rabbit; Abcam; UK)
- Anticorpo anti-GAD 67 (1: 1500; rabbit; Abcam; UK)
- Draq 5 (1:1000; marcador nuclear; Bio-Status; UK)
- Anticorpo anti-Proteína Ácida Fibrilar Glial (1:500; rabbit; Dakocytomation, DEN).
- Alexa 488 (1:200; anti-rabbit; Invitrogen-Molecular Probes; USA)
- Alexa 594 (1:200; anti-rabbit; Invitrogen-Molecular Probes; USA)

12) Imunohistoquímica de receptores NK1 na RVLM

Com a finalidade de comparar a expressão dos receptores NK1 na RVLM dos ratos Wistar e SHR o seguinte protocolo foi utilizado. Os animais foram anestesiados com tribromoetanol (250 mg/Kg) e submetidos à abertura da região torácica para a exposição do coração no qual foi injetado 0,2ml de heparina, em seguida foi realizada a perfusão transcardíaca com PBS (0,02 M, pH 7.4) durante 5 minutos e

de paraformaldeído 10% em PBS durante 15 minutos. O cérebro foi retirado e mantido na mesma solução fixadora por 2 horas. A seguir o tecido foi lavado 3 vezes em solução PBS e colocado em solução de sacarose (30% em PBS) por um período de no mínimo 12 horas. Foram realizados cortes no plano frontal de 30µm da RVLM, nos planos compreendidos entre -11.80 mm a -12.80 mm do Bregma de acordo com Atlas de Paxinos e Watson, em criostato de congelamento a temperatura de -18° C. Os cortes de bulbo foram incubados livremente em cubetas contendo as soluções descritas a seguir. Primeiramente os cortes foram hidratados em solução PBS por 15 minutos, em seguida realizado o bloqueio da peroxidase endógena com H₂O₂ em Metanol 70% por 30 minutos. Após os cortes foram novamente lavados em PBS 3 vezes por 10 minutos e colocados em Tween 0.5% por 15 minutos e em seguida incubados na solução bloqueio, BSA 5% por 24 horas . Em seguida os cortes foram incubados com anticorpo primário anti-NK1 (1:200) durante 48 horas a 4° C. Os cortes controle foram incubados em solução diluidora de anticorpo da Dako. Após as 48 horas os cortes foram lavados 3 vezes durante 10 minutos em solução PBS, e em seguida incubados com o anticorpo secundário universal (1:200) durante 60 minutos em temperatura ambiente. Depois desse período os cortes foram lavados 3 vezes durante 10 minutos em PBS e incubados com complexo Avidina-Biotina (1:150) durante 60 minutos, também em temperatura ambiente. Após os cortes foram novamente lavados 3 vezes por 10 minutos em PBS e revelados com tetracloreto 3,3-diaminobenzidina - DAB (200µl de DAB em 800µl de PBS contendo 10µl de H₂O₂), e em seguida lavados 3 vezes por 10 minutos em PBS. Os cortes foram então montados em lâminas gelatinizadas e recobertos com lamínulas de vidro em solução de montagem contendo glicerol (75%) diluído em PBS na

proporção 1:3. Neste protocolo foi utilizado o Kit para imunohistoquímica da Vector, Vectastain ABC kit Elite PK-6200, USA.

12.1) Análise da Imunohistoquímica

Foram coletados 8 cortes da RVLM de cada rato Wistar (n=7) e SHR (n=7) sendo um corte utilizado como controle. A área delimitada como sendo a RVLM dos cortes, de acordo com Paxinos e Watson (1996), foi fotografada através de uma câmera (Fujitsu, Japan) acoplada ao microscópio (Olympus CX31, Japan). Em seguida, as imagens foram convertidas em escala de cinza utilizando o programa Adobe Photoshop 7.0, e a análise quantitativa das células e da área da RVLM imunorreativa a NK1 foi realizada pelo programa Image Tool 3.0.

13) Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média. A análise estatística dos resultados utilizada para comparar mais de dois grupos diferentes foi a análise de variância (ANOVA). Para análise de resultados dentro de um mesmo grupo foi utilizado o teste-*t* pareado. O nível de significância foi fixado com $p < 0,05$.

14) Protocolos Experimentais

14.1) Efeitos cardiovasculares induzidos pela microinjeção unilateral de doses crescentes do Fragmento N-terminal de Substância P [SP-(1-7)] na RVLM em ratos normotensos não-anestesiados.

Com objetivo de avaliar as respostas cardiovasculares produzidas pela microinjeção do fragmento N-terminal da Substância P na RVLM de ratos Wistar

não-anestesiados, SP-(1-7) e a Solução Tampão Fosfato (0.01M) foram microinjetados nessa área de forma randomizada e as alterações sobre a pressão arterial e frequência cardíaca foram registradas. Para isso foram utilizados animais previamente submetidos ao implante de cânula-guia unilateral em direção a RVLM e implante de cânula arterial. No dia do experimento, após um período de adaptação do animal frente às novas condições ambientais, foi realizada uma curva dose-resposta para SP-(1-7) nas doses (0,001; 0,01; 0,5 e 1 nmol) e do veículo na RVLM. As microinjeções de diferentes doses de SP-(1-7) foram realizadas no intervalo de no mínimo 10 minutos após o retorno dos parâmetros cardiovasculares aos níveis basais.

14.2) Efeitos cardiovasculares induzidos pela microinjeção unilateral de doses crescentes do Fragmento C-terminal de Substância P [SP-(5-11)] na RVLM em ratos normotensos não-anestesiados

Com objetivo de avaliar as respostas cardiovasculares produzidas pela microinjeção do fragmento C-terminal da Substância P na RVLM de ratos Wistar não-anestesiados, SP-(5-11) e a Solução Tampão Fosfato (0.01M) foram microinjetados nessa área de forma randomizada e as alterações sobre a pressão arterial e frequência cardíaca foram registradas. Para isso foram utilizados animais previamente submetidos ao implante de cânula-guia unilateral em direção a RVLM e implante de cânula arterial. Inicialmente verificamos se a SP-(5-11) promovia taquifilaxia. Para isso, no dia do experimento, após um período de adaptação do animal frente às novas condições ambientais, foi microinjetado unilateralmente na RVLM o veículo salina e SP-(5-11) na dose de 0,01 nmol/100nl. Após o retorno dos parâmetros cardiovasculares aos valores basais, foi microinjetada novamente a SP-(5-11) na mesma dose, e essa segunda resposta comparada com a primeira. Para a

realização da curva dose-resposta a SP-(5-11) foi microinjetada unilateralmente na RVLM nas doses de 0,01e 1,0 nmol/100nl, sendo que para cada dose de SP-(5-11) foi utilizado um grupo experimental diferente.

14.3) Efeito do bloqueio do componente vagal sobre o aumento da sensibilidade do barorreflexo induzido pela microinjeção bilateral de Substância P na RVLM em ratos não-anestesiados

Com o objetivo de avaliar se o efeito facilitatório promovido pela Substância P sobre o barorreflexo na RVLM é dependente da modulação do Sistema Nervoso Autônomo Parassimpático, esse reflexo foi avaliado antes e após a microinjeção bilateral de Substância P na RVLM durante o bloqueio vagal. Para isso foram utilizados animais previamente submetidos ao implante bilateral de cânula-guia em direção a RVLM e implante de cânulas na artéria e veia femorais. No dia do experimento, após um período de adaptação do animal frente às novas condições ambientais, o barorreflexo foi testado (resposta controle) através de injeção intravenosa de dose pressora de fenilefrina (0,5µg/0.1ml). Após o retorno dos parâmetros cardiovasculares aos valores basais a metil-atropina (1mg/Kg) foi injetada intravenosamente, e dez minutos após o barorreflexo foi novamente estimulado. Em seguida foi realizada a microinjeção bilateral de Substância P (1 pmol/100nl) na RVLM. Dez, vinte, trinta, quarenta e cinco e sessenta minutos após a administração da Substância P na RVLM o barorreflexo foi novamente estimulado com fenilefrina, e essas respostas foram comparadas com a resposta controle (após o bloqueio vagal).

14.4) Efeito do bloqueio do componente simpático cardíaco sobre o aumento da sensibilidade do barorreflexo induzido pela microinjeção bilateral de Substância P na RVLM em ratos não-anestesiados

Com o objetivo de avaliar se o efeito facilitatório promovido pela Substância P sobre o barorreflexo na RVLM é dependente da modulação do Sistema Nervoso Autônomo Simpático Cardíaco, esse reflexo foi avaliado antes e após a microinjeção bilateral de Substância P na RVLM durante bloqueio simpático. Para isso foram utilizados animais previamente submetidos ao implante bilateral de cânula-guia em direção a RVLM e implante de cânulas na artéria e veia femorais. No dia do experimento, após um período de adaptação do animal frente às novas condições ambientais, o barorreflexo foi testado (resposta controle) através de injeção intravenosa de dose pressora de fenilefrina (0.5µg/0.1ml). Após o retorno dos parâmetros cardiovasculares aos valores basais, o atenolol (2mg/Kg) foi injetado intravenosamente, e dez minutos após o barorreflexo foi novamente estimulado. Em seguida foi realizada a microinjeção bilateral de Substância P (1 pmol/100nl) na RVLM. Dez, vinte, trinta, quarenta e cinco e sessenta minutos após a administração da Substância P na RVLM o barorreflexo foi novamente estimulado com fenilefrina, e essas respostas foram comparadas com a resposta controle (após o bloqueio). A cada 30 minutos o atenolol foi novamente injetado na metade da dose anterior.

14.5) Efeito da microinjeção bilateral de Substância P na RVLM sobre as respostas cardiovasculares induzidas pela estimulação do barorreflexo em ratos espontaneamente hipertensos não-anestesiados

Com o objetivo de avaliar o papel da Substância P na RVLM na integração das respostas cardiovasculares induzidas pelo barorreflexo na hipertensão arterial,

esse reflexo foi estimulado antes e após a microinjeção bilateral de Substância P na RVLM em animais SHR. Para isso foram utilizados animais previamente submetidos ao implante bilateral de cânula-guia em direção a RVLM e implante de cânulas na artéria e veia femorais. No dia do experimento, após um período de adaptação do animal frente às novas condições ambientais, o barorreflexo foi testado (resposta controle) através da injeção intravenosa de doses pressoras de fenilefrina (0.5 µg/0.1ml). Após o retorno da pressão arterial e da frequência cardíaca aos valores basais, a Substância P (1pmol/100nl) foi microinjetada bilateralmente na RVLM. Dez, vinte, trinta, quarenta cinco e sessenta minutos após essa microinjeção, o barorreflexo foi novamente estimulado com fenilefrina, e essas respostas comparadas com a resposta controle.

14.6) Efeito da microinjeção bilateral de Substância P na RVLM sobre as respostas cardiovasculares induzidas pela estimulação do quimiorreflexo em ratos espontaneamente hipertensos não-anestesiados

Com objetivo de avaliar o papel da Substância P na RVLM sobre as respostas cardiovasculares induzidas pelo quimiorreflexo na hipertensão arterial, esse reflexo foi estimulado antes e após a microinjeção de Substância P na RVLM em animais SHR. Para isso foram utilizados animais previamente submetidos ao implante bilateral de cânula-guia em direção a RVLM e implante de cânulas na artéria e veia femorais. No dia do experimento, após um período de adaptação do animal frente às novas condições ambientais, o quimiorreflexo foi testado (resposta controle) através de injeção intravenosa de KCN (40µg/0.1ml). Após o retorno dos parâmetros cardiovasculares aos valores basais, a Substância P (1pmol/100nl) foi microinjetada bilateralmente na RVLM. Dez, vinte, trinta, quarenta cinco e sessenta minutos após

a microinjeção da Substância P, o quimiorreflexo foi novamente estimulado com KCN, e essas respostas foram comparadas com a resposta controle.

14.7) Efeito da microinjeção bilateral de CP 99,994 na RVLM sobre as respostas cardiovasculares induzidas pela estimulação do barorreflexo em ratos espontaneamente hipertensos não-anestesiados

Com o objetivo de avaliar o papel da Substância P endógena na RVLM sobre as respostas cardiovasculares induzidas pela estimulação do barorreflexo na hipertensão arterial, esse reflexo foi avaliado antes e após a microinjeção bilateral do antagonista da Substância P, CP 99,994 na RVLM em ratos SHR. Para isso foram utilizados animais previamente submetidos ao implante bilateral de cânula-guia em direção a RVLM e implante de cânulas na artéria e veia femorais. No dia do experimento, após um período de adaptação do animal frente às novas condições ambientais, o barorreflexo foi testado (resposta controle) através de injeção intravenosa de doses pressoras de fenilefrina (0.5µg/0.1ml). Após o retorno dos parâmetros cardiovasculares aos valores basais, o CP 99,994 (5 µM/100nl) foi microinjetado bilateralmente na RVLM. Dez, vinte, trinta, quarenta e cinco e sessenta minutos após a microinjeção do CP 99,994, o barorreflexo foi novamente estimulado com fenilefrina, e essas respostas foram comparadas com a resposta controle.

14.8) Efeito da microinjeção bilateral de CP 99,994 na RVLM sobre as respostas cardiovasculares induzidas pela estimulação do quimiorreflexo em ratos espontaneamente hipertensos não-anestesiados

Com o objetivo de avaliar o papel da Substância P endógena na RVLM sobre as respostas cardiovasculares induzidas pela estimulação do quimiorreflexo na

hipertensão arterial, esse reflexo foi avaliado antes e após a microinjeção bilateral do antagonista da Substância P, CP 99,994 na RVLM em ratos SHR. Para isso foram utilizados animais previamente submetidos ao implante bilateral de cânula-guia em direção a RVLM e implante de cânulas na artéria e veia femorais. No dia do experimento, após um período de adaptação do animal frente às novas condições ambientais, o quimiorreflexo foi testado (resposta controle) através de injeção intravenosa de KCN (40 μ g/0.1ml). Após o retorno dos parâmetros cardiovasculares aos valores basais, o CP 99,994 (5 μ M/100nl) foi microinjetado bilateralmente na RVLM. Dez, vinte, trinta, quarenta e cinco e sessenta minutos após a microinjeção do CP 99,994, o quimiorreflexo foi novamente estimulado com KCN, e essas respostas foram comparadas com a resposta controle.

RESULTADOS

1) Efeitos cardiovasculares induzidos pela microinjeção unilateral de doses crescentes do Fragmento N-terminal de Substância P [SP-(1-7)] na RVLM em ratos normotensos não-anestesiados.

A figura 1 corresponde a um traçado representativo de dois animais do grupo estudado mostrando as alterações da pressão arterial pulsátil (PAP, mmHg), pressão arterial média (PAM, mmHg) e de frequência cardíaca (FC, bpm) em resposta a microinjeção de SP-(1-7) na RVLM na dose de 0.5 nmol. Podemos observar que no **rato A** a SP-(1-7) promoveu apenas bradicardia, enquanto no **rato B** além da bradicardia a microinjeção de SP-(1-7) promoveu aumento da pressão arterial.

A figura 2 mostra os valores médios do pico das alterações da PAM e FC induzidas pela microinjeção de SP-(1-7) na RVLM de animais Wistar não-anestesiados. Devido à diferença do efeito da microinjeção de SP-(1-7) sobre a pressão arterial, realizamos uma análise separada dos animais. No gráfico à esquerda estão plotados os valores dos parâmetros cardiovasculares dos ratos Wistar em que alteração da pressão arterial não foi observada em nenhuma dose estudada (**Grupo A**). Nesse grupo apenas as doses de 10 pmol e 0,5 nmol produziram uma pequena, mas significativa queda da frequência cardíaca quando comparadas ao grupo veículo (solução tampão fosfato) ($+2,5 \pm 1,4$ vs. $-14,3 \pm 5,3$ e $-15,7 \pm 4,4$ bpm, respectivamente). No gráfico do meio estão plotados os valores dos parâmetros cardiovasculares dos ratos Wistar (**Grupo B**) nos quais a SP-(1-7) promoveu aumento da pressão arterial e bradicardia. Nesse grupo observamos que a SP-(1-7), nas doses de 0,5 e 1nmol, promoveu resposta pressora ($+29,3 \pm 4,4$ e $+23,0 \pm 6,0$

mmHg) e bradicardia ($-30,7 \pm 3,1$ e $-50,5 \pm 28,5$ bpm) quando comparado ao grupo controle ($+2,3 \pm 0,7$ mmHg e $+11 \pm 7,5$ bpm). No gráfico a direita estão plotados os valores dos parâmetros cardiovasculares de todos os animais nos quais microinjetamos SP-(1-7), ou seja, **Grupo A + Grupo B**. Podemos observar que, considerando o grupo como um todo, não houve alteração significativa da pressão arterial em nenhuma dose utilizada, e nas doses de 10 pmol; 0,5 e 1 nmol, a SP-(1-7) promoveu bradicardia quando comparado ao grupo tampão fosfato ($+6,1 \pm 3,4$ vs. $-9,8 \pm 4,2$; $-21,2 \pm 3,9$ e $-30,0 \pm 17,7$ bpm, respectivamente) (tabela 1).

Com o propósito de investigarmos se essa diferença do efeito da SP-(1-7) sobre a pressão arterial era devido à microinjeção em diferentes subregiões da RVLM, realizamos o mapeamento do espalhamento do corante Alcian Blue microinjetado na RVLM. A figura 3 mostra a distribuição do corante nos diferentes níveis ântero-posterior da RVLM, dos 10 animais do grupo SP-(1-7) estudados. O painel à esquerda mostra o grupo de animais em que não houve resposta pressora (Grupo A) e o painel à direita o grupo de animais nos quais houve resposta pressora (Grupo B) após a microinjeção de SP-(1-7) na RVLM. Podemos observar uma discreta diferença na distribuição do corante entre esses dois grupos de animais. No Grupo A a maior concentração do corante se encontra nos níveis mais caudais da RVLM (-12,30 a -12,80 mm posterior ao Bregma). No Grupo B a maior concentração do corante se encontra nos níveis mais rostrais da RVLM (-11,96 a -12,72 mm posterior ao Bregma).

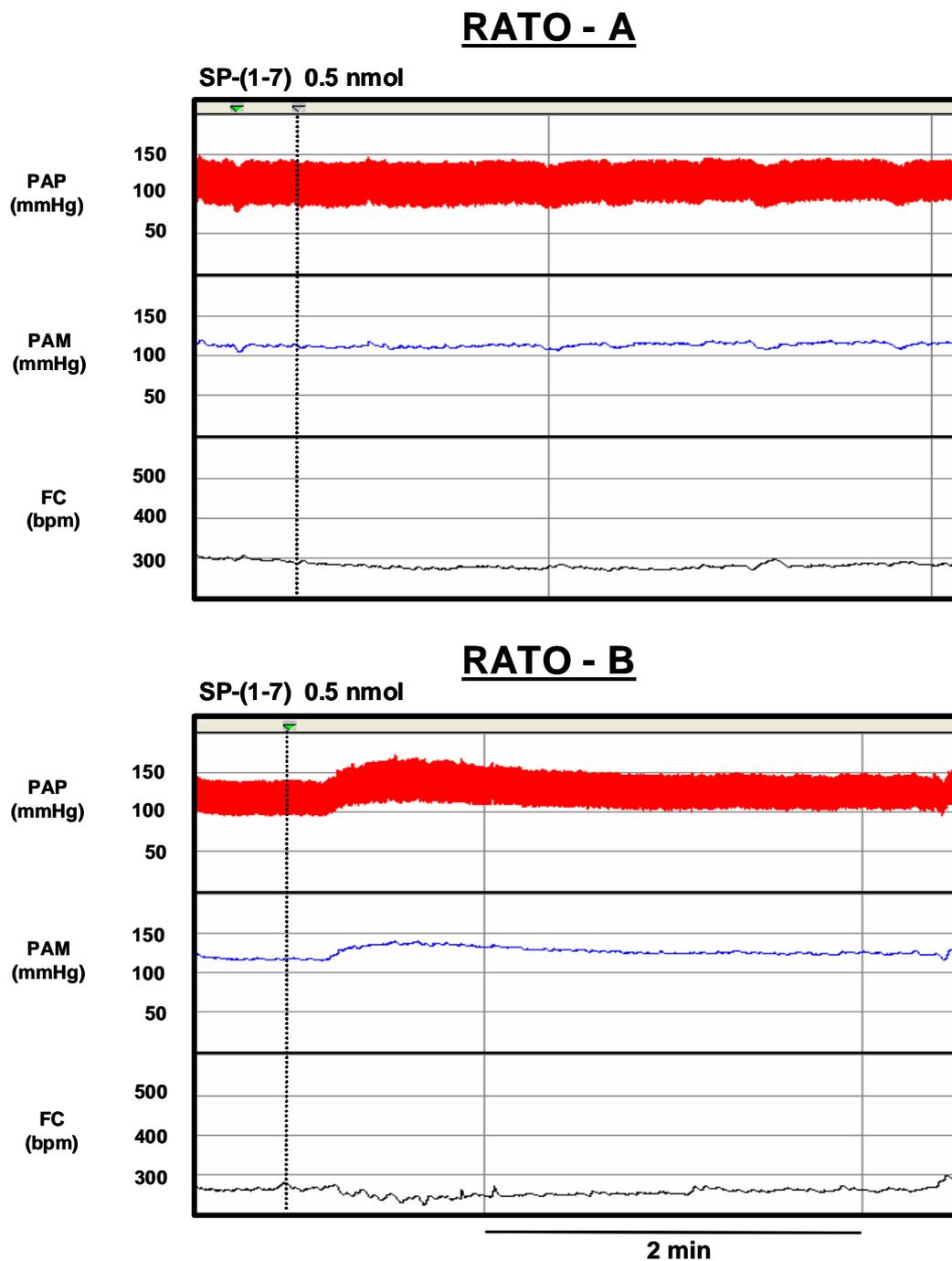


Figura 1: Traçados representativos de dois animais do grupo estudado, mostrando as alterações na pressão arterial pulsátil (PAP, mmHg), pressão arterial média (PAM, mmHg) e frequência cardíaca (FC, bpm), em resposta à microinjeção unilateral de SP-(1-7) (0.5nmol/100nl) na RVLM de ratos Wistar não-anestesiados.

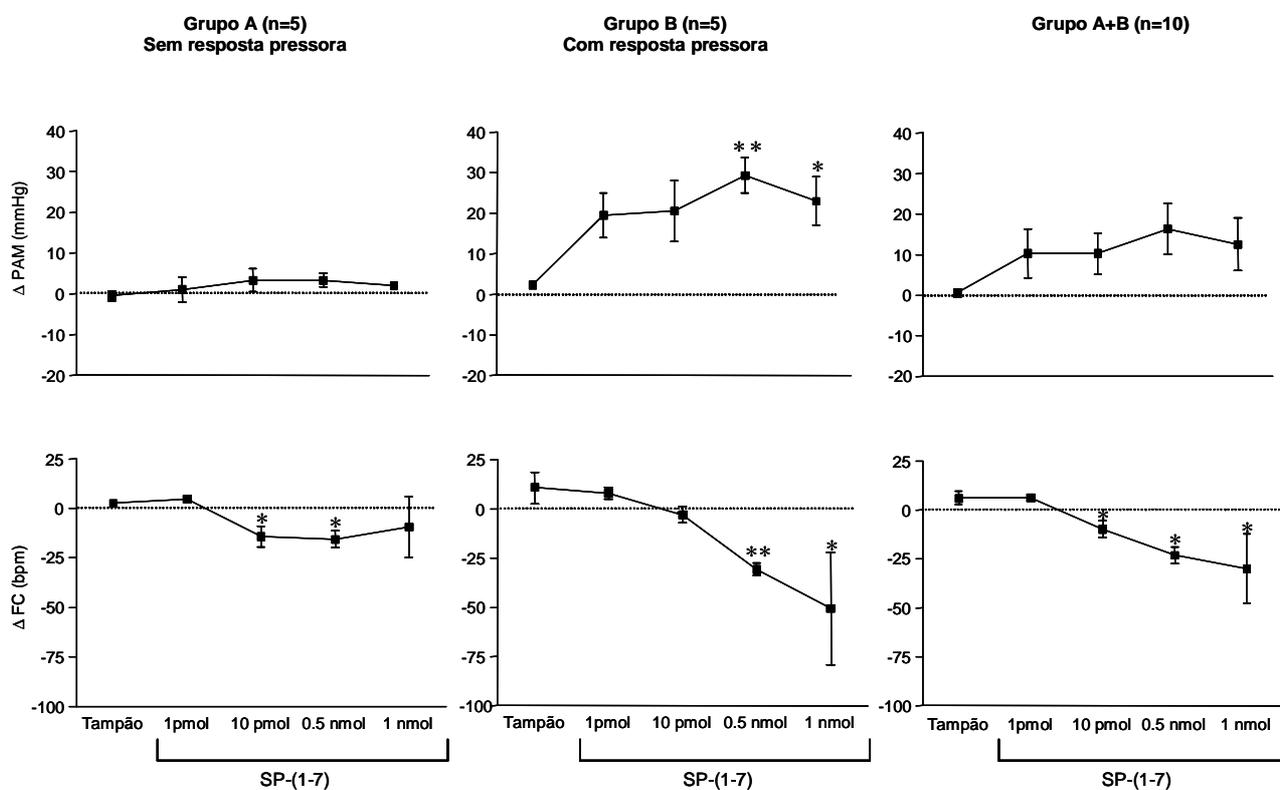
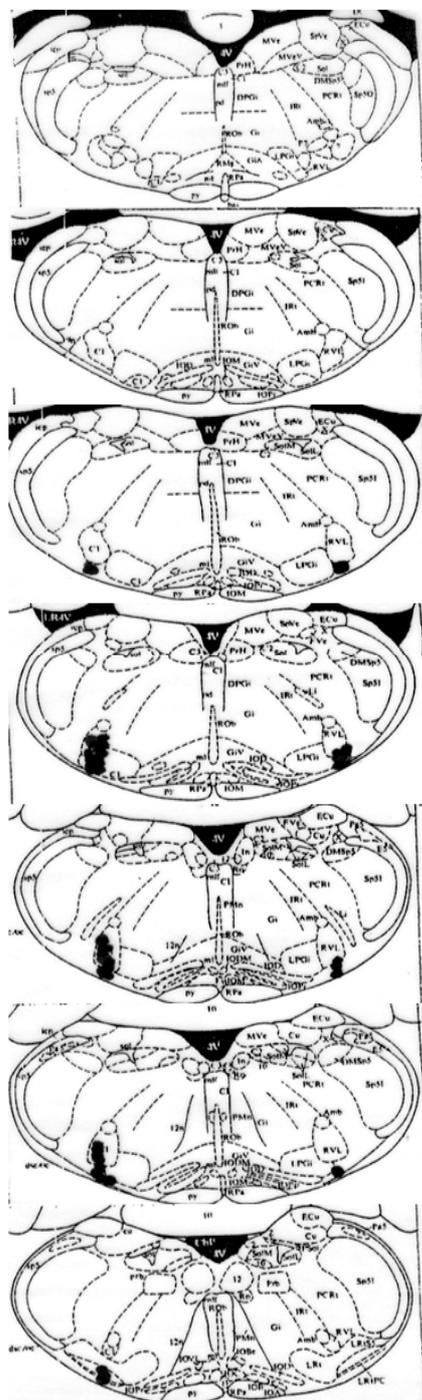


Figura 2: Alterações na pressão arterial média (Δ PAM, mmHg) e frequência cardíaca (Δ FC, bpm) induzidas pela microinjeção unilateral de Solução Tampão Fosfato (0.01M) ou SP-(1-7) (1 e 10 pmol, 0,5 e 1nmol/100nl) na RVLm de ratos Wistar não-anestesiados. (*) e (**) Diferença significativa em relação ao grupo Solução Tampão Fosfato (** $p < 0.01$; * $p < 0.05$; ANOVA).

Grupo A
Sem resposta pressora – SP(1-7)



Bregma –11,60 mm

Bregma –11,80 mm

Bregma –11,96 mm

Bregma –12,30 mm

Bregma –12,72 mm

Bregma –12,80 mm

Bregma –13,24 mm

Grupo B
Com resposta pressora – SP(1-7)

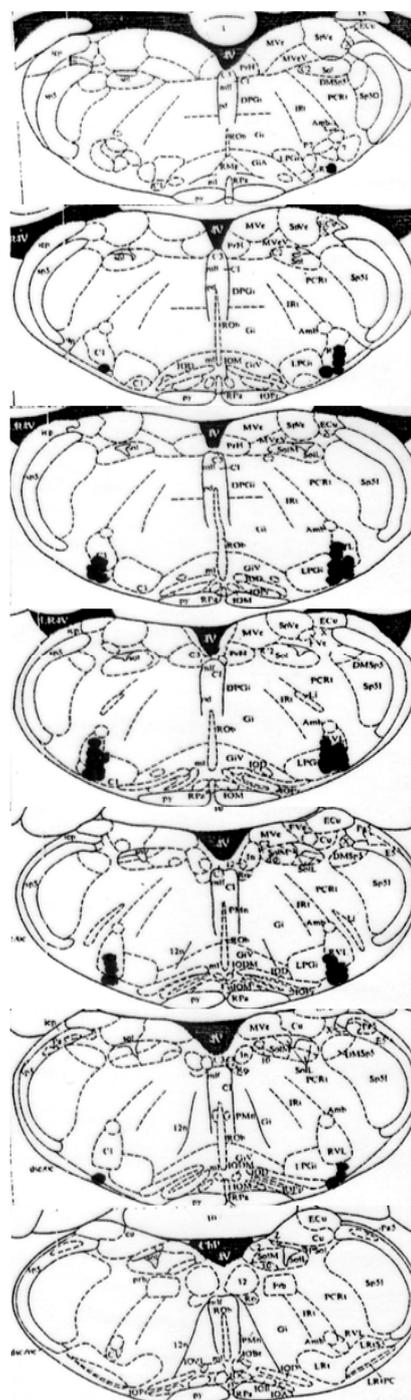


Figura 3: Representação esquemática de uma seqüência de cortes transversais do tronco cerebral que corresponde a RVL, mostrando o espalhamento do corante Alcian Blue microinjetado na RVL dos 10 animais do grupo SP-(1-7). (Modificado de Paxinos e Watson, 1986).

2) Efeitos cardiovasculares induzidos pela microinjeção unilateral de doses crescentes do Fragmento C-terminal de Substância P [SP-(5-11)] na RVLM em ratos normotensos não-anestesiados.

A figura 4 corresponde a um traçado representativo de um animal do grupo estudado mostrando as alterações da pressão arterial pulsátil (PAP, mmHg), pressão arterial média (PAM, mmHg) e de frequência cardíaca (FC, bpm) em resposta a duas microinjeções consecutivas de SP-(5-11) na RVLM na dose de 10 pmol. Podemos observar que o efeito cardiovascular promovido pela primeira microinjeção de SP-(5-11) não foi observado na segunda microinjeção da mesma dose desse fragmento C-terminal de SP na RVLM, 4 horas após o término do efeito da primeira microinjeção. Devido ao efeito taquifilático desse fragmento C-terminal de SP os efeitos cardiovasculares das diferentes doses foram estudados em grupo de animais distintos.

A figura 5 corresponde a um traçado representativo de um animal do grupo estudado mostrando as alterações dos parâmetros cardiovasculares em resposta a microinjeção de SP-(5-11) na RVLM na dose de 1 nmol. Podemos observar que nessa dose a SP-(5-11) promoveu aumento da pressão arterial e bradicardia.

A figura 6 mostra os valores médios do pico das alterações da PAM e FC induzidas pela microinjeção de SP-(5-11) na RVLM de animais Wistar não-anestesiados. As duas doses utilizadas desse fragmento C-terminal de SP (10 pmol e 1 nmol/100nl) promoveram aumento da pressão arterial e bradicardia quando comparadas ao grupo da solução tampão fosfato ($+0,5 \pm 1,5$ vs. $+27,2 \pm 9,4$ e

+24,6±9,0 mmHg; 2±4 vs. -20±6 e -21±11 bpm, respectivamente) (tabela 2).

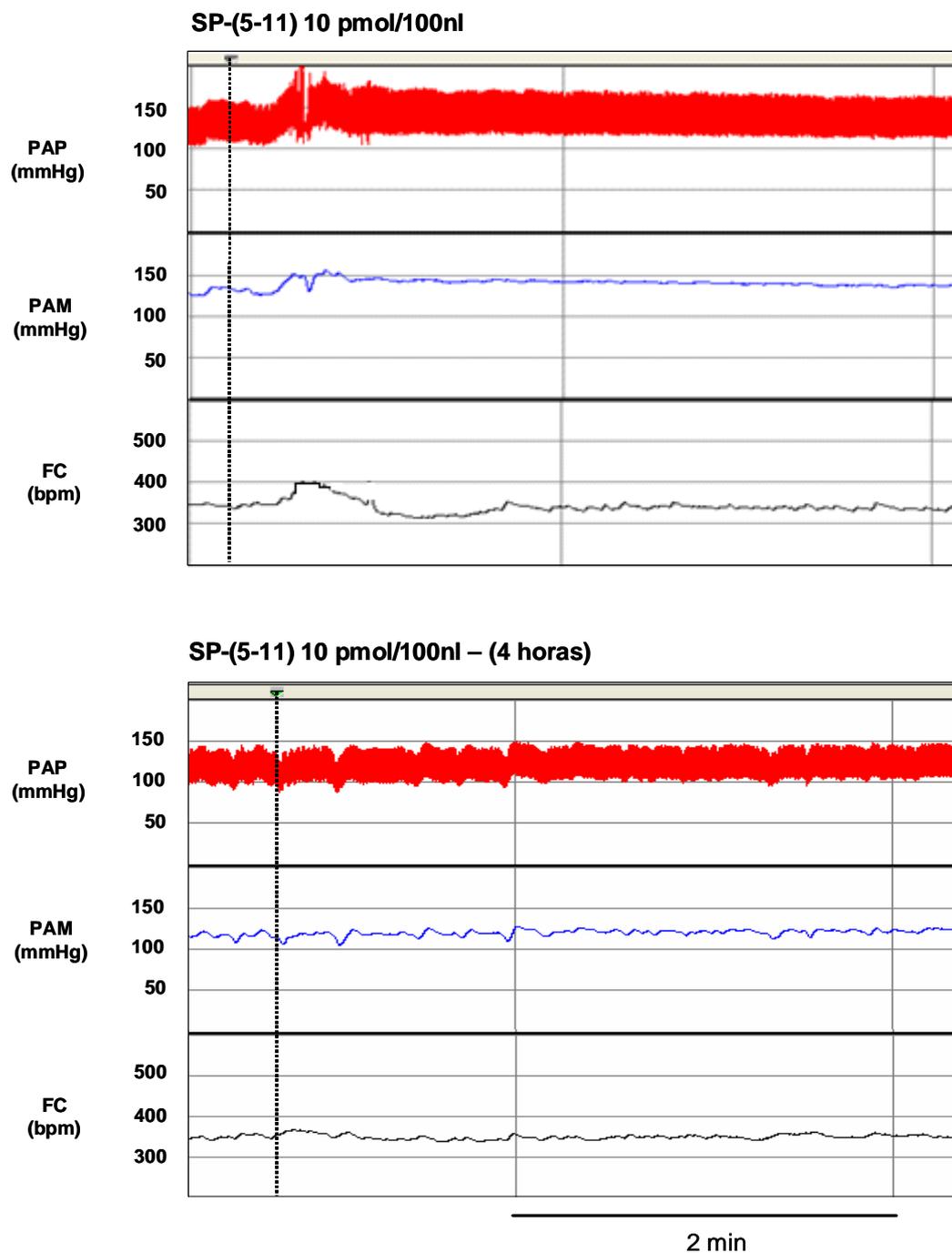


Figura 4: Traçados representativos de um animal do grupo estudado, mostrando as alterações na pressão arterial pulsátil (PAP, mmHg), pressão arterial média (PAM, mmHg) e frequência cardíaca (FC, bpm), em resposta as microinjeções unilaterais consecutivas de SP-(5-11) (10 pmol/100nl) na RVLM de rato Wistar não-anestesiado.

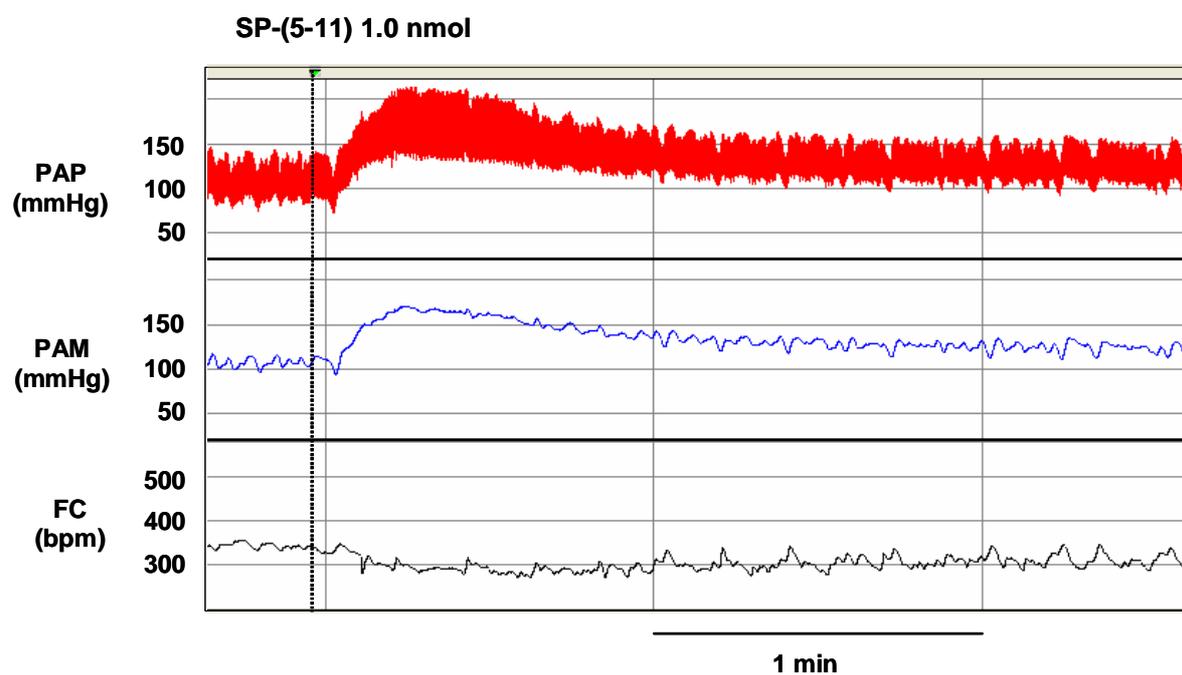


Figura 5: Traçado representativo de um animal do grupo estudado, mostrando as alterações na pressão arterial pulsátil (PAP, mmHg), pressão arterial média (PAM, mmHg) e frequência cardíaca (FC, bpm), em resposta à microinjeção unilateral de SP-(5-11) (1 nmol/100nl) na RVLM em ratos Wistar não-anestesiados.

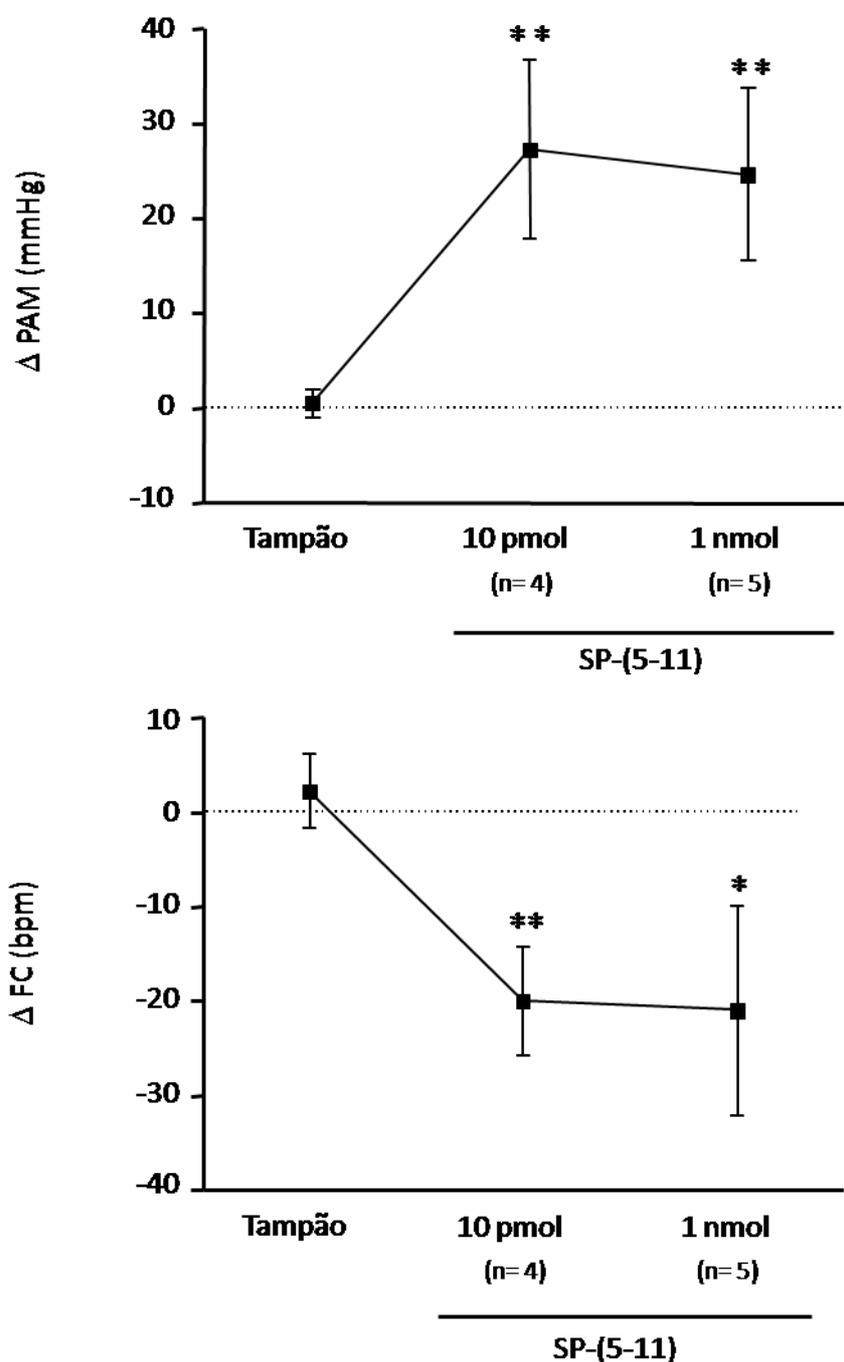


Figura 6: Alterações na pressão arterial média (Δ PAM, mmHg) e frequência cardíaca (Δ FC, bpm) induzidas pela microinjeção unilateral de Solução Tampão Fosfato (0.01M) ou SP-(5-11) (10 pmol e 1nmol/100nl) na RVLm de ratos Wistar não-anestesiados. (*) e (**) Diferença significativa em relação ao grupo Solução Tampão Fosfato (** $p < 0.01$; * $p < 0.05$; ANOVA e Teste- t não-pareado).

3) Efeito do bloqueio do componente vagal sobre o aumento da sensibilidade do barorreflexo induzido pela microinjeção bilateral de Substância P na RVLM em ratos Wistar não-anestesiados.

Com o objetivo de avaliar se o efeito facilitatório promovido pela Substância P sobre o barorreflexo na RVLM, por nós observado em animais normotensos, é dependente da modulação do Sistema Nervoso Autônomo Parassimpático Cardíaco, esse reflexo foi avaliado antes e após a microinjeção bilateral de Substância P na RVLM durante bloqueio vagal.

Para estimar a duração do bloqueio do componente parassimpático do barorreflexo induzido pela metil-atropina em animais não-anestesiados, inicialmente o barorreflexo foi estimulado com injeção i.v. de fenilefrina antes e após a injeção intravenosa do antagonista colinérgico Metil-Atropina (1mg/Kg). Essas estimulações foram realizadas até que o valor da bradicardia barorreflexa após o bloqueio colinérgico retornasse aos valores semelhantes à bradicardia barorreflexa controle.

A tabela 1 mostra a análise da sensibilidade do barorreflexo pela razão entre as alterações de frequência cardíaca (ΔFC , bpm) e de pressão arterial média (ΔPAM , mmHg) como também pela razão entre as alterações do intervalo de pulso (ΔIP , bpm/mms) e da pressão arterial média (ΔPAM , mmHg) em resposta à injeção i.v. de fenilefrina (0.5 μ g/0.1ml) antes e 10, 30, 60, 90, 120 e 150 minutos após o bloqueio vagal. Podemos observar que pela análise do índice $\Delta FC/\Delta PAM$ a redução da bradicardia barorreflexa permaneceu significativa até 120 minutos após a administração de Metil-Atropina (1,8 \pm 0,1 vs. 1,3 \pm 0,1 bpm/mmHg). Através da análise da bradicardia barorreflexa pelo índice $\Delta IP/\Delta PAM$ essa redução da bradicardia

barorreflexa permaneceu significativa até os 150 minutos após a injeção i.v. do antagonista colinérgico ($1,1 \pm 0,1$ vs. $0,70 \pm 0,1$ ms/mmHg) (tabela 3).

O valor basal de pressão arterial e frequência cardíaca dos animais, nos quais avaliamos a ação da Substância P sobre o barorreflexo durante bloqueio vagal, foi 96 ± 2 mmHg e 362 ± 9 bpm e após a injeção venosa de Metil-Atropina, como esperado, houve aumento da frequência cardíaca (468 ± 12 bpm) sem alteração significativa da pressão arterial (103 ± 4 mmHg) (tabela 4).

A figura 7 corresponde a um traçado representativo de um animal do grupo estudado, mostrando os efeitos sobre pressão arterial pulsátil (PAP, mmHg), pressão arterial média (PAM, mmHg) e frequência cardíaca (FC, bpm), induzidos pela estimulação do barorreflexo, através da injeção i.v. de fenilefrina ($0,5 \mu\text{g}/0,1\text{ml}$) antes e após (10, 30 e 60 minutos) a microinjeção bilateral de Substância P (1 pmol/100nl) na RVLM sob o bloqueio vagal com Metil-Atropina ($1\text{mg}/\text{Kg}$). Podemos observar que mesmo sob o efeito do bloqueio vagal a Substância P promoveu aumento da bradicardia barorreflexa.

A figura 8 mostra os valores médios da razão entre as alterações de frequência cardíaca, medida em intervalo de pulso (ΔIP , ms) e de pressão arterial média (ΔPAM , mmHg) em resposta à injeção i.v. de fenilefrina ($0,5 \mu\text{g}/0,1\text{ml}$) após o bloqueio vagal e 10, 20, 30, 45 e 60 minutos após a microinjeção bilateral de Substância P na RVLM. Podemos observar que a microinjeção bilateral de Substância P na RVLM promoveu aumento da sensibilidade do barorreflexo mesmo sob bloqueio parassimpático a partir dos 30 minutos ($0,16 \pm 0,03$ vs. $0,37 \pm 0,04$; $0,45 \pm 0,1$ e $0,48 \pm 0,1$ ms/mmHg, 30, 45 e 60 minutos, respectivamente). A figura 8B mostra que o veículo Salina não promoveu nenhuma alteração significativa na bradicardia barorreflexa após ser microinjetada na RVLM sob bloqueio vagal

($0,19 \pm 0,02$ vs. $0,15 \pm 0,01$; $0,17 \pm 0,02$; $0,21 \pm 0,03$; $0,27 \pm 0,02$ e $0,31 \pm 0,03$ ms/mmHg)
(tabela 4 e 5).

Tabela 01: Alterações na sensibilidade da bradicardia barorreflexa $[(\Delta FC/\Delta PAM, \text{bpm/mmHg})]$ e $[(\Delta IP/\Delta PAM, \text{ms/mmHg})]$ estimulada pela injeção i.v. de fenilefrina (0.5 $\mu\text{g}/0.1\text{ml}$) em ratos Wistar não-anestesiados, antes e após à injeção i.v. de Metil-Atropina (1mg/Kg) (n= 4). (*, **) Diferença significativa em relação ao controle. (** $p < 0.01$; * $p < 0.05$; ANOVA e Teste-*t* pareado).

Índice de Sensibilidade Barorreflexa		
	$[\Delta FC/\Delta PAM]$ (bpm/mmHg)	$\Delta IP/\Delta PAM$ (ms/mmHg)
Controle	1.8 \pm 0.1	1.1 \pm 0.1
Após Metil-Atropina (1mg/Kg)		
10 min	0.4 \pm 0.2 **	0.14 \pm 0.05 **
30 min	0.7 \pm 0.2 **	0.22 \pm 0.05 **
60 min	0.7 \pm 0.1 **	0.26 \pm 0.01 **
90 min	0.8 \pm 0.1 **	0.34 \pm 0.1 **
120 min	1.3 \pm 0.1 *	0.61 \pm 0.1 **
150 min	1.4 \pm 0.1	0.70 \pm 0.1 **

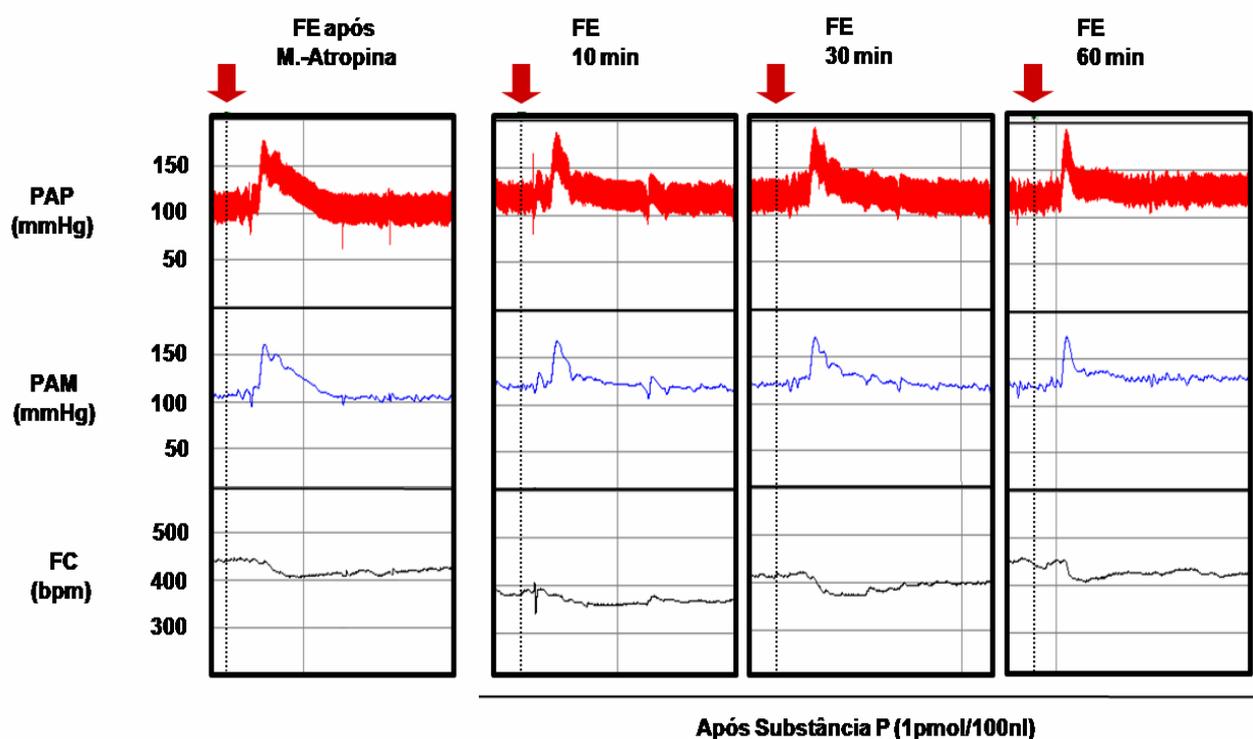


Figura 7: Traçado representativo de um animal do grupo estudado, mostrando as alterações na pressão arterial pulsátil (PAP, mmHg), pressão arterial média (PAM, mmHg) e frequência cardíaca (FC, bpm), em resposta à estimulação do barorreflexo com fenilefrina (0.5 $\mu\text{g}/0.1\text{ml}$, i.v.) antes e após a microinjeção bilateral de Substância P na RVLM sob bloqueio vagal com Metil-Atropina em ratos Wistar não-anestesiados.

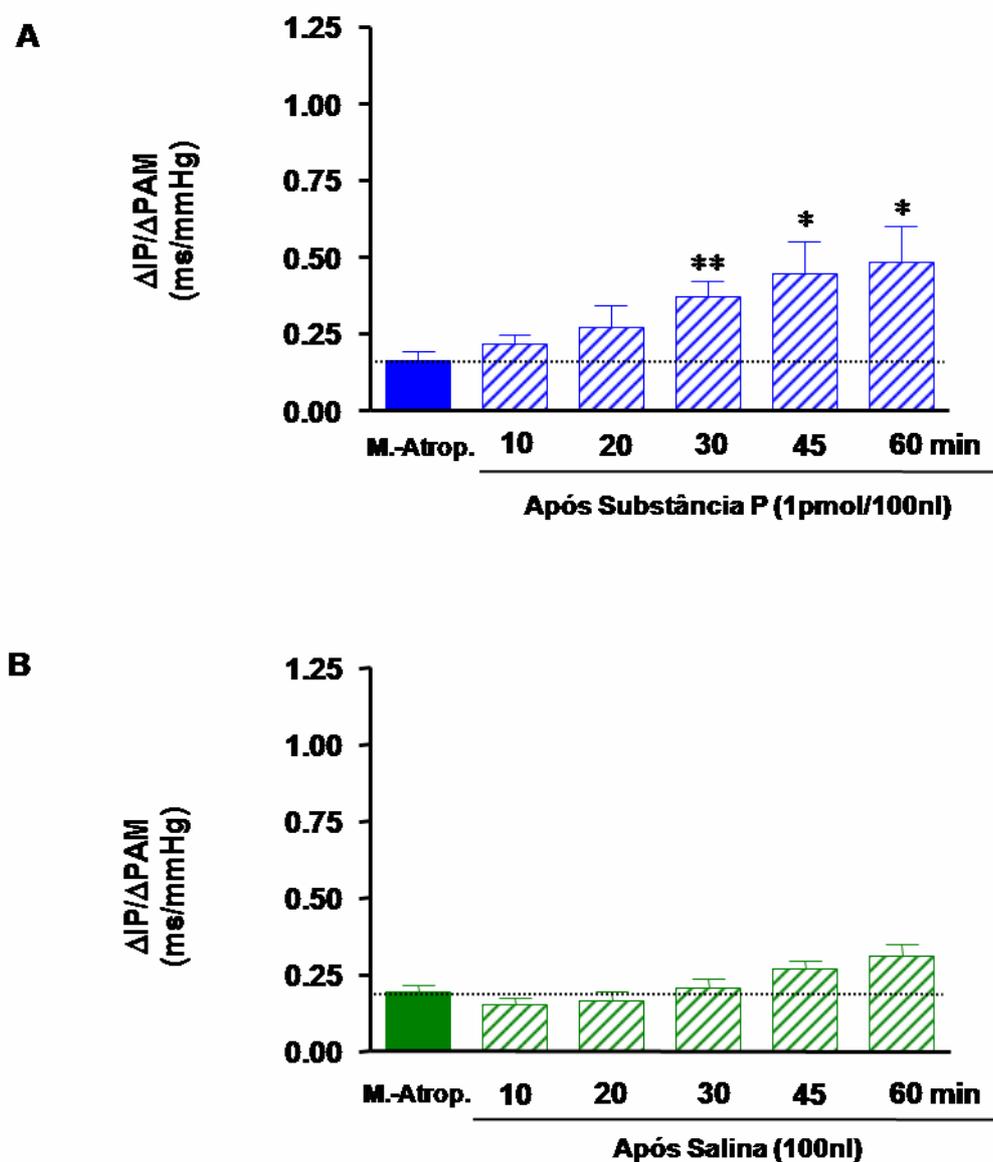


Figura 8: Alterações na sensibilidade da bradicardia barorreflexa ($\Delta IP/\Delta PAM$, ms/mmHg), estimulada pela injeção i.v. de fenilefrina (0.5 μ g/0.1ml) antes e após à microinjeção bilateral de Substância P (1pmol/100nl) na RVLM sob bloqueio vagal (**Painel A**, n = 7). (**Painel B**) Alterações na sensibilidade da bradicardia barorreflexo antes a após a microinjeção bilateral de Salina (NaCl 0,9%/100nl) na RVLM sob bloqueio vagal em ratos Wistar não-anestesiados (n=5). (**,*) Diferença significativa em relação ao período antes da microinjeção de Substância P ou Salina (** $p < 0.01$; * $p < 0.05$; ANOVA e Teste-*t* pareado).

4) Efeito do bloqueio do componente simpático cardíaco sobre o aumento da sensibilidade do barorreflexo induzido pela microinjeção bilateral de Substância P na RVLM em ratos Wistar não-anestesiados.

Com o objetivo de avaliar se o efeito facilitatório promovido pela Substância P sobre o barorreflexo na RVLM é dependente da modulação do Sistema Nervoso Autônomo Simpático Cardíaco, esse reflexo foi avaliado antes e após a microinjeção bilateral de Substância P na RVLM durante bloqueio simpático.

Para estimar a duração do bloqueio do componente simpático do barorreflexo induzido pelo atenolol em animais não-anestesiados, inicialmente o barorreflexo foi estimulado com injeção i.v. de fenilefrina antes e após a injeção intravenosa do antagonista β_1 -adrenérgico Atenolol ser administrado. Como observamos que o efeito promovido pelo bloqueio dos receptores β_1 -adrenérgicos sobre a bradicardia barorreflexa possuía uma duração de apenas 30 minutos, a injeção desse antagonista foi realizada a cada 30 minutos e a dose utilizada de cada injeção foi sempre a metade da anterior. Em geral foram realizadas 3 injeções i.v. de Atenolol em cada experimento nas doses de 2,0; 1,0 e 0,5 mg/Kg. A estimulação dos barorreceptores foi realizada por um período de até 2 horas após a primeira injeção i.v. de Atenolol, tempo semelhante ao do grupo experimental em que realizamos o bloqueio do componente parassimpático.

A tabela 2 mostra a análise da sensibilidade do barorreflexo pela razão entre as alterações de frequência cardíaca (ΔFC , bpm) e de pressão arterial média (ΔPAM , mmHg) como também pela razão entre as alterações do intervalo de pulso (ΔIP , bpm/mms) e de pressão arterial média (ΔPAM , mmHg) em resposta à injeção i.v. de fenilefrina (0.5 μ g/0.1ml) antes e 10, 60, 120 minutos após o bloqueio do

componente simpático cardíaco. Podemos observar que tanto pela análise $\Delta FC/\Delta PAM$ como $\Delta IP/\Delta PAM$ a redução da bradicardia barorreflexa permaneceu significativa até 120 minutos após a administração de Atenolol ($1,9 \pm 0,2$ vs. $1,1 \pm 0,1$ bpm/mmHg e $1,1 \pm 0,1$ vs. $0,70 \pm 0,1$ ms/mmHg, respectivamente) (tabela 6).

O valor basal de pressão arterial e frequência cardíaca dos animais nos quais avaliamos a ação da Substância P sobre o barorreflexo durante bloqueio simpático cardíaco, foi 107 ± 2 mmHg e 347 ± 14 bpm e após a injeção intravenosa de Atenolol, como esperado, houve diminuição da frequência cardíaca (314 ± 11 bpm) sem alteração da pressão arterial (111 ± 6 mmHg) (tabela 7).

A figura 9 corresponde a um traçado representativo de um animal do grupo estudado, mostrando os efeitos sobre pressão arterial pulsátil (PAP, mmHg), pressão arterial média (PAM, mmHg) e frequência cardíaca (FC, bpm), induzidos pela estimulação do barorreflexo, através da injeção i.v. de fenilefrina ($0,5 \mu\text{g}/0,1\text{ml}$) antes e após (10, 30 e 60 minutos) da microinjeção bilateral de Substância P na RVLM, sob bloqueio simpático com Atenolol ($2\text{mg}/\text{Kg}$). Podemos observar que sob o bloqueio do componente simpático cardíaco a Substância P não promoveu alteração na resposta bradicárdica barorreflexa.

A figura 10 mostra os valores médios da razão entre o intervalo de pulso (ΔIP , ms) e de pressão arterial média (ΔPAM , mmHg) em resposta à injeção i.v. de fenilefrina ($0,5 \mu\text{g}/0,1\text{ml}$) antes e 10, 20, 30, 45 e 60 minutos após a microinjeção de Substância P na RVLM sob bloqueio do componente simpático cardíaco do barorreflexo. Os dados indicam que sob o bloqueio simpático a Substância P não promoveu alteração da bradicardia barorreflexa ($0,55 \pm 0,1$ vs. $0,77 \pm 0,1$; $0,52 \pm 0,1$; $0,66 \pm 0,2$; $0,61 \pm 0,2$ e $0,61 \pm 0,2$ ms/mmHg) em nenhum dos tempos estudados (tabela 7).

Tabela 02: Alterações na sensibilidade do barorreflexo $[(\Delta FC/\Delta PAM, \text{ bpm/mmHg})]$ e $[(\Delta IP/\Delta PAM, \text{ ms/mmHg})]$ estimulado pela injeção i.v. de fenilefrina (0.5 $\mu\text{g}/0.1\text{ml}$) em ratos Wistar não-anestesiados, antes e após à injeção i.v. de Atenolol (2,1 e 0.5 mg/Kg) (n= 4). (*, **) Diferença significativa em relação ao controle. (** $p < 0.01$; * $p < 0.05$; ANOVA e Teste-t pareado).

Índice de Sensibilidade Barorreflexa		
	$[\Delta FC/\Delta PAM]$ (bpm/mmHg)	$\Delta IP/\Delta PAM$ (ms/mmHg)
Controle	1.9 \pm 0.2	1.10 \pm 0.11
Após Atenolol		
10 min	1.0 \pm 0.1 **	0.65 \pm 0.07 **
30 min	1.3 \pm 0.1 **	0.74 \pm 0.03 *
60 min	1.1 \pm 0.1 *	0.68 \pm 0.04 *
90 min	1.2 \pm 0.2 **	0.71 \pm 0.14 *
120 min	1.1 \pm 0.1 *	0.67 \pm 0.07 *
150 min	2.0 \pm 0.5	1.40 \pm 0.40

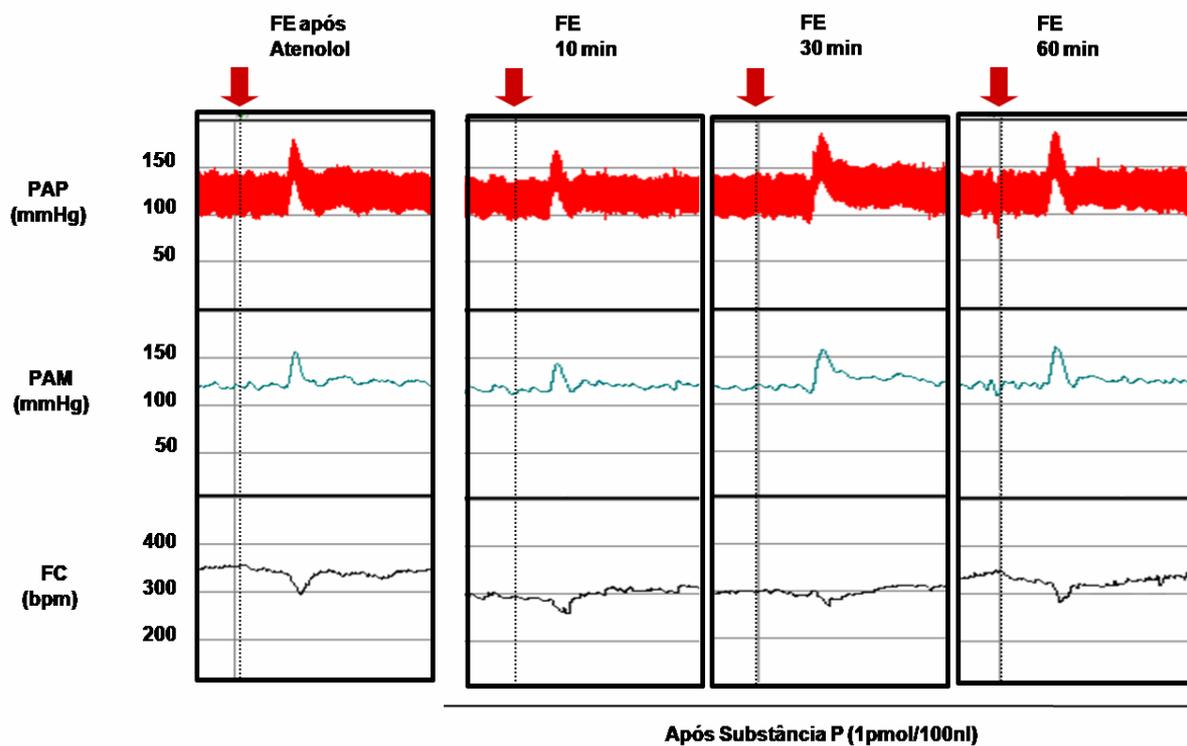


Figura 9: Traçado representativo de um animal do grupo estudado, mostrando as alterações na pressão arterial pulsátil (PAP, mmHg), pressão arterial média (PAM, mmHg) e frequência cardíaca (FC, bpm), em resposta à estimulação do barorreflexo com fenilefrina (0.5 $\mu\text{g}/0.1\text{ml}$, i.v.) antes e após a microinjeção bilateral de Substância P na RVLM sob bloqueio simpático cardíaco com Atenolol em ratos Wistar não-anestesiados.

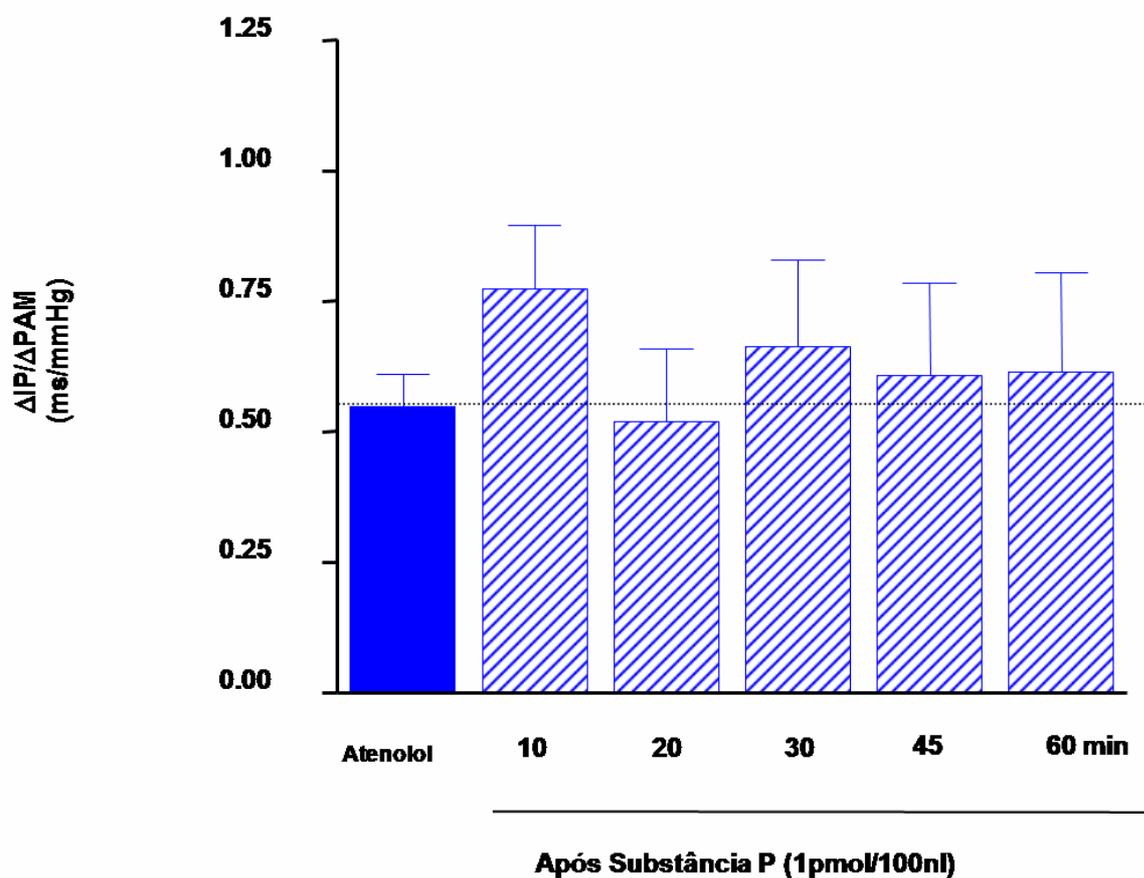


Figura 10: Alterações na sensibilidade da bradicardia barorreflexa ($\Delta IP/\Delta PAM$, ms/mmHg), estimulada pela injeção i.v. de fenilefrina (0.5 μ g/0.1ml) antes e após à microinjeção bilateral de Substância P (1pmol/100nl) na RVLM sob bloqueio simpático cardíaco com Atenolol em ratos Wistar (n = 5) não-anestesiados. (Teste-t pareado).

5) Ensaio de Imunofluorescência do receptor de Substância P na RVLM.

5.1) Imunorreatividade para receptor NK1 na RVLM.

Para avaliarmos se os efeitos fisiológicos sobre os parâmetros e reflexos cardiovasculares promovidos pela Substância P na RVLM em ratos não-anestesiados, por nós observados, eram devido sua ação em seu receptor NK1 nós identificamos onde este receptor encontrava-se presente nessa área. Podemos observar na figura 11B imunorreatividade ao anticorpo anti-NK1 na RVLM tanto no corpo neuronal (setas finas) quanto no seu prolongamento axonal (seta cheia). Essa mesma figura mostra ainda dois controles utilizados nesse estudo. No primeiro controle (C) avaliamos se o tecido utilizado, bulbo, apresenta auto-fluorescência e podemos observar a inexistência de auto-fluorescência desse tecido. No segundo controle (D) os cortes foram incubados apenas com anticorpo secundário, a fim de averiguar se o anticorpo secundário promove marcação. Da mesma forma que no controle anterior, não houve marcação. Esse segundo controle foi repetido em experimentos seguintes e será apresentado nas figuras que se seguem. Em (E) podemos observar um corte adjacente, aos cortes utilizados na imunofluorescência, que foi corado através da Técnica de Nissl com vermelho neutro 1% para localização da área estudada, a RVLM 12,8 mm posterior ao Bregma.

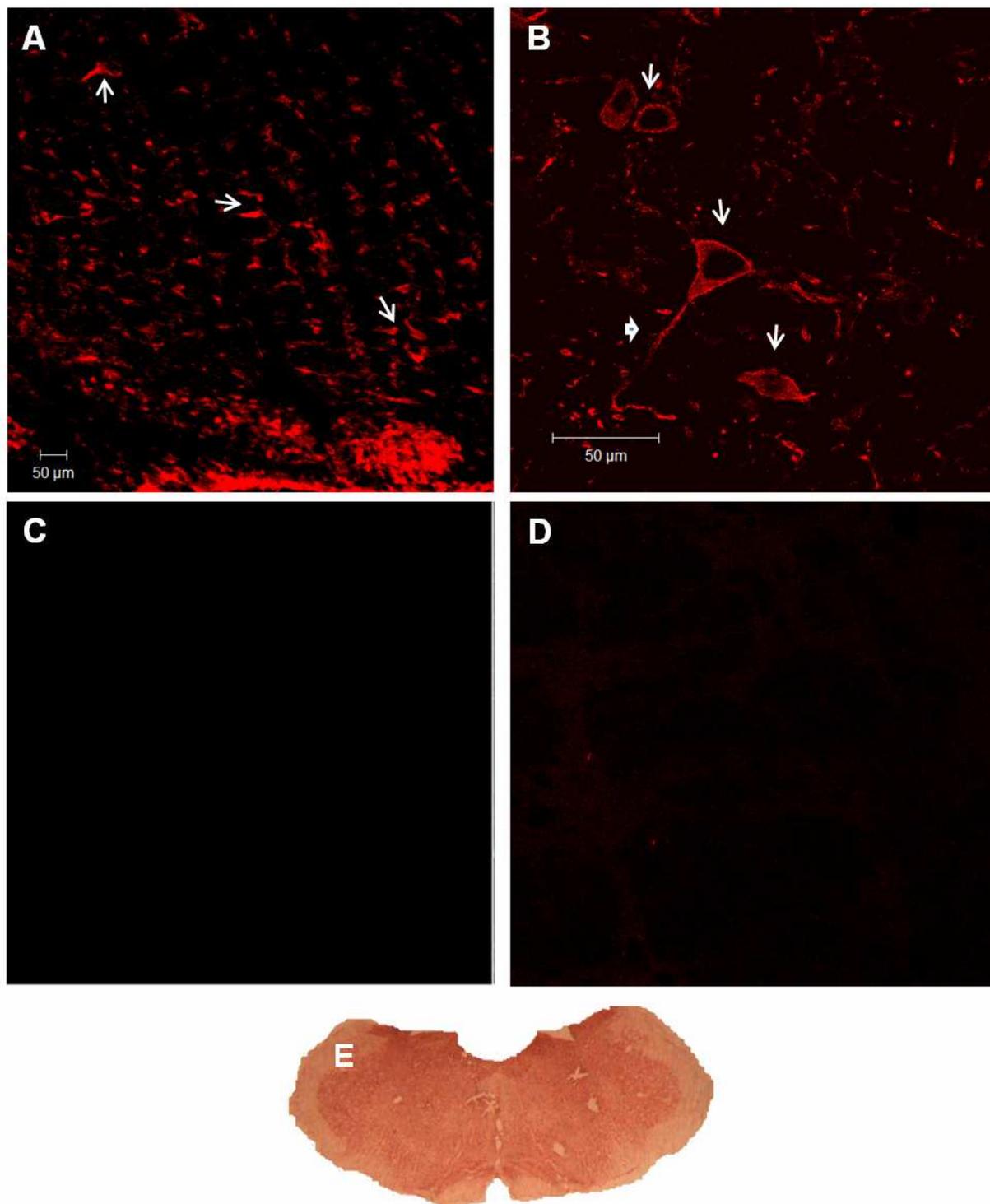


Figura 11: Imagens de imunofluorescência para o receptor NK-1 na área ventrolateral rostral do bulbo (RVLM), em **(A)** imagem obtida com objetiva 10x e **(B)** imagem obtida com objetiva 40x. **(C)** e **(D)** imagens controle mostrando ausência de marcação no ensaio realizado sem anticorpo e apenas com anticorpo secundário respectivamente. **(E)** Fotomicrografia de uma secção transversal do tronco cerebral de um animal representativo que corresponde a RVLM (-12.8 mm do Bregma). (Escala da barra: 50 μm)

5.2) Identificação do tipo celular que expressa o receptor NK1 na RVLM.

Com objetivo de se identificar em que tipo de célula, particularmente se neurônio ou célula glial (astrócito), o receptor NK1 encontra-se expresso na RVLM, fatias dessa área foram incubados com: a) anticorpo anti-NK1 e anti-Neu-N com Draq-5 ou b) com anticorpo anti-NK1 e anti-GFAP. O anti-Neu-N é um anticorpo para uma proteína sintetizada seletivamente em neurônios e está associado ao composto fluorescente Alexa 488. O Draq-5 é uma substância fluorescente que se liga especificamente a segmentos do DNA, assim identificando o núcleo das células. O anti-GFAP é um anticorpo que se liga a principal proteína estrutural presente em astrócitos. A figura 12 nos mostra que o receptor NK1 é expresso em neurônios na RVLM. Além disso, podemos observar na figura 13, que o receptor NK1 não está presente em astrócitos na RVLM. Estudos futuros utilizando marcadores para outros tipos de células gliais serão necessários para se avaliar a presença do receptor NK1 nessas células.

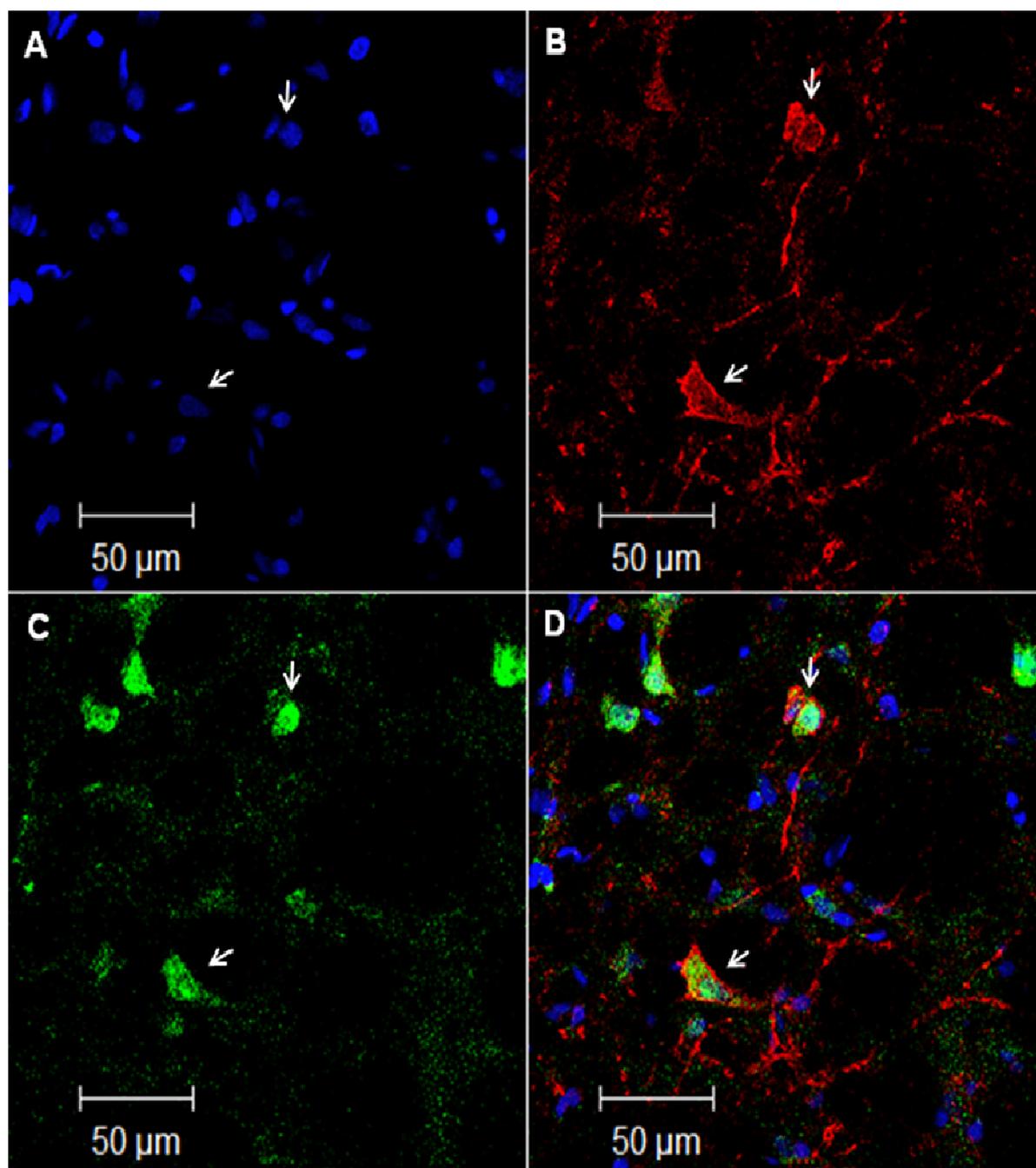


Figura 12: Identificação do receptor NK-1 em neurônios da área ventrolateral rostral do bulbo (RVLM). **(A)** imagem da marcação pelo Draq-5 em azul, em **(B)** imagem da marcação do anti-NK-1 em vermelho, em **(C)** marcação do anti-Neu-N em verde. A imagem **(D)** representa a superposição das três imagens. As imagens foram captadas com objetiva de 40x. Essas imagens ilustram o resultado obtido no grupo de animais estudados ($n = 4$). (Escala da barra: 50 μm)

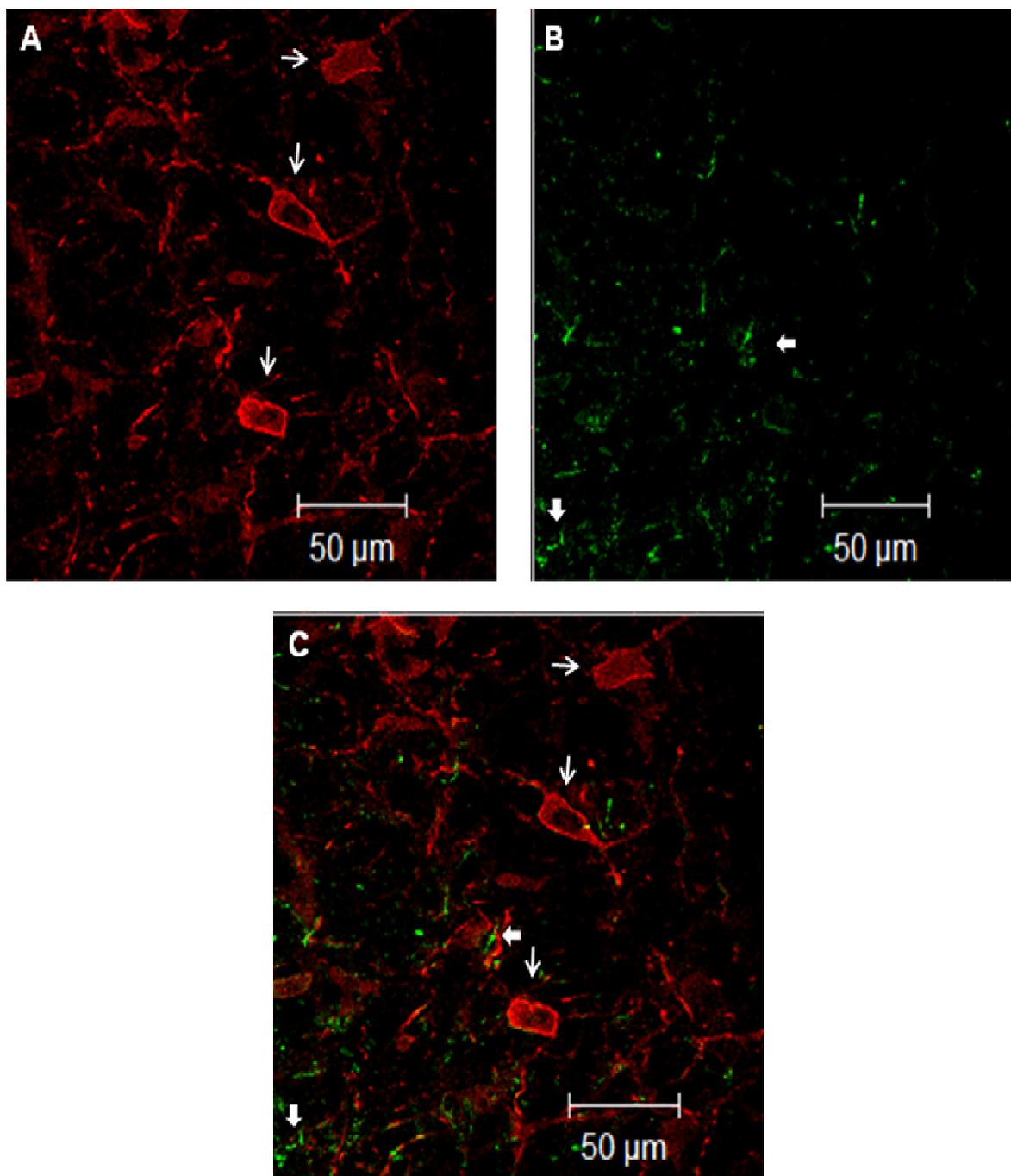


Figura 13: Ausência do receptor NK-1 em astrócitos da área ventrolateral rostral do bulbo (RVLM). **(A)** imagem da marcação do anti-NK-1 em vermelho, em **(B)** imagem da marcação do anti-GFAP em verde. A imagem **(C)** representa a superposição das duas imagens. As imagens foram captadas com objetiva de 40x. Essas imagens ilustram o resultado obtido no grupo de animais estudados (n = 3). (Escala da barra: 50 μm)

5.3) Identificação de imunorreatividade para o receptor NK1 em neurônios gabaérgicos e catecolaminérgicos na RVLM.

Com objetivo de identificar a localização de receptores NK1 em diferentes populações neuronais na RVLM, o ensaio de imunofluorescência foi realizado utilizando marcadores seletivos para neurônios gabaérgicos e catecolaminérgicos. A figura 14 mostra a imunofluorescência para o anticorpo para receptor NK1 (anti-NK1) em vermelho e para o anticorpo da enzima descarboxilase ácida glutâmica (anti-GAD67), enzima que catalisa a conversão de glutamato em GABA presente em corpos celulares, em verde. Pode ser observada uma intensa sobreposição da marcação dos dois anticorpos. Poucas células foram marcadas para anti-NK1 e não identificadas com anti-GAD67. Esse padrão se repetiu em todos os animais estudados, sugerindo que o receptor NK1 está expresso em neurônios gabaérgicos da RVLM.

A figura 15 mostra um ensaio realizado com anti-NK1, em vermelho, combinado com anticorpo para a enzima tirosina hidroxilase (anti-THase), enzima que sintetiza catecolaminas e desempenha um papel chave na fisiologia de neurônios adrenérgicos, em verde na RVLM. Podemos observar que também houve sobreposição da marcação entre esses dois anticorpos, porém essa sobreposição ocorreu em um menor número de células em comparação com aquela observada em neurônios gabaérgicos. Apesar de não ter sido realizada uma análise quantitativa entre esses ensaios, essa diferença pode ser visualizada. Esse padrão se repetiu em todos os animais estudados, sugerindo que o receptor NK1 também está expresso em neurônios catecolaminérgicos da RVLM.

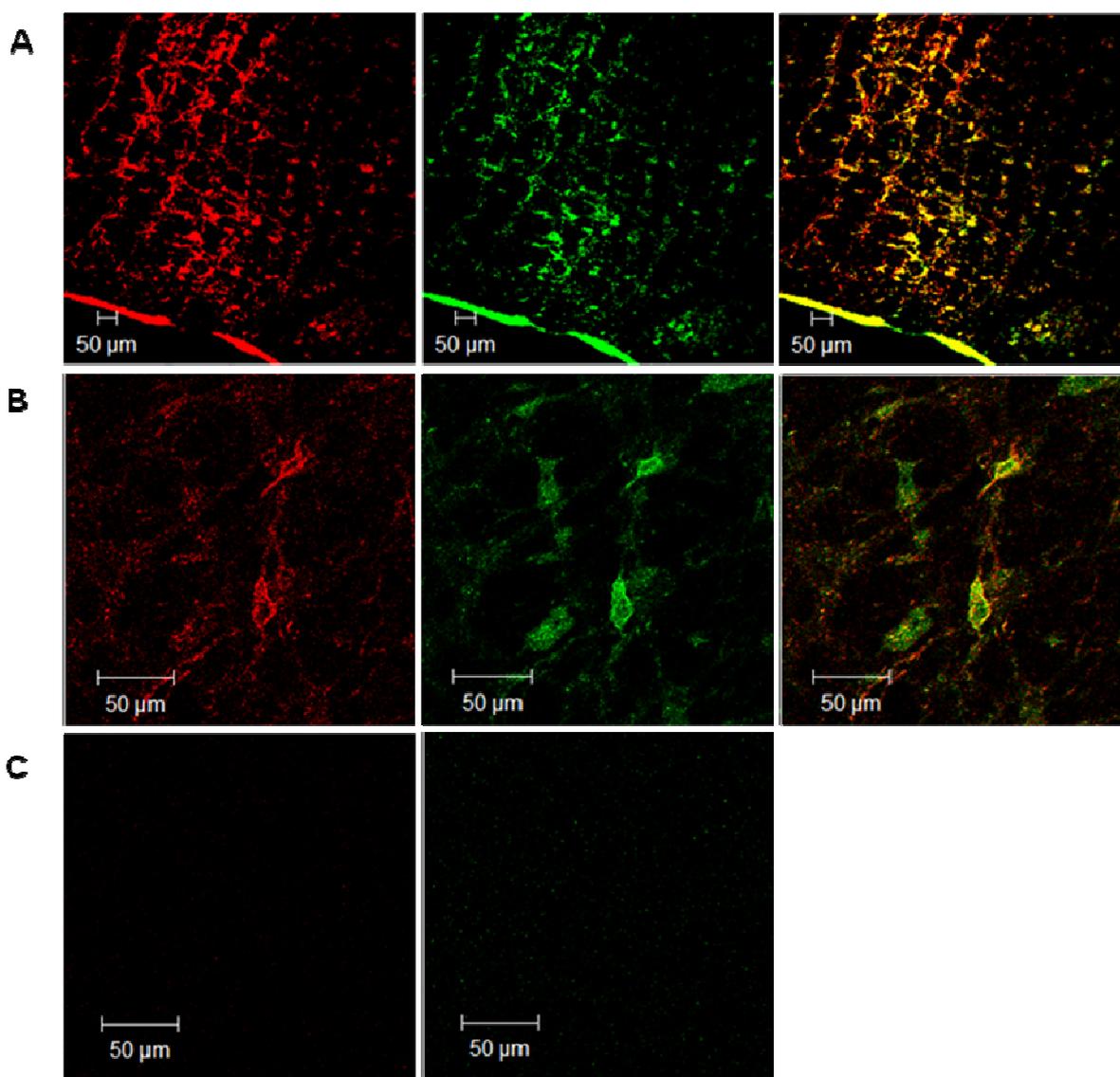


Figura 14: Identificação do receptor NK-1 em neurônios gabaérgicos na área ventrolateral rostral do bulbo (RVLM). Em vermelho marcação do anticorpo contra o receptor NK-1 (anti-NK1), em verde a marcação para o anticorpo contra a enzima descarboxilase ácida glutâmica (anti-GAD67) e à direita a sobreposição das imagens. A coloração amarela corresponde marcação na mesma célula. As imagens foram obtidas com objetiva 10x em **(A)** e com objetiva de 40x em **(B)**. Em **(C)** estão representados os respectivos controles. Essas imagens ilustram o resultado obtido no grupo de animais estudados ($n = 5$). (Escala da barra: 50 μm)

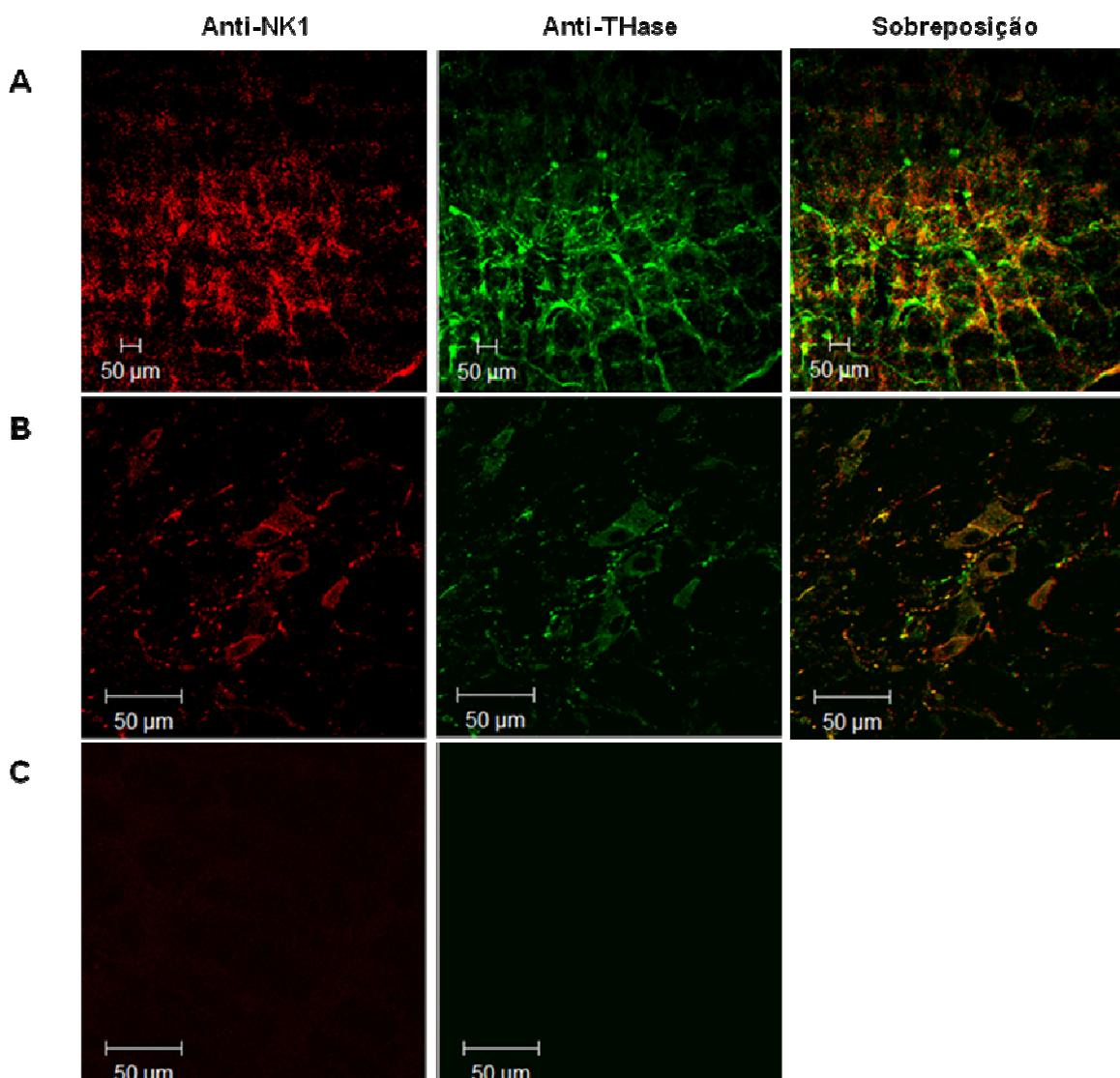


Figura 15: Identificação do receptor NK-1 em neurônios catecolaminérgicos na área ventrolateral rostral do bulbo (RVLM). Em vermelho marcação do anticorpo contra o receptor NK-1 (anti-NK1), em verde a marcação para o anticorpo contra a enzima tirosina hidroxilase (anti-THase) e à direita a sobreposição das imagens. A coloração amarela corresponde marcação na mesma célula. As imagens foram obtidas com objetiva 10x em **(A)** e com objetiva de 40x em **(B)**. Em **(C)** estão representados os respectivos controles. Essas imagens ilustram o resultado obtido no grupo de animais estudados ($n = 5$). (Escala da barra: 50 μm)

6) Efeito da microinjeção bilateral de Substância P na RVLM sobre as respostas cardiovasculares induzidas pela estimulação do barorreflexo em ratos espontaneamente hipertensos não-anestesiados.

Considerando que: a) a RVLM é uma área fundamental na via do barorreflexo, b) que a SP promoveu aumento na sensibilidade desse reflexo em animais normotensos, e ainda c) os estudos que sugerem que a função das taquicininas está alterada na hipertensão arterial, avaliamos também o papel da SP sobre o barorreflexo em animais hipertensos. Para isso estimulamos o barorreflexo com injeções intravenosas de fenilefrina (0.5 μ g/0.1ml) antes e 10, 20, 30, 45 e 60 minutos após a microinjeção bilateral de SP na RVLM de ratos SHR não-anestesiados.

A figura 16 corresponde a um traçado representativo de um animal do grupo estudado, mostrando os efeitos sobre pressão arterial pulsátil (PAP, mmHg), pressão arterial média (PAM, mmHg) e frequência cardíaca (FC, bpm), induzidos pela estimulação do barorreflexo, através da injeção i.v. de fenilefrina antes e após (30, 45 e 60 minutos) a microinjeção bilateral de Substância P (1pmol/100nl) na RVLM. Podemos observar que a estimulação dos barorreceptores com fenilefrina em animais SHR não-anestesiados produz pequena bradicardia reflexa. Após o retorno dos parâmetros cardiovasculares aos níveis basais, a SP foi microinjetada bilateralmente na RVLM. Trinta, quarenta e cinco e sessenta minutos após essa microinjeção observamos aumento da bradicardia reflexa.

A figura 17A mostra os valores médios da razão entre as alterações de frequência cardíaca, medida em intervalo de pulso (Δ IP, ms), e as alterações de pressão arterial média (Δ PAM, mmHg) em resposta à injeção i.v. de fenilefrina

(0.5µg/ 0.1ml) antes e 10, 20, 30, 45 e 60 minutos após a microinjeção bilateral de Substância P (1 pmol/100nl) na RVLM de animais SHR não-anestesiados (tabela 8). Os dados indicam que a Substância P promoveu aumento significativo da sensibilidade da bradicardia barorreflexa, nos tempos 30, 45 e 60 minutos após ser microinjetada bilateralmente na RVLM ($0,8\pm 0,1$; $1,0\pm 0,1$ e $0,7\pm 0,1$ ms/mmHg, respectivamente) quando comparada ao período controle ($0,3\pm 0,1$ ms/mmHg). A melhora da sensibilidade barorreflexa produzida pela Substância P nos ratos hipertensos foi de $324\pm 82\%$ (45 min vs. controle).

A microinjeção bilateral do veículo (Salina, NaCl 0.9%/100nl) na RVLM não promoveu alterações significativas na sensibilidade do barorreflexo em nenhum dos tempos estudados ($0,5\pm 0,1$ vs. $0,5\pm 0,1$; $0,5\pm 0,1$; $0,4\pm 0,1$; $0,4\pm 0,1$ e $0,5\pm 0,1$ ms/mmHg, respectivamente) (Figura 17B, tabela 9).

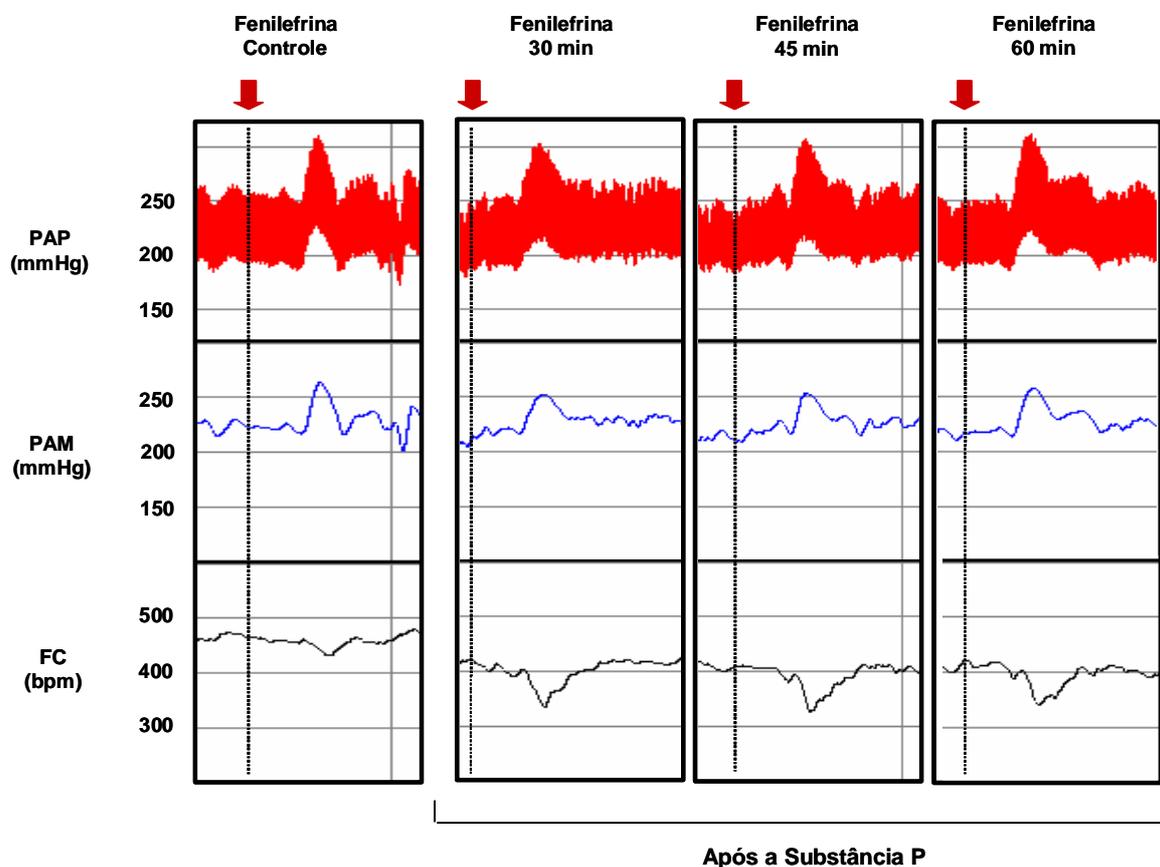


Figura 16: Traçado representativo de um animal do grupo estudado, mostrando as alterações na pressão arterial pulsátil (PAP, mmHg), pressão arterial média (PAM, mmHg) e frequência cardíaca (FC, bpm), em resposta à estimulação do barorreflexo com fenilefrina (0.5 μ g/0.1ml, i.v.), antes (controle) e após (30, 45 e 60 minutos) à microinjeção bilateral de Substância P (1 pmol/100nl) na RVLm de rato SHR não-anestesiado.

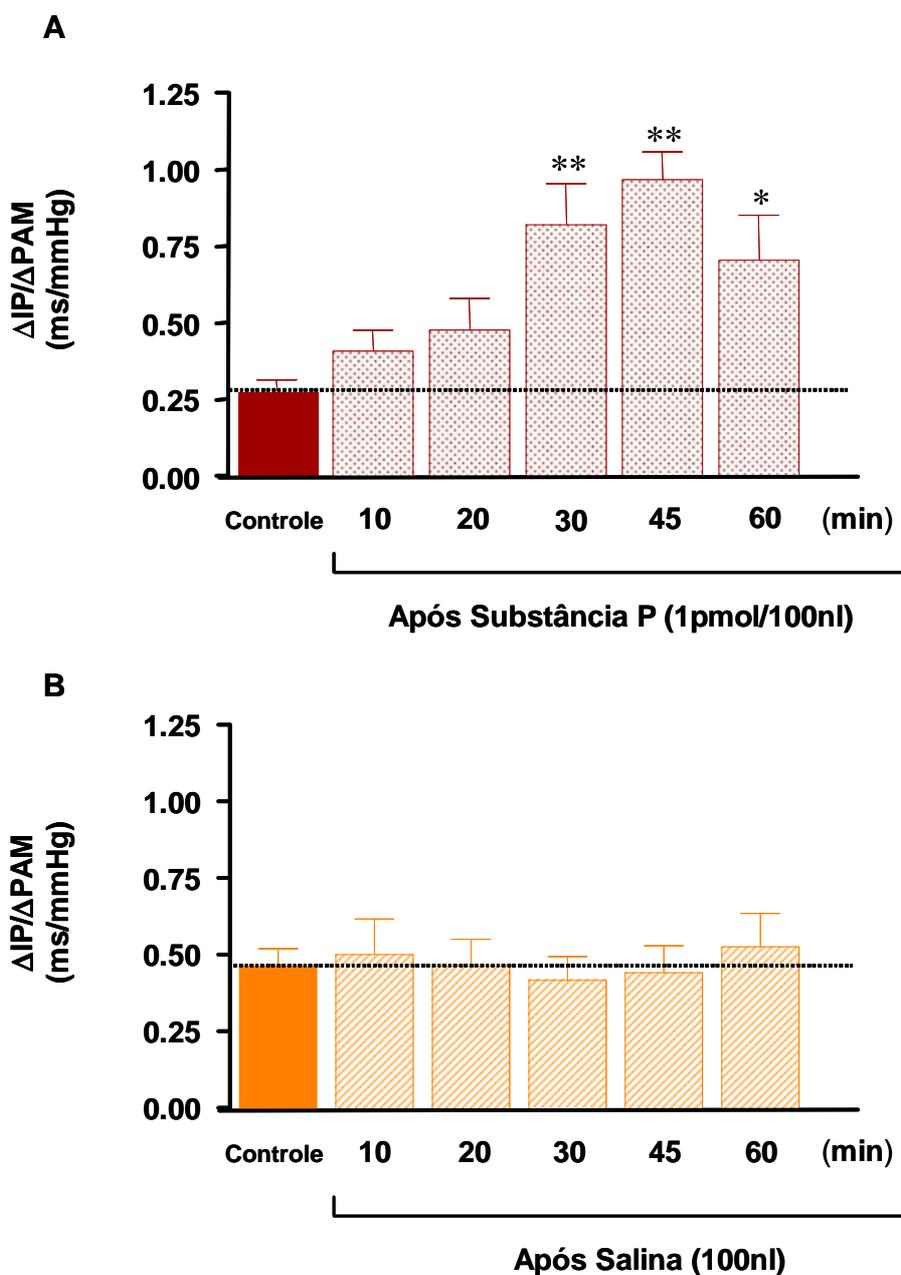


Figura 17: Alterações na sensibilidade da bradicardia barorreflexa ($\Delta IP/\Delta PAM$, ms/mmHg), estimulada pela injeção i.v. de fenilefrina (0.5 μ g/0.1ml) em ratos SHR não-anestesiados, antes e 10, 20, 30, 45 e 60 minutos após a microinjeção bilateral na RVLM de Substância P (1pmol/100nl, n= 7) (**Painel A**), ou Salina (NaCl 0.9%/100nl, n= 5) (**Painel B**). (**,*) Diferença significativa em relação ao período controle (** p < 0.01; * p <0.05; ANOVA).

7) Efeito do bloqueio do componente vagal e simpático cardíaco sobre o aumento da sensibilidade do barorreflexo induzido pela microinjeção bilateral de Substância P na RVLM em ratos espontaneamente hipertensos não-anestesiados.

Como a Substância P na RVLM promoveu aumento da sensibilidade do barorreflexo em ratos SHR, de forma semelhante ao observado nos animais normotensos, também foi objetivo avaliar se esse efeito facilitatório é dependente da modulação do Sistema Nervoso Autônomo Parassimpático ou Simpático Cardíaco nesses animais. Essa avaliação foi realizada da mesma forma que em animais normotensos, ou seja, o barorreflexo foi avaliado antes e após a microinjeção bilateral de Substância P na RVLM durante bloqueio vagal ou simpático cardíaco.

O valor basal de pressão arterial e frequência cardíaca dos animais, nos quais realizamos o bloqueio vagal, foi 165 ± 3 mmHg e 377 ± 10 bpm e após a injeção intravenosa de Metil-Atropina, como esperado, houve aumento da frequência cardíaca (442 ± 15 bpm) sem alteração da pressão arterial (162 ± 5 mmHg). No grupo de animais, nos quais realizamos o bloqueio simpático cardíaco, o valor basal de pressão arterial e frequência cardíaca foi 169 ± 8 mmHg e 367 ± 16 bpm e após a injeção intravenosa de Atenolol houve redução da frequência cardíaca (310 ± 6 bpm) sem alteração da pressão arterial (164 ± 7 mmHg) (tabela 10 e 11).

A figura 18 corresponde a dois traçados representativos de dois animais dos grupos estudados, mostrando os efeitos sobre pressão arterial pulsátil (PAP, mmHg), pressão arterial média (PAM, mmHg) e frequência cardíaca (FC, bpm), induzidos pela estimulação do barorreflexo, através da injeção i.v. de fenilefrina

(0.5µg/0.1ml) antes e após (10, 30 e 60 minutos) a microinjeção bilateral de Substância P (1 pmol/100nl) na RVLM sob o bloqueio vagal com Metil-Atropina (1mg/Kg) (Painel A) e sob bloqueio simpático cardíaco com Atenolol (2mg/kg) (Painel B). Podemos observar que mesmo sob o efeito do bloqueio vagal a Substância P promoveu aumento da bradicardia barorreflexa, mas esse efeito não foi observado sob bloqueio simpático cardíaco.

A figura 19 mostra os valores médios da razão entre as alterações de frequência cardíaca, medida em intervalo de pulso (Δ IP, ms) e de pressão arterial média (Δ PAM, mmHg) em resposta à injeção i.v. de fenilefrina (0.5µg/ 0.1ml) após o bloqueio vagal e 10, 20, 30, 45 e 60 minutos após a microinjeção bilateral de Substância P na RVLM. Podemos observar que a microinjeção bilateral de Substância P na RVLM promoveu aumento da sensibilidade do barorreflexo mesmo sob bloqueio parassimpático a partir dos 30 minutos (0,07±0,01 vs. 0,11±0,01; 0,14±0,02 e 0,17±0,02 ms/mmHg, 30, 45 e 60 minutos, respectivamente) (Painel A). A figura 19B mostra que sob bloqueio simpático a Substância P não promoveu nenhuma alteração significativa na bradicardia barorreflexa após ser microinjetada na RVLM (0,24±0,02 vs. 0,34±0,02; 0,33±0,1; 0,20±0,01; 0,33±0,1 e 0,30±0,05 ms/mmHg) (tabela 10 e 11).

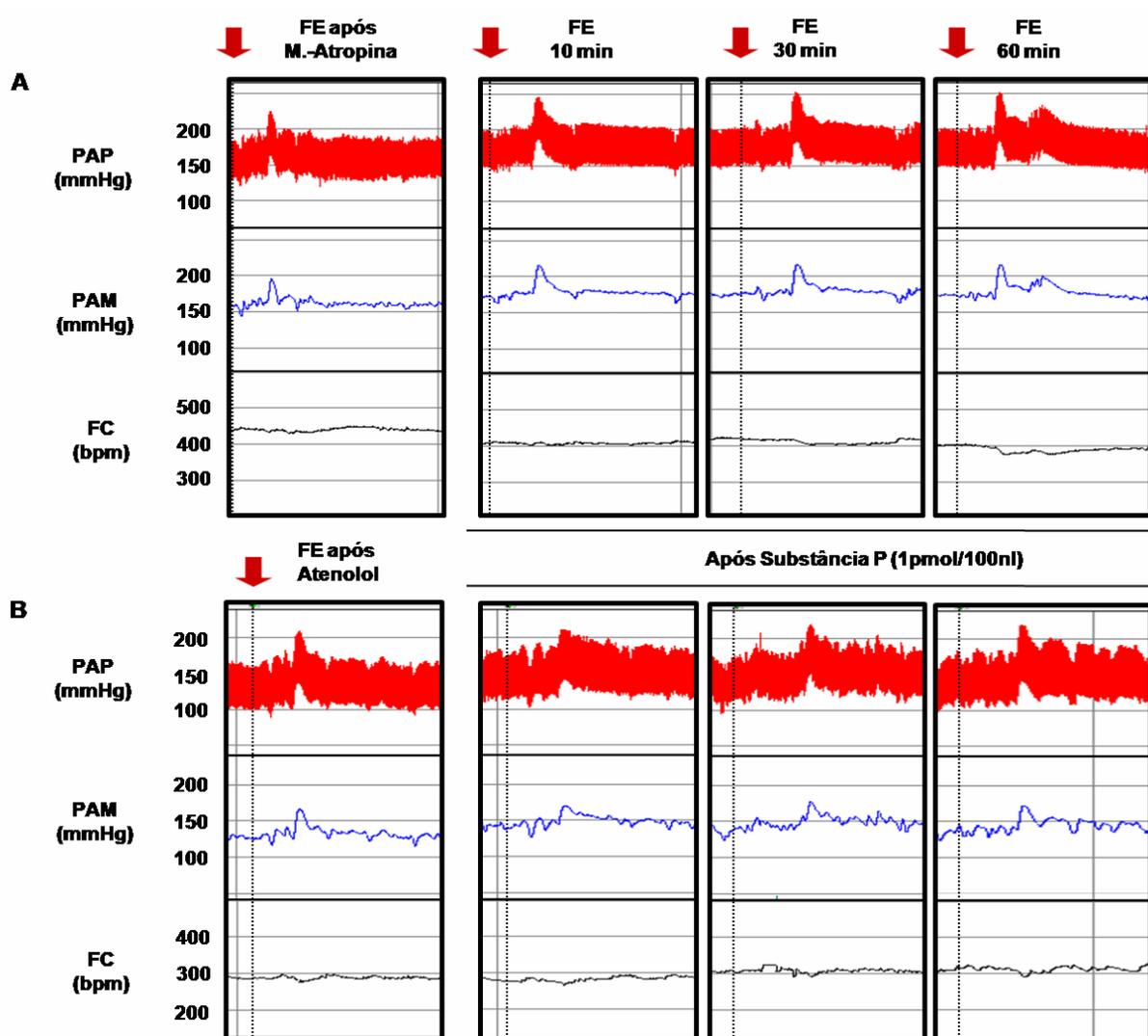


Figura 18: Traçados representativos de dois animais dos grupos estudados, mostrando as alterações na pressão arterial pulsátil (PAP, mmHg), pressão arterial média (PAM, mmHg) e frequência cardíaca (FC, bpm), em resposta à estimulação do barorreflexo com fenilefrina (0.5 μ g/0.1ml, i.v.) antes e após a microinjeção bilateral de Substância P na RVLM sob bloqueio vagal com Metil-Atropina (Painel A) e sob bloqueio simpático cardíaco (Painel B) em ratos SHR não-anestesiados.

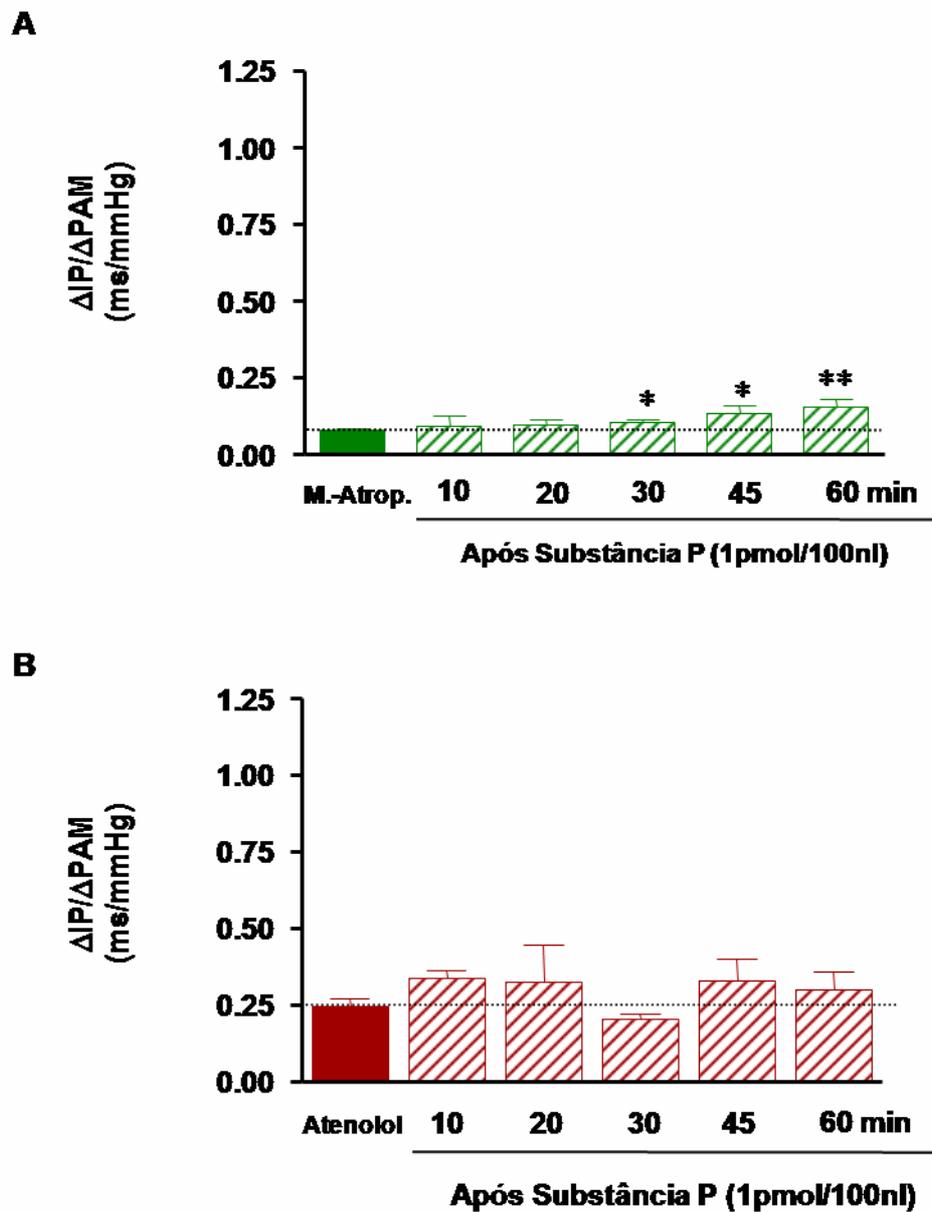


Figura 19: Alterações na sensibilidade da bradicardia barorreflexa ($\Delta IP/\Delta PAM$, ms/mmHg), estimulada pela injeção i.v. de fenilefrina (0.5 μ g/0.1ml) antes e após à microinjeção bilateral de Substância P (1pmol/100nl) na RVLN sob bloqueio vagal em ratos SHR (**Painel A**, n = 7) e sob bloqueio simpático cardíaco (**Painel B**, n = 6). (**,*) Diferença significativa em relação ao período antes da microinjeção de Substância P (**p<0.01; * p< 0.05; ANOVA e Teste-t pareado).

8) Efeito da microinjeção bilateral de Substância P na RVLM sobre as respostas cardiovasculares induzidas pela estimulação do quimiorreflexo em ratos espontaneamente hipertensos não-anestesiados.

Como a RVLM também é uma área crítica na via do quimiorreflexo, e a SP promoveu redução da resposta pressora desse reflexo em animais normotensos, avaliamos também o papel da SP sobre o quimiorreflexo em animais hipertensos. Para isso o quimiorreflexo foi estimulado com injeções intravenosas de KCN (40 µg/0.1ml) antes e 10, 20, 30, 45 e 60 minutos após a microinjeção bilateral de Substância P na RVLM de ratos SHR não-anestesiados.

A figura 20 corresponde a um traçado representativo de um animal do grupo estudado, mostrando os efeitos sobre pressão arterial pulsátil (PAP, mmHg), pressão arterial média (PAM, mmHg) e frequência cardíaca (FC, bpm), induzidos pela estimulação do quimiorreflexo, através da injeção i.v. de KCN, antes e após a microinjeção bilateral de Substância P (1 pmol/100nl) na RVLM. Podemos observar que a estimulação dos quimiorreceptores com KCN em animais SHR não-anestesiados produziu aumento da pressão arterial e bradicardia. Após o retorno dos parâmetros cardiovasculares aos níveis basais, a Substância P foi microinjetada bilateralmente na RVLM, e o quimiorreflexo foi novamente estimulado. Podemos observar que a SP não promoveu alterações das respostas cardiovasculares do quimiorreflexo.

A figura 21 mostra o conjunto dos resultados desse grupo experimental. No painel A podemos observar que a microinjeção bilateral de Substância P na RVLM de animais espontaneamente hipertensos não promoveu nenhuma alteração significativa da resposta pressora e bradicárdica do quimiorreflexo (tabela 12).

Entretanto parece existir uma tendência de redução da resposta pressora do quimiorreflexo aos 10 minutos quando comparado ao período controle ($+60,6 \pm 3,2$ vs. $+46,8 \pm 3,4$ mmHg).

A figura 21B representa os resultados obtidos no grupo experimental em que foi realizada a microinjeção de Salina (NaCl 0.9%/100nl) na RVLM. Como esperado não houve alterações significativas na respostas pressora ($+53 \pm 6$ vs. $+50 \pm 2$; $+56 \pm 10$; $+53 \pm 4$; $+58 \pm 4$ e $+51 \pm 4$ mmHg) ou bradicárdica (-197 ± 22 vs. -224 ± 64 ; -240 ± 46 ; -219 ± 35 ; -214 ± 35 e -235 ± 22 bpm) do quimiorreflexo em nenhum dos tempos estudados (tabela 13).

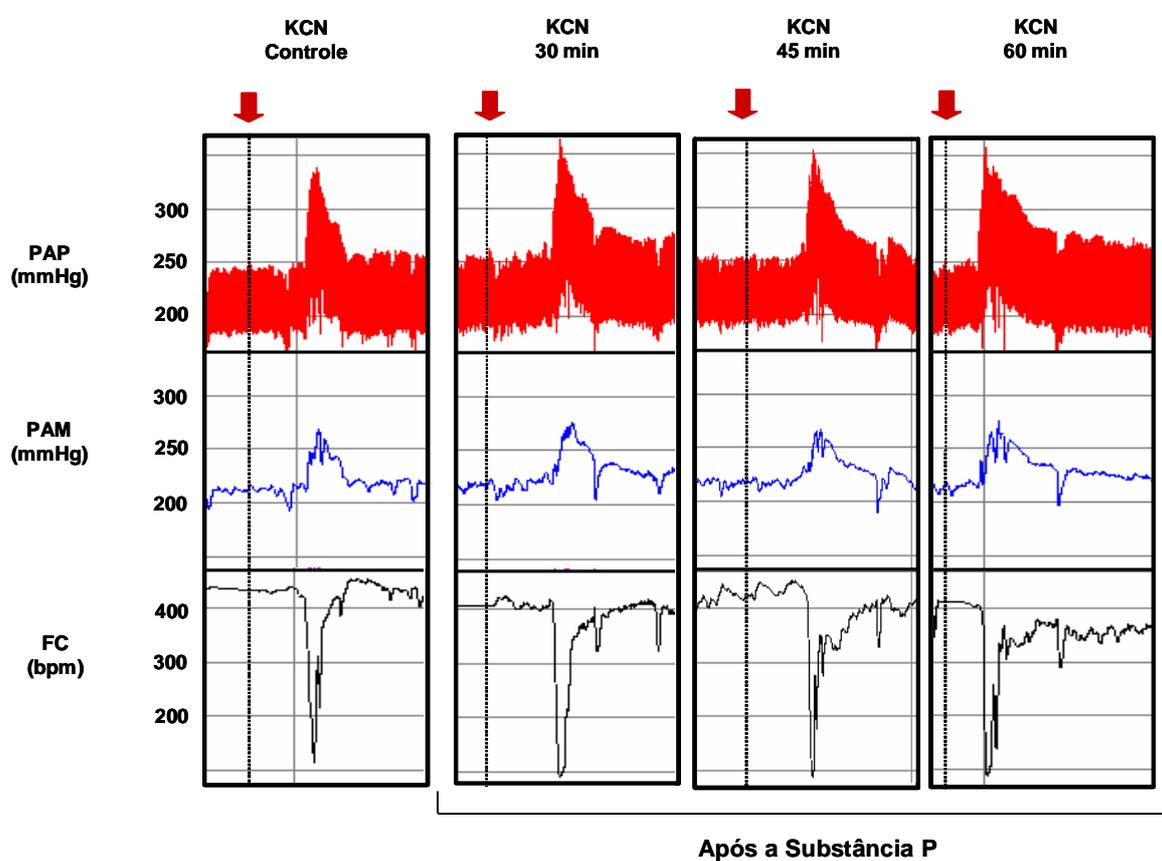


Figura 20: Traçado representativo de um animal do grupo estudado, mostrando as alterações na pressão arterial pulsátil (PAP, mmHg), pressão arterial média (PAM, mmHg) e frequência cardíaca (FC, bpm), em resposta à estimulação do quimiorreflexo com KCN (40 $\mu\text{g}/0.1\text{ml}$, i.v.) em ratos SHR não-anestesiados, antes (controle) e após à microinjeção bilateral de Substância P (1 pmol/100nl) na RVLM.

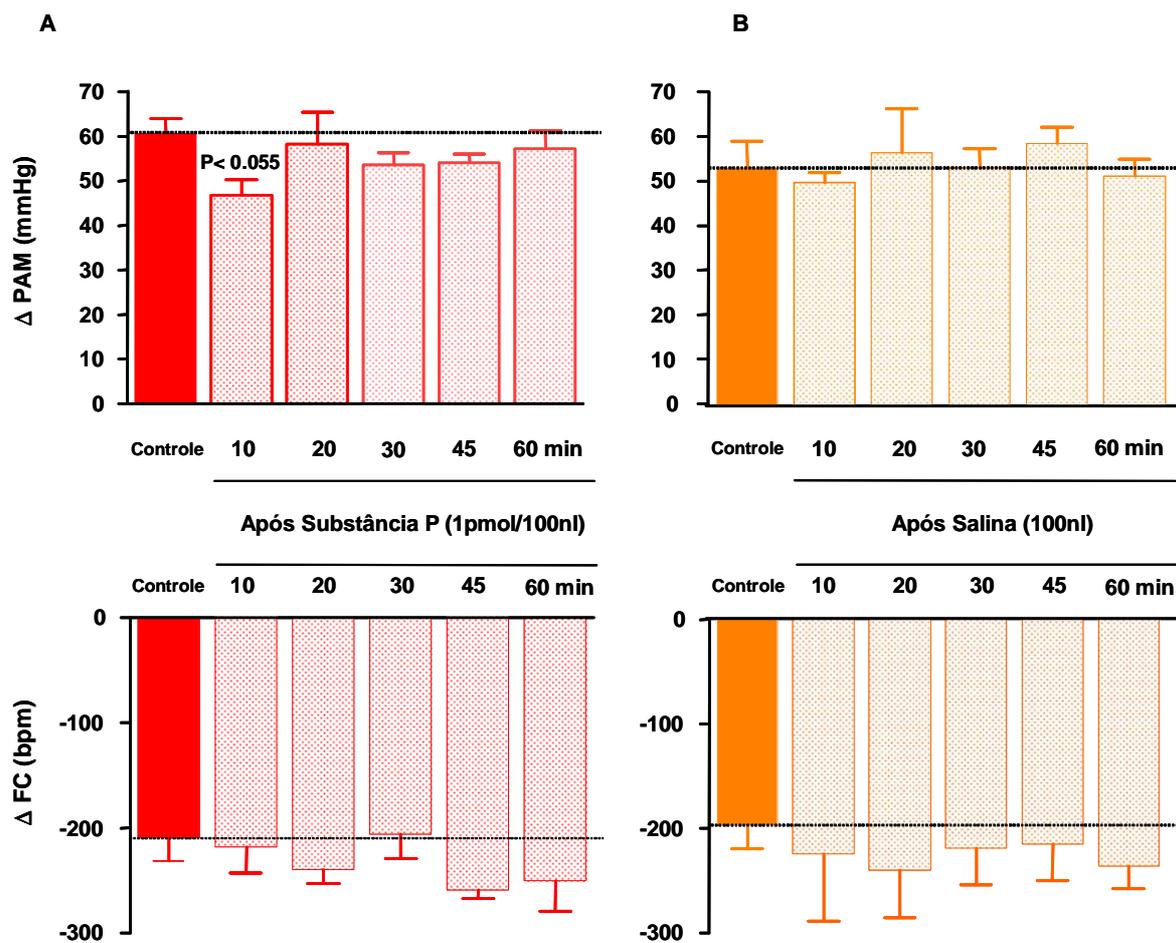


Figura 21: Alterações na pressão arterial média (Δ PAM, mmHg) e na frequência cardíaca (Δ FC, bpm) em resposta à injeção i.v. de KCN (40 μ g/0.1ml) em ratos SHR não-anestesiados, antes e após à microinjeção bilateral na RVLM de Substância P (1pmol/100nl, n= 5) (**Painel A**) ou Salina (NaCl 0.9%/100nl, n= 3) (**Painel B**). (teste-*t* pareado).

9) Efeito da microinjeção bilateral de CP 99,994 na RVLM sobre as respostas cardiovasculares induzidas pela estimulação do barorreflexo em ratos espontaneamente hipertensos não-anestesiados.

Considerando que em estudos anteriores observamos em animais normotensos que o bloqueio da Substância P endógena na RVLM promoveu redução de 71% na sensibilidade do barorreflexo, e que esse peptídeo administrado exogenamente promoveu aumento da sensibilidade do barorreflexo nos animais SHR, foi de nosso interesse avaliar a participação efetiva da Substância P endógena sobre o barorreflexo na RVLM nos animais hipertensos. Para tanto, o antagonista de receptores NK1, CP 99,994 (5 μ M/100nl) foi microinjetado bilateralmente na RVLM e o barorreflexo avaliado.

A figura 22 corresponde a um traçado representativo de um animal do grupo estudado, mostrando os efeitos sobre pressão arterial pulsátil (PAP, mmHg), pressão arterial média (PAM, mmHg) e frequência cardíaca (FC, bpm), induzidos pela estimulação do barorreflexo, através da injeção i.v. de fenilefrina antes e após a microinjeção bilateral de CP 99,994 (5 μ M/100nl) na RVLM. Após o retorno dos parâmetros cardiovasculares aos níveis basais, o CP 99,994 foi microinjetado bilateralmente na RVLM. Podemos observar que o antagonista de receptor NK1 não promoveu alteração da bradicardia barorreflexa.

A figura 23 mostra os valores médios da razão entre as alterações de frequência cardíaca, medida em intervalo de pulso (Δ IP, ms), e as alterações de pressão arterial média (Δ PAM, mmHg) em resposta à injeção i.v. de fenilefrina (0.5 μ g/ 0.1ml) antes e 10, 20, 30, 45 e 60 minutos após a microinjeção bilateral CP 99,994 (5 μ M /100nl) na RVLM de animais SHR não-anestesiados (tabela 14). Os

dados indicam que o antagonista de receptor NK1 não promoveu alteração significativa da sensibilidade da bradicardia barorreflexa após ser microinjetado bilateralmente na RVLM em nenhum dos tempos estudados ($0,50 \pm 0,02$ vs $0,62 \pm 0,10$; $0,52 \pm 0,10$; $0,70 \pm 0,10$; $0,62 \pm 0,10$ e $0,60 \pm 0,10$ ms/mmHg, respectivamente).

A figura 24 mostra a avaliação temporal das alterações dos parâmetros cardiovasculares basais antes e após a microinjeção bilateral do antagonista de Substância P, CP 99,994 ($5 \mu\text{M}/100\text{nl}$) na RVLM. Podemos observar que o antagonista CP 99,994 não promoveu alteração significativa sobre a pressão arterial basal (171 ± 9 vs. 179 ± 10 ; 186 ± 8 ; 179 ± 8 ; 180 ± 7 ; 181 ± 6 e 182 ± 7 mmHg) ou na frequência cardíaca basal (326 ± 10 vs. 328 ± 12 ; 316 ± 9 ; 323 ± 10 ; 325 ± 11 ; 317 ± 9 e 328 ± 9 bpm) em nenhum dos tempos avaliados (tabela 15).

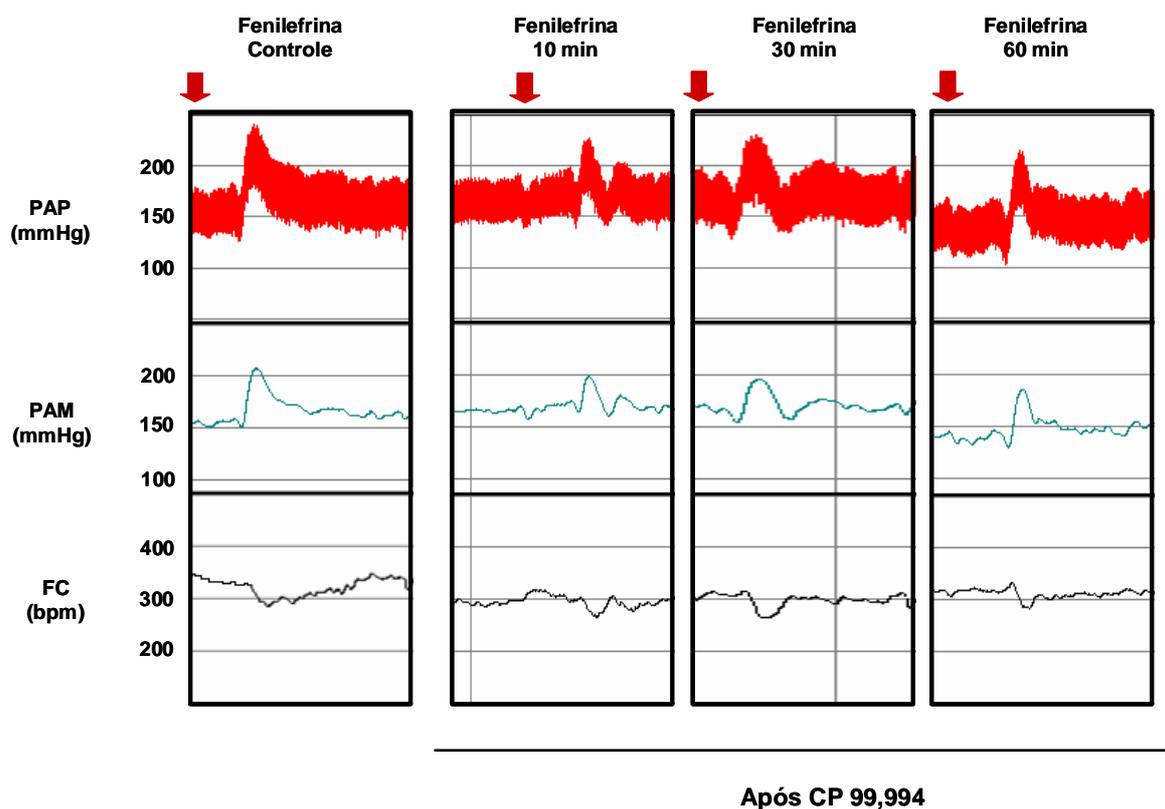


Figura 22: Traçado representativo de um animal do grupo estudado, mostrando as alterações na pressão arterial pulsátil (PAP, mmHg), pressão arterial média (PAM, mmHg) e frequência cardíaca (FC, bpm), em resposta à estimulação do barorreflexo com fenilefrina (0.5 μ g/0.1ml, i.v.) em ratos SHR não-anestesiados, antes (controle) e após à microinjeção bilateral de CP 99,994 (5 μ M/100nl) na RVLM.

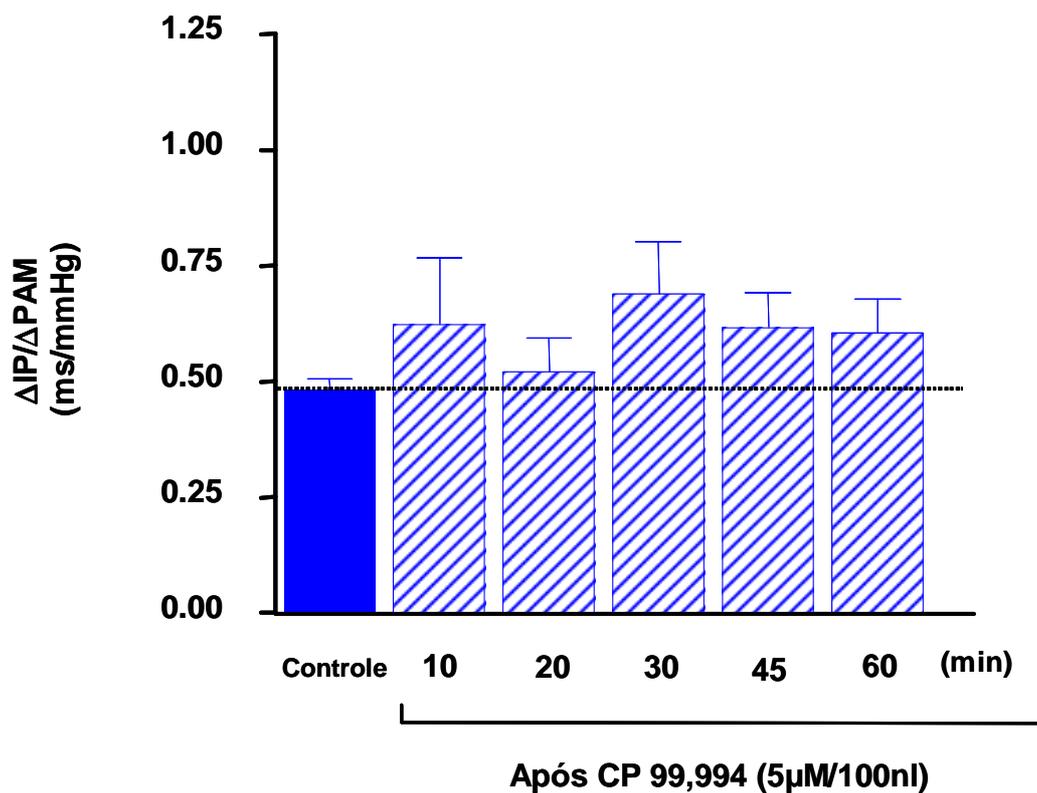


Figura 23: Alterações na sensibilidade da bradicardia barorreflexa ($\Delta IP/\Delta PAM$, ms/mmHg), estimulada pela injeção i.v. de fenilefrina (0.5 μ g/0.1ml) em ratos SHR não-anestesiados, antes e após à microinjeção bilateral de CP 99,994 (5 μ M/100nl) na RVLM (n= 5). (teste-*t* pareado).

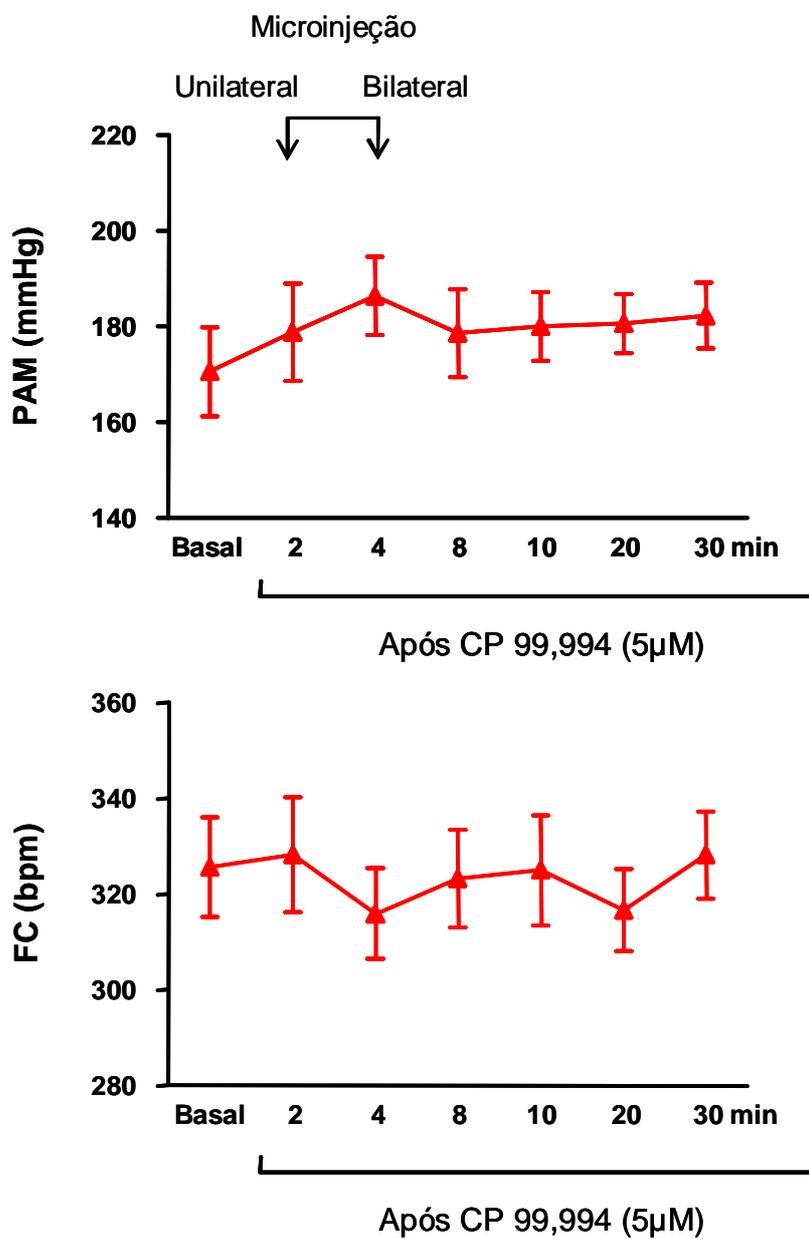


Figura 24: Alterações nos valores basais de pressão arterial média (PAM, mmHg) e de frequência cardíaca (FC, bpm) antes e após à microinjeção bilateral de CP 99,994 (5 μ M/100nl) na RVLM de ratos SHR não-anestesiados (n = 7). (ANOVA).

10) Efeito da microinjeção bilateral de CP 99,994 na RVLM sobre as respostas cardiovasculares induzidas pela estimulação do quimiorreflexo em ratos espontaneamente hipertensos não-anestesiados.

Considerando que estudos anteriores observamos em animais normotensos que o bloqueio da Substância P endógena promoveu aumento de 26% da resposta pressora do quimiorreflexo, foi de nosso interesse avaliar a participação efetiva desse peptídeo endógeno sobre o quimiorreflexo na RVLM nos animais SHR. Para tanto, o antagonista de receptores NK1, CP 99,994 (5 μ M/100nl) foi microinjetado bilateralmente na RVLM e o quimiorreflexo avaliado.

A figura 25 corresponde a um traçado representativo de um animal do grupo estudado, mostrando os efeitos sobre pressão arterial pulsátil (PAP, mmHg), pressão arterial média (PAM, mmHg) e frequência cardíaca (FC, bpm), induzidos pela estimulação do quimiorreflexo, através da injeção i.v. de KCN antes e após (10, 30 e 60 minutos) a microinjeção bilateral de CP 99,994 (5 μ M/100nl) na RVLM. Após o retorno dos parâmetros cardiovasculares aos níveis basais, o CP 99,994 foi microinjetado bilateralmente na RVLM. Podemos observar que o antagonista de receptor NK1 não promoveu alterações das respostas cardiovasculares do quimiorreflexo.

A figura 26 mostra os valores médios pressão arterial média (Δ PAM, mmHg) e frequência cardíaca (Δ FC, bpm) em resposta à injeção i.v. de KCN (40 μ g/ 0.1ml) antes e 10, 20, 30, 45 e 60 minutos após a microinjeção bilateral CP 99,994 (5 μ M /100nl) na RVLM de animais SHR não-anestesiados. Podemos observar que a microinjeção bilateral de CP 99,994 na RVLM de animais espontaneamente hipertensos não promoveu nenhuma alteração significativa sobre a resposta

pressora ($+58\pm 6$ vs. $+59\pm 7$; $+53\pm 4$; $+57\pm 6$; $+56\pm 7$ e $+63\pm 6$ mmHg) ou bradicárdica (-186 ± 39 vs. -156 ± 27 ; -168 ± 28 ; -136 ± 29 ; -161 ± 34 e -190 ± 31 bpm) do quimiorreflexo em nenhum dos tempos estudados (tabela 16).

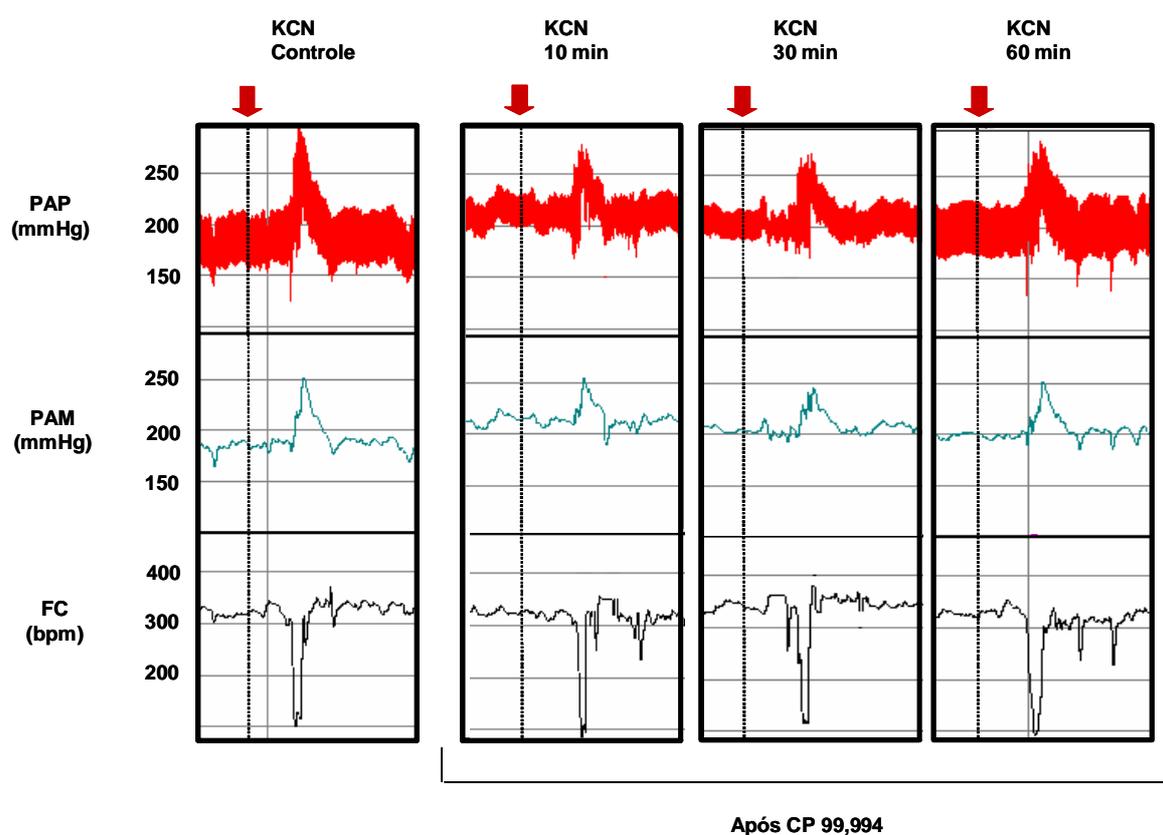


Figura 25: Traçado representativo de um animal do grupo estudado, mostrando as alterações na pressão arterial pulsátil (PAP, mmHg), pressão arterial média (PAM, mmHg) e frequência cardíaca (FC, bpm), em resposta à estimulação do quimiorreflexo com KCN (40 $\mu\text{g}/0.1\text{ml}$, i.v.) em ratos SHR não-anestesiados, antes (controle) e após à microinjeção bilateral de CP 99,994 (5 $\mu\text{M}/100\text{nl}$) na RVLM.

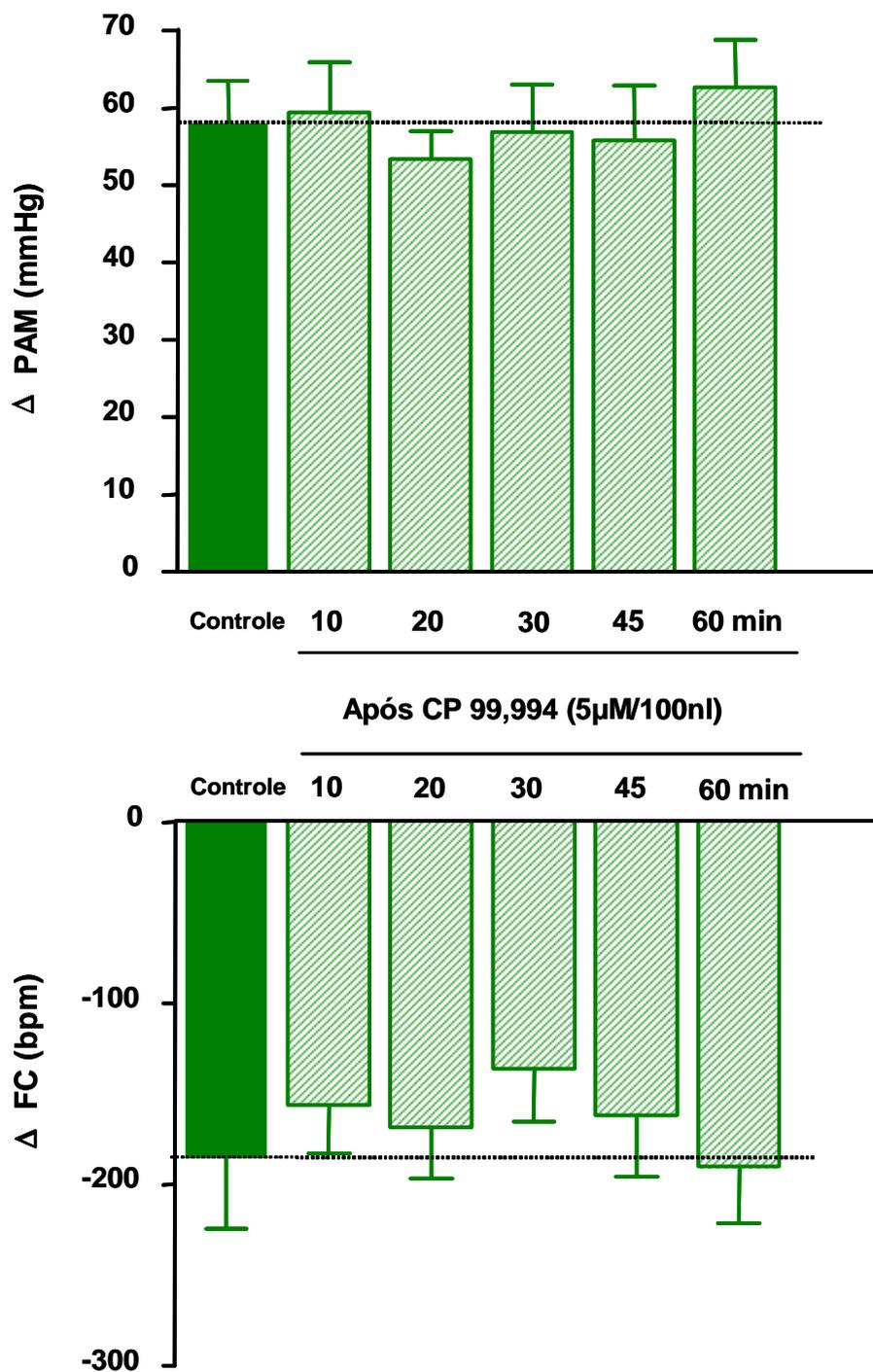


Figura 26: Alterações na pressão arterial média (Δ PAM, mmHg) e na frequência cardíaca (Δ FC, bpm) em resposta à injeção i.v. de KCN ($40 \mu\text{g}/0.1\text{ml}$) em ratos SHR não-anestesiados, antes e após à microinjeção bilateral de CP 99,994 ($5\mu\text{M}/100\text{nl}$) na RVLM ($n=6$). (teste- t pareado).

11) Análise Histológica dos Sítios de Microinjeção na RVLM.

A figura apresentada a seguir (figura 27) corresponde a duas fotomicrografias de secções transversais do tronco cerebral de animais representativo do grupo estudado, mostrando a localização dos centros das microinjeções do corante Alcian Blue. O Painel A corresponde à representação esquemática de um corte transversal do tronco cerebral de rato correspondente ao sítio de microinjeção na RVLM das fotomicrografias. Podemos observar que a RVLM localiza-se no bulbo ventrolateral, logo abaixo da formação compacta do Núcleo Ambíguo. O painel B mostra um sítio típico de microinjeção na RVLM de um rato Wistar, e o Painel C mostra um sítio típico de microinjeção na RVLM de um rato SHR.

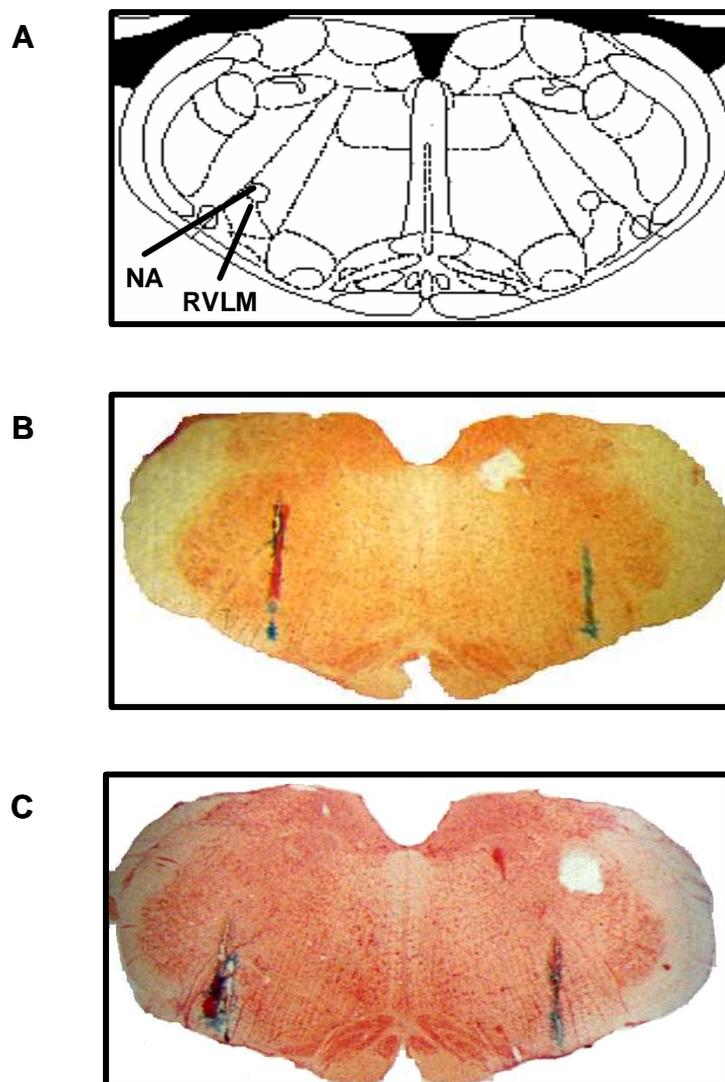


Figura 27: (A) Representação esquemática de um corte transversal do tronco cerebral de rato correspondente ao sítio de microinjeção na Área Bulbar Ventrolateral Rostral (RVLM) das fotomicrografias abaixo. NA = Formação Compacta do Núcleo Ambíguo. (B e C) Fotomicrografias de uma secção transversal do tronco cerebral de um animal representativo dos grupos estudados (Wistar e SHR, respectivamente), mostrando o sítio de microinjeção bilateral de Substância P na RVLM. (Modificado de Paxinos e Watson, 1986).

12) Imunohistoquímica do receptor de Substância P na RVLM

Considerando os estudos anatômicos e farmacológicos que sugerem que a função e expressão das taquicininas e seus receptores no SNC estão alteradas na hipertensão arterial, avaliamos se existe alteração na expressão do receptor da Substância P na RVLM de ratos hipertensos em comparação com normotensos. Para tanto foi realizada análise quantitativa da marcação do receptor NK1 na RVLM nessas duas linhagens de ratos.

A figura 28 corresponde a imagens representativas de células da RVLM imunorreativas ao anticorpo para receptor NK1 em ratos Wistar e SHR e seus respectivos controles. Podemos notar que a marcação das células da RVLM para o receptor NK1 é mais intensa nos ratos SHR.

A figura 29 representa a análise quantitativa das imagens de imunohistoquímica do receptor NK1 na RVLM. A figura 29A mostra a quantidade total e a média de células marcadas por secção na RVLM entre ratos Wistar e SHR (tabela 17 e 18). Podemos observar que não houve diferença entre o número de células marcadas na RVLM entre essas duas linhagens de ratos. A figura 29B mostra a porcentagem da média da área da RVLM imunorreativa a anti-NK1, ou seja, a densidade da expressão do receptor NK1 entre ratos Wistar e SHR (tabela 19). Os ratos SHR apresentam porcentagem de área marcada da RVLM maior que os ratos Wistar.

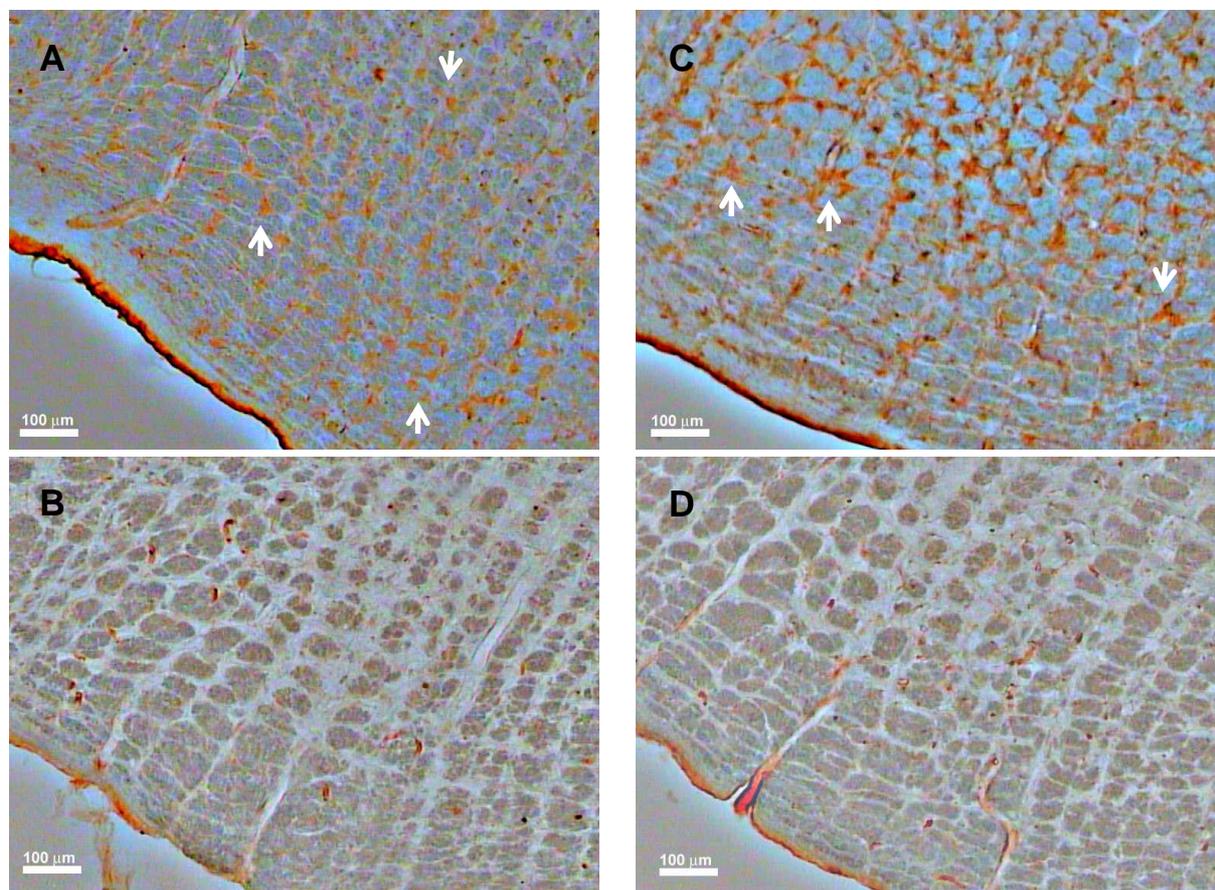


Figura 28: Imagens de imunohistoquímica do receptor NK-1 na RVLM de ratos Wistar (A-B) e ratos SHR (C-D). (A) e (C) imagens de células da RVLM imunorreativas a NK-1. (B) e (D) imagens controle. (Escala da barra: 100µm).

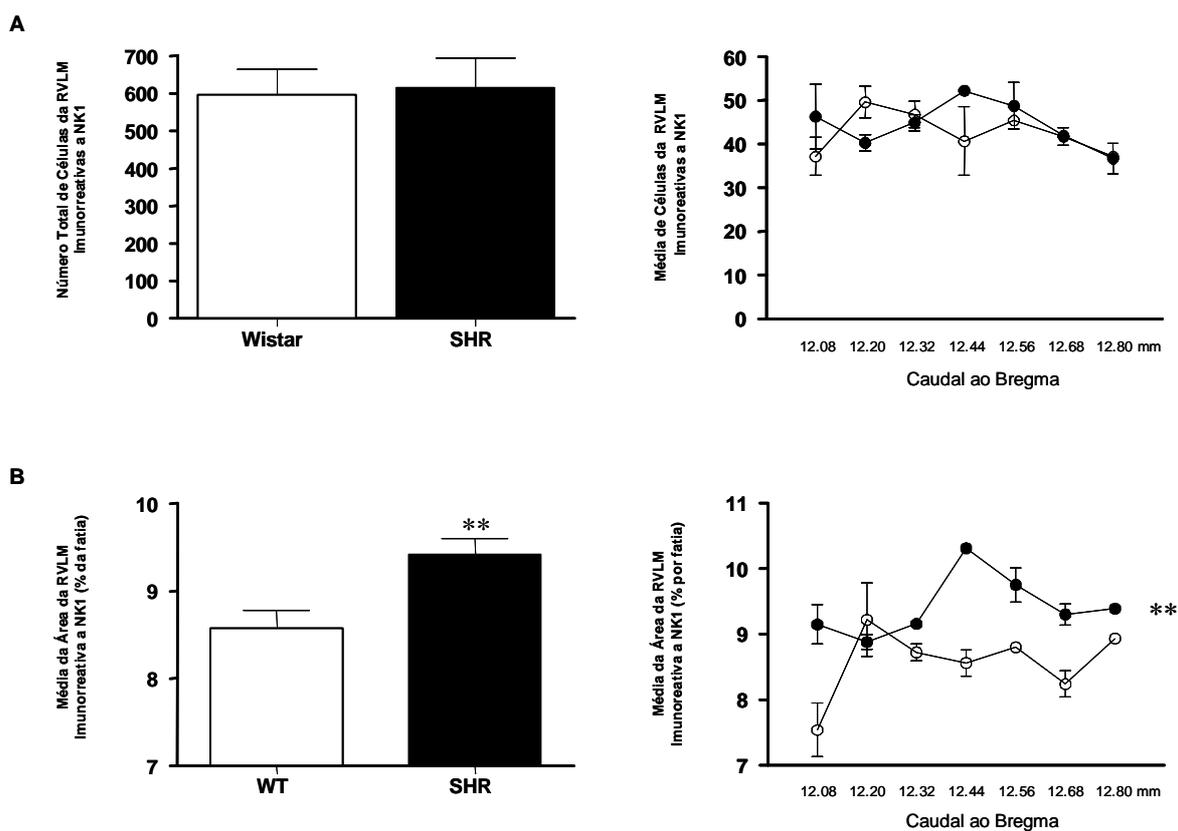


Figura 29: (A) Comparação do número total e a média de células por secção da RVLM imunorreativas a NK-1 entre ratos Wistar (n = 7; o) e SHR (n = 7; ●). **(B)** Porcentagem da média de área marcada por secção da RVLM entre ratos Wistar (n = 7; o) e SHR (n = 7; ●). (**) Diferença significativa entre os grupos (p < 0,01; teste-t não-pareado).

DISCUSSÃO

Este estudo mostrou pela primeira vez em animais não-anestesiados que fragmentos N-terminal e C-terminal da Substância P microinjetados na RVLM promovem efeito sobre os parâmetros cardiovasculares. Mostramos ainda que a melhora da sensibilidade barorreflexa observada após a microinjeção de Substância P na RVLM depende principalmente da modulação do componente simpático. A Substância P também possui papel neuromodulatório sobre o barorreflexo em animais hipertensos, sendo a densidade dos receptores de Substância P, receptores NK1, aumentada na RVLM de ratos SHR. Além disso, esses receptores estão localizados tanto em neurônios gabaérgicos quanto em neurônios catecolaminérgicos na RVLM.

Fragmentos da Substância P

Nossos resultados mostraram que o fragmento N-terminal de Substância P, SP-(1-7), após ser administrado na RVLM, promoveu bradicardia sem alterar a pressão arterial (considerando o grupo como um todo). O efeito desse mesmo fragmento de Substância P sobre os parâmetros cardiovasculares tem sido investigado em outras áreas do SNC. Hall e cols. (1987) observaram que a administração de SP-(1-7) no 4º ventrículo produziu rápida queda da pressão arterial. Trabalho posterior de Hall e cols. (1993) mostraram que a administração de SP-(1-7) no NTS intermediário promoveu redução da pressão arterial e bradicardia. Porém Tschöpe e cols. (1995) não observaram nenhum efeito cardiovascular promovido pela SP-(1-7) após esta ser microinjetada no ventrículo lateral.

Nossa hipótese inicial era de que a SP-(1-7) fosse mimetizar o efeito depressor inicial promovido pela microinjeção de Substância P na RVLM, pois como

mostrado por Hall e cols. (1987), nós também observamos que a Substância P promove efeito bifásico sobre a pressão arterial. Entretanto, em relação ao efeito do fragmento N-terminal nossos achados foram diferentes. Hall e cols. (1987) mostraram que a SP-(1-7) reproduziu o efeito depressor da Substância P no 4º ventrículo, porém na RVLM esse mesmo fragmento não promoveu alteração da pressão arterial. Porém não podemos descartar a possibilidade de que outro fragmento N-terminal de Substância P [SP-(1-6) ou SP-(1-9)] possa ser formado a partir da Substância P na RVLM e mimetizar seu efeito hipotensor de curta duração na RVLM, muito embora Sakurada e cols. (1985) tenham mostrado que a SP-(1-7) é o principal fragmento N-terminal de Substância P formado no SNC de ratos.

Em relação à diferença dos efeitos da SP-(1-7) na RVLM sobre a pressão arterial, onde na metade dos animais estudados esse fragmento promoveu resposta pressora e na outra metade não promoveu alteração significativa sobre a pressão arterial, observamos uma discreta diferença na distribuição do corante Alcian Blue na RVLM no sentido rostro-caudal. O centro das microinjeções encontrando-se mais caudal nos animais em que a SP-(1-7) não promoveu resposta pressora e mais rostral nos animais em que se observou resposta pressora. Respostas cardiovasculares diferentes devido à microinjeção do aminoácido excitatório L-glutamato em diferentes níveis na RVLM também foram observadas por Zhang e cols. (1990). Nesse estudo microinjeções de L-glutamato em diferentes níveis dorso-ventral na RVLM promoveu respostas cardiovasculares diferentes, foram avaliados cinco níveis diferentes: no mais dorsal (2.5mm ventral ao 4º ventrículo) a microinjeção de L-glutamato promoveu resposta depressora e bradicardia; (2.8 mm ventral ao 4º ventrículo) a resposta depressora foi similar, mas não houve alteração da frequência cardíaca; (2.9 mm ventral ao 4º ventrículo) a resposta depressora

permanecia, mas houve uma modesta resposta taquicárdica; (3.2 mm ventral ao 4º ventrículo) já se observou uma modesta resposta pressora e taquicardia, e no nível mais ventral (3.65 mm ventral ao 4º ventrículo) o L-Glutamato promoveu intensa resposta pressora e bradicardia. Então se discretas variações no nível dorso-ventral da RVLM produz respostas tão variáveis, podemos sugerir que a discreta diferença na distribuição do corante Alcian Blue no nível rostro-caudal pode justificar a diferença do efeito promovido pela SP-(1-7) na RVLM sobre a pressão arterial.

A microinjeção do fragmento C-terminal de Substância P, SP-(5-11), na RVLM promoveu aumento da pressão arterial e bradicardia nas duas doses estudadas. Hall e cols., em 1987, microinjetaram no 4º ventrículo de ratos Sprague-Dawley anestesiados outro fragmento C-terminal de Substância P, SP-(7-11), e também observaram aumento gradual da pressão arterial. Estudo de Tschöpe e cols., em 1995, avaliaram o efeito cardiovascular e comportamental de diferentes fragmentos N e C-terminal de Substância P no ventrículo cerebral lateral de ratos não-anestesiados e observaram que entre todos os fragmentos testados [fragmentos C-terminal: SP-(5-11), SP-(6-11), SP-(7-11), SP-(8-11); fragmentos N-terminal: SP-(1-7), SP-(1-9)] a SP-(5-11) foi o único fragmento que produziu o mesmo padrão de resposta cardiovascular e comportamental do produzido pelo peptídeo completo de Substância P, SP-(1-11), que foram aumento da pressão arterial, da frequência cardíaca e do comportamento de limpeza do rato. Além disso, a SP-(5-11) foi o único fragmento que apresentou efeito taquifilático como a SP-(1-11). A taquifilaxia desse fragmento também foi observada em nosso estudo. Outros estudos que utilizaram a SP-(5-11) modificada, [pGlu⁵, MePhe⁸, Sar⁹]-SP-(5-11), também denominado de DiMe, na RVLM em ratos anestesiados observaram aumento da pressão arterial, mas em relação a frequência cardíaca os resultados foram

controversos. Urbanski e cols., 1989, observaram que em baixas doses o DiMe promoveu predominantemente taquicardia e em altas doses bradicardia, porém Makeham e cols. em 2005 observaram taquicardia, mesmo utilizando a maior dose usada por Urbanski e cols. (1989) Assim o fragmento C-terminal de Substância P, SP-(5-11), se caracteriza como um fragmento ativo e excitatório nas vias neurais que controlam a pressão arterial.

A diferença encontrada entre nosso estudo e os estudos de Urbanski e Makeham no efeito da SP-(5-11) sobre a frequência cardíaca na RVLM pode ser explicado por dois fatores: primeiro esses autores utilizaram o fragmento SP-(5-11) modificado, Dime, o qual pode atuar preferencialmente em receptores NK3 (Drapeau e cols., 1987); segundo, tanto Urbanski cols. (1989) quanto Makeham e cols. (2005) realizaram os experimentos em ratos anestesiados com uretana, enquanto nós utilizamos animais não-anestesiados, modelo que mais se aproxima das condições fisiológicas. Os efeitos induzidos por microinjeção de drogas, por mais bem localizadas que sejam, podem afetar múltiplas vias neurais simultaneamente, e a presença de agentes anestésicos, por exemplo, pode resultar em diferenciação dos efeitos nesses circuitos, modificando a resposta final.

Em relação ao efeito bradicárdico promovido pelas microinjeções dos fragmentos N- e C-terminal de Substância P na RVLM é possível que esse efeito tenha origem barorreflexa, uma vez que acontece posterior ao aumento de pressão arterial. Esse mesmo mecanismo foi mostrado por Zhang e cols. (1990) que observaram que a bradicardia promovida pela microinjeção de L-Glutamato na RVLM de ratos anestesiados foi abolida após a desnervação sinoaórtica. Porém temos que ressaltar que em um grupo de ratos onde foi microinjetado a SP-(1-7), fragmento N-terminal, a bradicardia ocorreu mesmo na ausência da resposta

pressora, o que talvez possa sugerir efeito inibitório direto desse fragmento sobre os neurônios da RVLM, resultando em redução da atividade simpática cardíaca e, portanto bradicardia.

A maioria dos efeitos biológicos da Substância P, tais como suas ações sobre o músculo liso vascular, íleo isolado, respostas cardiovasculares induzidas centralmente, facilitação da memória, etc., são atribuídos à porção C-terminal da Substância P, uma vez que esse fragmento mantém a atividade integral da Substância P, ou são até mesmo mais efetivos (Regoli e cols., 1984; Otsuka e Yoshioka, 1993). Por exemplo, o efeito pressor induzido pela microinjeção intracerebroventricular do fragmento C-terminal da Substância P [SP-(6-11)] é maior do que o efeito pressor produzido pela própria Substância P [SP-(1-11)] (Traczyk e Kubicki, 1980; Fuxe e cols., 1982). Além disso, fragmentos N-terminal da Substância P não são capazes de mimetizar algumas das ações da Substância P, sendo inativos em vários órgãos e tecidos que, sabidamente, contém o receptor NK1 (Piercey e cols., 1982).

Entretanto, nem todos os efeitos da Substância P administrada centralmente parecem ser mediados pelo seu fragmento C-terminal. Tem sido demonstrado que alguns efeitos da Substância P sobre comportamento, salivação e memória podem ser reproduzidos por certos fragmentos N-terminal da Substância P (Piercey e cols., 1982; Hall e cols., 1987). Estudos de Matsas e cols. (1983) e Edwardson e McDermott (1985) têm sugerido que a porção N-terminal é o principal produto do metabolismo enzimático da Substância P, sendo rápida e abundantemente produzida quando a Substância P é incubada em homogenato de membranas sinápticas. No Núcleo do Trato Solitário foi demonstrado que a microinjeção de um inibidor de proteases, o fosforamidon, bloqueia o efeito depressor e bradicárdico da

Substância P, mas não do fragmento N-terminal da Substância P [SP-(1-7)], sugerindo que o processamento enzimático da Substância P em Substância P (1-7) é obrigatório para a expressão desses efeitos cardiovasculares da Substância P (Hall e cols. 1989).

Apesar do fragmento N-terminal da Substância P, em nosso estudo, não ter reproduzido o efeito hipotensor inicial de curta duração induzido pela própria Substância P microinjetada na RVLM, tanto o fragmento N-terminal quanto o fragmento C-terminal parecem ser ativos na RVLM. Entretanto o papel fisiológico da formação desses fragmentos a partir da Substância P na RVLM não foi explorado neste estudo.

Substância P e Barorreflexo

Apesar da bradicardia barorreflexa ser predominantemente determinada pela modulação do sistema nervoso parassimpático, a inibição simpática também é importante para a expressão desta resposta (Coleman, 1980; Head e McCarty, 1987). Nossos resultados mostram que a melhora da sensibilidade na bradicardia barorreflexa promovida pela Substância P na RVLM foi bloqueada após o pré-tratamento com atenolol, mas não com metil-atropina, em ratos Wistar não-anestesiados, o que sugere que o efeito da Substância P seja mediado principalmente pela modulação do componente simpatoinibitório deste reflexo. Esses resultados indicam ainda que provavelmente essa ação da Substância P esteja restrita ao RVLM, e não por se difundir e atuar no NA, modulando a atividade do sistema nervoso parassimpático.

A participação da RVLM na regulação da bradicardia barorreflexa também tem sido descrita em outros estudos. Mao e cols. (1994) mostraram que a inibição

da recaptação do glutamato na RVLM aumenta a bradicardia barorreflexa em ratos não-anestesiados. Essa mesma ação foi sugerida para o óxido nítrico na RVLM no trabalho de Kishi e cols. (2003), os quais mostraram que o aumento da expressão de eNOS na RVLM melhora o controle barorreflexo na frequência cardíaca, e que essa melhora permanece mesmo após o pré-tratamento com atropina mas não após metoprolol, o que indica que esse aumento no ganho do barorreflexo, promovido pelo aumento na produção de óxido nítrico na RVLM, seja devido a potenciação do efeito simpatoinibitório cardíaco.

Nossos resultados também mostram que a Substância P na RVLM de ratos SHR não-anestesiados promoveu aumento da sensibilidade da bradicardia barorreflexa, revertendo o prejuízo da função barorreflexa observada nos animais hipertensos. Após a microinjeção da Substância P na RVLM o índice de sensibilidade da bradicardia barorreflexa dos animais hipertensos não foi diferente ao observado nos animais normotensos (tabela 20).

Entretanto de forma diferente ao observado nos animais normotensos, a microinjeção bilateral do antagonista de receptores NK1, o CP 99,994 na RVLM de ratos SHR não foi capaz de alterar a sensibilidade do barorreflexo, o que sugere que, embora o efeito modulatório da Substância P na RVLM esteja presente nesses animais, este efeito não é tônico. Corroborando com esta sugestão, também observamos que a própria microinjeção do CP 99,994 na RVLM dos animais SHR não promoveu alterações significativas sobre os parâmetros cardiovasculares basais, enquanto que nos animais normotensos promoveu aumento da pressão arterial e taquicardia (Etelvino e Haibara, 2003), o que pode indicar que o sistema taquicininérgico na RVLM não seja tonicamente hiperativo nos animais SHR, não

contribuindo para a hiperatividade simpática consistentemente demonstrada neste modelo de hipertensão (Miyagawa e cols., 1991).

De forma semelhante ao observado nos animais normotensos, a facilitação da bradicardia barorreflexa induzida pela Substância P na RVLM de ratos SHR também parece ser dependente da modulação do componente simpatoinibitório deste reflexo, uma vez que este efeito foi abolido após o pré-tratamento dos animais com atenolol, mas não após o pré-tratamento com metil-atropina. Entretanto é importante observar que nos animais SHR apesar da metil-atropina não ter abolido o efeito facilitatório da Substância P sobre a bradicardia barorreflexa, este efeito foi atenuado.

Estudos de Shigematsu e cols. (1986) observaram aumento de cerca de 140% da capacidade de ligação para a Substância P no núcleo ambíguo de animais SHR quando comparado aos animais normotensos. Em estudos preliminares do nosso laboratório também observamos maior marcação para receptores NK1 no núcleo ambíguo de ratos SHR nos ensaios de fluorescência. Considerando as evidências citadas acima, e ainda que a estimulação dos receptores NK1 do núcleo ambíguo promove efeito cronotrópico negativo (Massari e cols., 1994 e 1996), é necessário considerar a possibilidade de que parte do efeito facilitatório da Substância P sobre o barorreflexo nos animais SHR seja dependente da sua difusão para o núcleo ambíguo.

Entretanto, se contrapondo a esta possibilidade, mesmo que indiretamente, podemos citar primeiramente que o pré-tratamento com atenolol aboliu o efeito da Substância P na RVLM sobre o barorreflexo. Portanto, se a modulação do componente simpatoinibitório deste reflexo pela Substância P não é o único

mecanismo, este pode ter maior importância em relação ao componente parassimpático.

Apesar da Substância P promover aumento da frequência de disparos nos neurônios pré-motores simpáticos da RVLM (Sun e Guyenet, 1989; Li e Guyenet, 1997), tem sido demonstrado que alguns dos efeitos da Substância P no SNC podem estar relacionados à estimulação de interneurônios inibitórios, e conseqüentemente liberação do aminoácido inibitório GABA (Sakuma e cols., 1991; Paton e Kasparov, 2000; Maubach e cols., 2001). Desta forma, um possível mecanismo de ação da Substância P na RVLM, potenciando o efeito simpatoinibitório do barorreflexo, pode ser através da modulação da liberação de GABA nesta área. Ruggiero e cols. (1985) mostraram a presença deste neurotransmissor inibitório na RVLM, enquanto Meeley e cols. (1985) demonstraram, através de técnicas de imunohistoquímica, a presença de neurônios gabaérgicos intrínsecos na RVLM. Estudos de Ma e Bleasdale (2002) mostraram que a Substância P pode promover efeitos inibitórios via ativação de neurônios gabaérgicos, uma vez que mais de 50% dos neurônios gabaérgicos do tronco cerebral expressam também o receptor NK1.

O efeito da Substância P na RVLM em promover melhora na função barorreflexa pode ser explicado pelos nossos resultados de imunofluorescência, nos quais observamos a presença de receptores de Substância P, receptores NK1, em neurônios gabaérgicos na RVLM, resultados esses que estão discutidos mais adiante.

Substância P e Quimiorreflexo

Em relação aos efeitos da Substância P na RVLM sobre as respostas cardiovasculares induzidas pela estimulação do quimiorreflexo em ratos SHR não-anestesiados, nossos resultados mostram que a Substância P, microinjetada bilateralmente nessa área, não alterou a resposta pressora e nem a bradicárdica deste reflexo, apesar de ter havido uma tendência de redução na resposta pressora. Da mesma forma a microinjeção bilateral do antagonista de receptor NK1, o CP 99,994, não promoveu nenhuma alteração nas respostas cardiovasculares quimiorreflexas.

A participação da Substância P na regulação neural do quimiorreflexo, apesar de pouco explorada, tem sido indiretamente sugerida em alguns trabalhos. Gallagher e cols. (1985), através de infusão intracisternal de Substância P em coelhos, sugerem a participação desta taquicinina na regulação da resposta ventilatória do quimiorreflexo. Estudos de Lindefors e cols. (1986) e Srinivasan e cols. (1991) observaram aumento da liberação de Substância P no NTS durante hipóxia. Estudos anteriores de nosso laboratório em ratos normotensos não-anestesiados mostraram que a microinjeção bilateral de Substância P na RVLM promoveu redução da resposta pressora do quimiorreflexo sem promover alteração sobre a resposta bradicárdica. Efeito oposto foi observado com o bloqueio dos receptores NK1 da RVLM, ou seja a microinjeção bilateral do antagonista de Substância P, o CP 99,994, aumentou a resposta pressora do quimiorreflexo (Etelvino e Haibara, 2004). Esses estudos sugerem que a Substância P na RVLM de animais normotensos participe tonicamente da modulação do quimiorreflexo e desempenho, de forma semelhante ao sugerido para a modulação do barorreflexo, papel simpatoinibitório. Entretanto este papel simpatoinibitório da Substância P na RVLM modulando o quimiorreflexo em animais hipertensos parece não estar presente.

Alguns estudos sugerem que o quimiorreflexo encontra-se hiperativo em animais hipertensos. Por exemplo, ratos SHR apresentam maior volume minuto respiratório e a sensibilidade dos quimiorreceptores encontra-se aumentada à hipóxia em relação aos ratos normotensos (Przybylski e cols., 1982; Huckstorf e cols., 1990; Fukuda e cols., 1987). Portanto, podemos sugerir que uma possível explicação para esse aumento da atividade do quimiorreflexo em ratos SHR possa ser devido, pelo menos em parte, a perda da ação simpatoinibitória da Substância P na RVLM sobre esse reflexo. Essa seria uma alteração na via neural do quimiorreflexo em animais hipertensos, já que outros estudos têm mostrado alterações morfológicas nos vasos sanguíneos que irrigam os corpúsculos carotídeos e nos próprios corpúsculos carotídeos de ratos SHR em comparação aos ratos normotensos (Habeck e cols., 1991; Smith e cols., 1984; Habeck e cols., 1981), o que também explica a hiperatividade do quimiorreflexo nos animais hipertensos.

Receptor NK1 na RVLM - Imunofluorescência

Observamos no presente estudo a presença de receptor NK1 da Substância P preferencialmente em neurônios e não em astrócitos na RVLM. Alguns estudos têm sugerido a presença de receptores da Substância P tanto em neurônios, quanto em células gliais, onde desempenham importante função modulatória. Por exemplo, estudos que investigam as vias neurais envolvidas na dor crônica mostram que a Substância P interage com astrócitos potenciando a liberação de ATP induzida pelo L-glutamato, induzindo a propagação dos impulsos nociceptivos e a sensação de dor (Hansson, 2006; Werry e cols., 2006; Wienrich e Kettenmann, 1989).

Nossos resultados mostram ainda que os receptores NK1 da RVLM estão expressos em neurônios catecolaminérgicos. A presença de receptores NK1 em

neurônios imunorreativos à tirosina hidroxilase (um marcador de neurônios adrenérgicos e dopaminérgicos) na RVLM, pode explicar o efeito pressor promovido pela Substância P microinjetada na RVLM em ratos Wistar e SHR não-anestesiados (Etelvino e Haibara, 2003), e ainda o efeito observado nos estudos *in vitro* utilizando fatias de bulbo de ratos neonatos, os quais mostraram ação excitatória da Substância P sobre neurônios bulboespinhais da RVLM (Sun e Guyenet, 1989; Li e Guyenet, 1997), sugerindo uma ação simpatoexcitatória desse neuropeptídeo nessa região.

Além da localização de receptores NK1 em neurônios catecolaminérgicos da RVLM, também observamos que os neurônios imunorreativos ao GAD67, neurônios gabaérgicos, também expressam o receptor NK1. Essa interação entre o receptor de Substância P e neurônios gabaérgicos também é mostrada em outras áreas do SNC, como córtex occipital, amígdala basolateral, substância cinzenta periqueductal e no núcleo dorsal da rafe (Echevarria e cols., 1997; Maubach e cols., 2001 e Ma e Bleasdale, 2002), sugerindo que a Substância P possa atuar em vias neurais inibitórias. Essa ação inibitória da Substância P, promovendo liberação do neurotransmissor inibitório GABA, já foi descrito em outras áreas do SNC (Sakuma e cols., 1991). No NTS, Bailey e cols. (2004) mostraram que os receptores NK1 estão localizados tanto pré-sinápticamente quanto em sítios somatodendríticos de neurônios gabaérgicos, controlando a liberação do GABA. Na CVLM, Wang e cols. (2003) observaram que após a injeção intraparenquimal de saporina conjugada a Substância P ocorreu depleção dos neurônios gabaérgicos.

Possivelmente, essa interação da Substância P com neurônios gabaérgicos na RVLM possa explicar a potenciação promovida pela Substância P na RVLM sobre o barorreflexo, como também a inibição da resposta pressora do

quimiorreflexo. Entretanto para confirmação dessa hipótese estudos funcionais são ainda necessários, como por exemplo, investigar se a microinjeção de bicuculina, antagonista GABA, na RVLM promoveria bloqueio dos efeitos modulatórios da Substância P sobre o barorreflexo e quimiorreflexo. Obviamente, sendo a RVLM uma área importante no controle da atividade simpática e sob inibição tônica, os experimentos utilizando bicuculina deverão ser realizados normalizando-se os níveis de pressão arterial. Também é interessante ressaltar que o efeito facilitatório da Substância P sobre a sensibilidade barorreflexa não é imediato, ou seja, foi visualizado 20 minutos após administração dessa taquicinina na RVLM em animais normotensos e a partir dos 30 minutos em animais hipertensos, porém a causa desse efeito tardio permanece desconhecido.

A presença de um mesmo receptor em vias neurais distintas, ou seja, simpatoexcitatórias e simpatoinibitórias na RVLM também já foi descrito para receptores do sistema renina-angiotensina: tanto para o receptor da Angiotensina II, o receptor AT1 (Hu e cols., 2002) quanto para o receptor de Angiotensina- (1-7), o receptor Mas (Becker e cols., 2007). Portanto podemos sugerir que o efeito cardiovascular promovido pela Substância P na RVLM seja resultante do balanço da ativação da via excitatória (neurônios catecolaminérgicos) e da via inibitória (neurônios gabaérgicos) ou ainda de qual via neural (excitatória ou inibitória) é ativada por um determinado estímulo.

Receptor NK1 na RVLM - Imunohistoquímica

Nossos resultados preliminares mostram que o número de neurônios da RVLM que expressam o receptor NK1 não é diferente entre os ratos Wistar e SHR, mas a quantidade de receptores NK1 expressos por neurônios parece ser maior na

RVLM de ratos SHR, ou seja, a densidade de receptores NK1 nesta região encontra-se aumentada nesses animais.

Evidências apontam que a atividade aumentada do sistema nervoso simpático é um fator importante na geração e perpetuação da hipertensão arterial (Wyss, 1993 e Campos-Júnior e cols., 2001). Sabe-se que a RVLM é uma das principais áreas do SNC que controla os neurônios pré-ganglionares simpáticos localizados na CIML (Guertzenstein, 1973; Guertzenstein e Silver, 1974 e Guyenet, 1990), além disso, diferentes estudos têm destacado o aumento da atividade dos neurônios dessa área, RVLM, em ratos SHR (Kubo e cols., 1986; Miyagawa e cols., 1991; Vasquez e cols., 1992; Yan e cols., 1995; Minson e cols., 1996 e Matsuura e cols., 2002), o que sugere a participação dessa área bulbar na patologia de hipertensão.

Além da identificação de possíveis alterações na atividade de áreas do SNC que podem estar envolvidas na gênese da hipertensão arterial, outros estudos têm focado em alterações no conteúdo de neuropeptídeos no cérebro. Estudos têm sugerido a participação da Substância P e de seu receptor, receptor NK1, na hipertensão. Unger e cols. (1980) mostraram que a microinjeção de Substância P no ventrículo lateral cerebral promoveu aumento da pressão arterial três vezes maior nos ratos SHR. Shigematsu e cols. (1996) observaram aumento no número de sítios de ligação para Substância P em áreas do SNC que controlam a função cardiovascular (núcleo motor dorsal do vago, porção dorsomedial e ventral do hipoglosso e núcleo ambíguo) nos animais SHR em comparação com ratos normotensos. Tem sido observado aumento do número de receptores NK1 em ratos SHR em comparação com ratos normotensos na CIML e no gânglio cervical superior (Takano e cols., 1985 e Schoborg e cols., 2000). Em conjunto esses trabalhos suportam a possibilidade desta taquicínina, a Substância P, estar relacionada com a

hipertensão arterial. Nosso estudo mostra que na RVLM de animais hipertensos existe maior densidade de receptores NK1 nessa área. Entretanto não é possível a partir desse resultado se estabelecer uma relação de causa ou consequência.

Correlacionando nossos achados de imunohistoquímica com nossos resultados fisiológicos podemos notar que a microinjeção bilateral do antagonista de Substância P, o CP 99,994, na RVLM de ratos SHR não promoveu alteração dos parâmetros cardiovasculares basais, nem tampouco alteração nas respostas cardiovasculares induzidas pela estimulação do barorreflexo ou do quimiorreflexo nos ratos SHR. Esse resultado contrasta com aquele obtido em animais normotensos, onde se observa que a microinjeção desse mesmo antagonista na RVLM promoveu aumento da pressão arterial, taquicardia, redução significativa da sensibilidade barorreflexa e aumento da resposta pressora quimiorreflexa (Etelvino e Haibara, 2003). Em conjunto esses resultados sugerem a possibilidade de menor atividade tônica da via taquicininérgica na RVLM de ratos SHR, induzindo conseqüente aumento da expressão (*up-regulation*) dos receptores NK1.

Neste sentido, pudemos observar em nosso estudo que o aumento da sensibilidade da bradicardia barorreflexa induzida pela Substância P na RVLM, foi seis vezes maior nos ratos hipertensos em comparação com os ratos normotensos, trazendo o barorreflexo para valores semelhantes ao observado nos animais normotensos. Assim, parece que o prejuízo da função barorreflexa que se observa nos ratos SHR foi revertido pela ação da Substância P na RVLM. Podemos sugerir que esse maior efeito sobre a função barorreflexa nos ratos SHR seja devido à maior densidade de receptores NK1 na RVLM nesses animais.

Também é importante ressaltar que esse aumento da densidade dos receptores NK1 na RVLM observado nos ratos SHR possa ser restrito apenas à via

do barorreflexo, já que a microinjeção de Substância P na RVLM nesses animais não promoveu alterações nas respostas cardiovasculares do quimiorreflexo. Porém para se confirmar essa hipótese em qual via neural os receptores NK1 encontram-se alterados na RVLM de ratos SHR experimentos adicionais devem ser realizados, conjugando a estimulação do reflexo cardiovascular e imunohistoquímica com dupla marcação para a expressão de c-fos e receptor NK1.

SUMÁRIO E CONCLUSÕES

- O fragmento N-terminal de Substância P, SP-(1-7), promoveu bradicardia enquanto o fragmento C-terminal, SP-(5-11), promoveu resposta pressora e bradicardia após serem microinjetados na RVLM de animais Wistar não-anestesiados, mostrando que esses fragmentos são ativos nessa área. Porém a SP-(1-7) não parece ser o fragmento formado a partir da Substância P, e responsável pelo efeito hipotensor inicial da resposta bifásica promovido pela microinjeção de Substância P na RVLM.
- A Substância P (1pmol/100nl) microinjetada bilateralmente na RVLM de animais SHR não-anestesiados promoveu aumento da sensibilidade da bradicardia barorreflexa, mas não alterou as respostas cardiovasculares promovidas pela estimulação do quimiorreflexo, sugerindo que essa taquicinina atue de maneira diferenciada sobre os reflexos cardiovasculares em animais hipertensos.
- A microinjeção bilateral do antagonista da Substância P (CP 99,994; 5µM) na RVLM em ratos SHR, diferente do observado em animais normotensos, não promoveu alteração significativa dos parâmetros cardiovasculares basais, nem nas respostas reflexas à ativação do barorreflexo e do quimiorreflexo, sugerindo que em animais hipertensos pode existir um prejuízo do tônus taquicininérgico promovido pela Substância P.
- O efeito facilitatório da Substância P sobre o barorreflexo na RVLM foi abolido pelo bloqueio do componente simpático cardíaco, mas não pelo bloqueio do componente vagal, tanto em ratos normotensos como hipertensos, sugerindo que esse efeito é dependente da modulação inibitória sobre o componente simpático.

- Os receptores de Substância P, receptores NK1, estão localizados em neurônios catecolaminérgicos e gabaérgicos da RVLM, sugerindo que essa taquicinina possa atuar tanto em vias excitatórias quanto inibitórias nessa área.
- A densidade de receptores NK1 na RVLM é maior em ratos SHR que em ratos Wistar, sugerindo que a expressão dos receptores de Substância P possa ser alterada na hipertensão arterial, provavelmente induzida pela redução do tônus taquicininérgico nesta área.

O conjunto desses resultados nos permite sugerir que a Substância P e seu receptor participam do controle cardiovascular na RVLM, influenciado principalmente as respostas reflexas dos barorreceptores através da modulação do componente simpático, possivelmente por sua interação com neurônios gabaérgicos, facilitando a liberação de GABA. Sugerem ainda que as alterações observadas na expressão do receptor NK1 em animais hipertensos seja um mecanismo compensatório induzido pela redução do tônus taquicininérgico na RVLM, e portanto consequência da hipertensão e não a sua causa. Entretanto, essa redução do tônus taquicininérgico na RVLM de animais hipertensos pode contribuir para a disfunção barorreflexa observada nesses animais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDALA AP, HAIBARA AS and COLOMBARI E. Cardiovascular responses to substance P in the nucleus tractus solitarii: microinjection study in conscious rats. *American Journal Physiology Heart and Circulatory Physiology* 285 (2): H891 – 8, 2003.
- AGARWAL SK and CALARESU FR. Interaction of putative neurotransmitters in rostral ventrolateral medullary cardiovascular neurons. *Journal of the Autonomic Nervous System* 38 (2): 159 - 165, 1992.
- AMENDT K, CZACHURSKI J, DEMBOWSKY K and SELLER H. Neurons within the “chemosensitive area” on ventral surface of brainstem which project to the intermediolateral column. *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology*. 375:289-92, 1978.
- AMENDT K, CZACHURSKI J, DEMBOWSKY K, and SELLER H. Bulbosplinal projections to the intermediolateral cell column: a neuroanatomical study. *Journal Autonomic Nervous System*. 1:103 – 117, 1979.
- APPENRODT E, PHAROW L and BRATTSTROM A . Effects of central substance P on baroreflex regulation. *Neuropeptides*, 25 (1): 77-81, 1993.
- BAILEY CP, MAUBACH KA and JONES RS. Neurokinin-1 receptors in the rat nucleus tractus solitarii: pre- and postsynaptic modulation of glutamate and GABA release. *Neuroscience* 127 (2): 467 – 479, 2004.
- BECKER LK, ETELVINO GM, WALTHER T, SANTOS RAS and CAMPAGNOLE-SANTOS MJ. Immunofluorescence localization of the receptor Mas in cardiovascular-related areas of the rat brain. *American Journal Physiology Heart Circulation Physiology* 293 (3) – H1416 -24, 2007.
- BISCOE TJ and DUCHEN MR. Responses of type I cells dissociated from rabbit carotid body to hypoxia. *Journal Physiology* 428:39-49, 1990.
- BLOCK C, SANTOS RAS, BROSNIHAN KB and FERRARIO CM. Immunocytochemical localization of angiotensin-(1-7) in the rat forebrain. *Peptides* 9 (6), 1395 – 1401, 1988.
- BUTCHER JW, DE FELIPE C, SMITH AJ, HUNT SP and PATON JF. Comparison of cardiorespiratory reflexes in NK1 receptor knockout, heterozygous and wild-type mice in vivo. *Journal of the Autonomic Nervous System* 69 (2-3): 89 – 95, 1998.
- CALARESU FR and YARDLEY CP. Medullary basal sympathetic tone. *Annual Review of Physiology* 50: 511 – 524, 1988.

- CAMPOS JÚNIOR R, COLOMBARI E, CRAVO S e LOPES, O U. Hipertensão Arterial: o quem a dizer o sistema nervoso. *Revista Brasileira de Hipertensão* 8: 41-54, 2001.
- CHALMERS J and PILOWSKY P. Brainstem and bulbospinal neurotransmitter systems in the control of blood pressure. *Journal of Hypertension* 9 (8): 675 – 94, 1991.
- CHAN JY, BARNES CD and CHAN SH. Tonic enhancement of the sensitivity of baroreceptor reflex response by endogenous substance P in the rat. *Regulatory Peptides* 29 (2-3): 199 – 213, 1990.
- CHAVES GZ, CALIGIOERNE SM, SANTOS RA, KHOSLA MC and CAMPAGNOLE-SANTOS MJ. Modulation of the baroreflex control of heart rate by angiotensin-(1-7) at the nucleus tractus solitarii of normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Journal Hypertension*, 18 (12): 1841-8, 2000.
- CHEN J, GAO J, XUE H, LIU Y and XU C. The role of substance P of the central nervous system in the pathogenesis of spontaneously hypertensive rats. *Proc Chin Acad Med Sci*, 5 (3):153-6, 1990.
- CLOUTIER F, ONGALI B, DESCHAMPS K, BROUILLETTE J, NEUGEBAUER W and COUTURE R. Upregulation of tachykinin NK-1 and NK-3 receptor binding sites in the spinal cord of spontaneously hypertensive rat: impact on the autonomic control of blood pressure. *British Journal of Pharmacology* 148 (1): 25 – 38, 2006.
- COLEMAN TG. Arterial baroreflex control of heart rate in the conscious rat. *American Journal Physiology* 238: H515-H520, 1980.
- CUELLO, AC and KANAZAWA, I. The distribution of substance P immunoreactive fibers in the rat central nervous system. *Journal Comp. Neurol.* 178: 129-56, 1978.
- CUELLO AC and McQUEEN DS. Substance P: a carotid body peptide. *Neuroscience Letter*, 17 (1-2):215 - 9, 1980.
- DAMPNEY RA, BLESSING WW and TAN E. Origin of tonic GABAergic inputs to vasopressor neurons in the subretrofacial nucleus of the rabbit. *Journal of the Autonomic Nervous System* 24 (3): 227 – 39, 1988.
- DAMPNEY RAL and McALLEN RM. Differential control of sympathetic fibers supplying hindlimb skin and muscle by subretrofacial neurons in the cat. *Journal Physiolgy Lond.* 395: 41 – 56, 1988.
- DAMPNEY RAL. Functional organization of central pathways regulating the cardiovascular system. *Physiol. Rec.*74:323 – 364, 1994.

- DRAPEAU G, D'ORLÉANS-JUSTE P, DION S, RHALEB NE, ROUISSI NE and REGOLI D. Selective agonists for substance P and neurokinin receptors. *Neuropeptides* 10 (1): 43 – 54, 1987.
- ECHEVARRÍA D, MATUTE C and ALBUS K. Neurons in the rat occipital cortex co-expressing the Substance P-receptor and GABA: a comparison between in vivo and organotypic cultures. *European Journal of Neuroscience* 9: 1530-1535, 1997.
- EDWARDSON JA and McDERMOTT, JR. Metabolism of neuropeptides at brain and pituitary sites. *Biochemical Society Transactions*, 13: 50 – 53, 1985.
- ETELVINO, GM e HAIBARA, AS – Caracterização dos efeitos cardiovasculares da Substância P na área ventrolateral rostral do bulbo em ratos não-anestesiados. *Dissertação de Mestrado*, 2003.
- ETELVINO, GM e HAIBARA, AS. Substance P antagonist into the rostral ventrolateral medulla modulates the cardiovascular reflexes in unanesthetized rats. *V International Symposium on Vasoactive Peptides*: 33, 2004.
- FELDBERG, W and GUERTZENSTEIN, PG. A vasodepressor effect of pentobarbitone sodium. *Journal Physiology* 224: 83-103, 1972.
- FRANCHINI KG and KRIEGER EM. Cardiovascular responses of conscious rats to carotid body chemoreceptor stimulation by intravenous KCN. *Journal Autonomic Nervous System*. 42: 63 –70, 1993.
- FREED AL, AUDUS KL and LUNTE SM. Investigation of substance P transport across the blood-brain barrier. *Peptides* 23 (1): 157 – 65, 2002.
- FUKUDA Y, SATO A and TRZEBSKI A. Carotid chemoreceptor discharge responses to hypoxia and hypercapnia in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Journal of the Autonomic Nervous System*, 19:1 -11, 1987.
- FUXE K, AGNATI LF, ROSELL S, HÄRFSTRAND A, FOLKERS K, LUNDBERG JM, ANDERSSON K and TOMAS HÖKFELT. Vasopressor effects of substance P and C-terminal sequences after intracisternal injection to α -chloralose-anaesthetized rats: blockade by a substance P antagonist. *European Journal of Pharmacology* 77 (2-3): 171 – 6, 1982.
- GALLAGHER PJ, PAXINOS G and WHITE SW. The role of substance P in arterial chemoreflex control of ventilation. *Journal of the Autonomic Nervous System* 12 (2-3): 195 – 210, 1985.

- GAMSE R, LEMBERCK F and CUELLO AC. Substance P in the vagus nerve. Immunochemical and immunohistochemical evidence for axoplasmic transport. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacology* 306 (1): 37 – 44, 1979.
- GEBBER GL and BARMAN SM. Studies on the origin and generation of sympathetic nerve activity. *Clinical and Experimental Hypertension* 10 Supl. 1: 33 - 44, 1988.
- GEBBER GL, BARMAN SM and KOCSIS B. Coherence of medullary unit activity and sympathetic nerve discharge. *American Journal of Physiology* 259 (3 pt 2): R561 – 71, 1990.
- GILLIS RA, HELKE CJ, HAMILTON BL, NORMAN WP and JACOBOWITZ DM. Evidence that substance P is a neurotransmitter of baro- and chemoreceptor afferents In nucleus tractus solitarius. *Brain Research* 181 (2):476 - 481, 1980.
- GIULIANO R, RUGGIERO DA and MORRISON S. Cholinergic regulation of arterial pressure by the C1 area of the rostral ventrolateral medulla. *Journal Neuroscience* 9 (30): 923 – 942, 1989.
- GLICK G, BRAUNWAID E. Relative roles of the sympathetic and parasympathetic nervous systems in the reflex control of heart rate. *Circulation Research* 16: 363 – 375, 1965.
- GUERTZENSTEIN PG. Blood pressure effects obtained by drugs applied to the ventral surface of the brain stem. *Journal Physiology* 229:395-408, 1973.
- GUERTZENSTEIN PG & SILVER A. Fall in blood pressure produce from discrete regions of ventral surface of the medulla by glycine and lesions. *Journal of Physiology* 242: 489-503, 1974.
- GUYENET PG. Role of the ventral medulla oblongata in blood pressure regulation. In *Central Regulation of Autonomic Functions*. Edited by A. D. Loewy and K. M. Spyer, Oxford University Press, pp 145 – 167, 1990.
- HABECK JO, HONIG A, PFEIFFER C and SCHMIDT M. The carotid bodies in spontaneously hypertensive (SHR) and normotensive rats--a study concerning size, location and blood supply. *Anatomischer Anzeiger* 150 (4): 374 – 84, 1981.
- HABECK JO. Peripheral arterial chemoreceptors and hypertension. *Journal of the Autonomic Nervous System* 34 (1): 1 – 7, 1991.
- HAEUSLER G and OSTERWALDER R. Evidence suggesting a transmitter or neuromodulatory role for substance P at the first synapse of the baroreceptor reflex. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 314 (2): 111 – 21, 1980.

- HAIBARA AS, COLOMBARI E, CHIANCA DA JR, BONAGAMBA LG and MACHADO BH. NMDA receptors in NTS are involved in bradycardic but not in pressor response of chemoreflex. *American Journal of Physiology* 269 (4 pt 2): H1421 – 7, 1995.
- HALL ME, MILEY FB and STEWART JM. Modulation of blood pressure by substance P: opposite effects of N- and C-terminal fragments on anesthetized rats. *Life Sciences*, 40:1909-1914, 1987.
- HALL ME, MILEY F and STEWART JM. The role of enzymatic processing in the biological actions of substance P. *Peptides* 10 (4): 895 – 901, 1989.
- HALL ME, GREER RA and STEWART JM. Effects of L-glutamate, substance P and substance P(1-7) on cardiovascular regulation in the nucleus tractus solitaries. *Regulatory Peptides* 46: 102 – 109, 1993.
- HANSSON, E. Could chronic pain and spread of pain sensation be induced and maintained by glial activation? *Acta Physiology* 187: 321 – 327, 2006.
- HEAD GA and MCCARTY R. Vagal and sympathetic components of the heart rate range and gain of the baroreceptor-heart rate reflex in conscious rats. *Journal of the Autonomic Nervous System* 21 (2-3): 203 – 213, 1987.
- HELKE CJ, NEIL JJ, MASSARI J and LOWEY AD. Substance P neurons project from the medulla to the intermediolateral cell column and ventral horn in the rat. *Brain Research*. 243: 147 - 152, 1982.
- HELKE CJ, SHULTS CW, CHASE TN and O DONOHUE TL. Autoradiographic localization of substance P receptors in rat medulla: effect of vagotomy and nodose ganglionectomy *Neuroscience*, 12 : 215-223 , 1984.
- HELKE CJ, O'DONOHUE TL, JACOBWITZ DM. Substance P as baro- and chemoreceptor afferent neurotransmitter: immunocytochemical and neurochemical evidence in the rat. *Peptides*, spring 1 (1): 1 -9, 1980.
- HELKE CJ and NIEDERER AJ. Studies on the coexistence of substance P with other putative transmitters in the nodose and petrosal ganglia. *Synapse* 5 (2): 144 – 51, 1990.
- HIGA KT, MORI E, VIANA FF, MORRIS M and MICHELINI LC. Baroreflex control of heart rate by oxytocin in the solitary-vagal complex. *American Journal Physiology Regulatory Integrative Comparative Physiology* 282:R537-R545, 2002.

- HU L, ZHU D, YU Z, WANG JQ, SUN Z and YAO T. Expression of angiotensin II type 1 (AT1) receptor in the rostral ventrolateral medulla in rats. *Journal of Applied Physiology* 92: 2153-2161, 2002.
- HUCKSTORF C, RUCKBORN K, GERBER B and HABECK JO. Ventilatory and blood pressure reactions to acute hypoxia and hyperoxia in chemoreceptor denervated NWR and SHR. In: *Chemoreceptor and Chemoreceptor Reflexes*. Acker H, Trzebski A, O'Reagan RG. (eds.). New York, Plenum, 383 – 91, 1990.
- JACOBOWITZ DM and HELKE CJ. Localization of substance P immunoreactive nerves in the carotid body. *Brain Res. Bull.* 5 (2): 195 - 197, 1980.
- JESKE I and McKENNA KE. Quantitative analysis of bulbospinal projections from the rostral ventrolateral medulla: contribution of C1-adrenergic and nonadrenergic neurons. *Journal of Comparative Neurology* 324 (1): 1 – 13, 1992.
- JOHANSSON O; HOKFELT, T; PERNOW, B; JEFECOATE, SL; WITHE N and STEINBUSCH, HWM. Immunohistochemical support for three putative transmitters in one neuron: coexistence of 5-hydroxy - tryptamine, substance P and thyrotropin releasing hormone like immunoreactivity in medullary neurons projecting to the spinal cord. *Neuroscience* 6: 1857-83, 1981.
- KISHI T, HIROOKA Y, KIMURA Y, SAKAI K, ITO K, SHIMOKAWA H and TAKESHITA A. Overexpression of eNOS in RVLM improves impaired baroreflex control of heart rate in SHRSP. *Hypertension* 41: 255-260, 2003.
- KUBO T, NAGURA J, KIHARA M and MISU Y. Cardiovascular effects of L-glutamate and gamma-aminobutyric acid injected into the rostral ventrolateral medulla in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Arch. Int. Pharmacodyn Ther*, 279 (1): 150 - 161, 1986.
- KUBO T and KIHARA M. Blood pressure modulation by substance P in the rat nucleus tractus solitarius. *Brain Research* 413 (2): 379 – 83, 1987.
- KUMAGAI H, AVERILL DB, KHOSLA MC and FERRARIO CM. Role of nitric oxide and angiotensin II in the regulation of sympathetic nerve activity in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 21 (4): 476 – 84, 1993.
- LI Q, GOODCHILD AK, SEYEDABADI M and PILOWSKY PM. Preprotachykinin A mRNA is colocalized with tyrosine hydroxylase-immunoreactivity in bulbospinal neurons. *Neuroscience* 136: 205-2016, 2005.
- LI Y and GUYENET PG. Effect of substance P on C1 and other bulbospinal cells of the RVLM in neonatal rats. *American Journal Physiology* 273: R 805 –R 813, 1997.

- LINDEFORS N, YAMAMOTO Y, PANTALEO T, LAGERCRANTZ H, BRODIN E and UNGERSTEDT U. In vivo release of substance P in the nucleus tractus solitarii increases during hypoxia. *Neuroscience Letters* 69 (1): 94 – 7, 1986.
- LJUNGDAHL A, HOKFELT T, NILSSON G. Distribution of substance P-like immunoreactivity in the central nervous system of the rat. Cell bodies and nerve terminals. *Neuroscience* 3(10):861-943,1978.
- LOEWY A.D. Central autonomic pathways. In: Central regulation of autonomic functions. Loewy, A. D.; Spyer, K. M. Eds. Oxford, Oxford University Press, 1990.
- LOEWY AD and SAWYER WB. Substance P antagonist inhibits vasomotor responses elicited from ventral medulla in rat. *Brain Reserach* 245 (2): 379 – 83, 1982.
- LORENZ RG, SAPER CB, WONG DL, CIANARELLO RD and LOWEY D. Co-localization of substance P and phenylethanolamine N-methyltransferase like immunoreactivity in neurons of ventrolateral medulla that project to the spinal cord: Potential role in control of vasomotor tone. *Neuroscience Letters* 55:255-60, 1985.
- MA QP and BLEASDALE C. Modulation of brain stem monoamines and gamma-aminobutyric acid by NK1 receptors in rats. *Neuroreport* 13 (14): 1809 – 1812, 2002.
- MAKEHAM JM, GOODCHILD AK and PILOWSKY PM. NK1 receptor activation in rat rostral ventrolateral medulla selectively attenuates somato-sympathetic reflex while antagonism attenuates sympathetic chemoreflex. *American Journal Physiology Regulatory Integrative Comparative Physiology* 288:R1707 – R 1715, 2005.
- MAO L and ABDEL-RAHMAN AA. Inhibition of glutamate uptake in the rostral ventrolateral medulla enhances baroreflex-mediated bradycardia in conscious rats. *Brain Research* 654: 343-348, 1994.
- MARTINI F, REYNAUD J-C and PUIZILLOUT J-J. Effects of substance P on cardiovascular regulation in the rabbit. *Journal of the Autonomic Nervous System* 51: 143 – 152, 1995.
- MASSARI VJ, JOHNSON TA, LLEWELLYN-SMITH IJ and GATTI PJ. Substance P nerve terminals synapse upon negative chronotropic vagal motoneurons. *Brain Research* 660 (2):275 – 87, 1994.
- MASSARI VJ, JOHNSON TA, GILLIS RA and GATTI PJ. What are the roles of substance P and neurokinin-1 receptors in the control of negative chronotropic or negative dromotropic vagal motoneurons? A physiological and ultrastructural analysis. *Brain Research* 715 (1-2): 197 – 207, 1996.

- MATSAS R, FULCHER IS, KENNY AJ and TURNER A. Substance P and [Leu]enkephalin are hydrolyzed by an enzyme in pig caudate synaptic membranes that is identical with the endopeptidase of Kidney microvilli. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80: 3111- 3115, 1983.
- MATSUURA T, KUMAGAI H, KAWAI A, ONIMARU H, IMAI M, OSHIMA N, SAKATA K and SARUTA T. Rostral ventrolateral medulla neurons of neonatal Wistar-Kyoto and spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 40 (4): 560 – 5, 2002.
- MAUBACH KA, MARTIN K, SMITH DW, HEWSON L, FRANKSHUN RA, HARRISON T and SEABROOK GR. Substance P stimulates inhibitory synaptic transmission in the guinea pig basolateral amygdale in vitro. *Neuropharmacology* 40: 806 – 817, 2001.
- MEELEY MP, RUGGIERO DA, ISHITSUKA T and REIS DJ. Intrinsic γ -aminobutyric acid neurons in the nucleus of the solitary tract and rostral ventrolateral medulla of the rat: immunocytochemical and biochemical study. *Neuroscience Letters* 58:83 -89, 1985.
- MILNER T, MORRISON SF, ABATE C and REIS DJ. Phenylethanolamine N-methyltransferase containing terminals synapse directly on sympathetic preganglionic neurons in the rat. *Brain Research* 448:205-22, 1988.
- MILNER T, REIS DJ and GIULIANO R. Afferent sources of substance P in the C1 area of the rat rostral ventrolateral medulla. *Neuroscience Letters*. 205: 37 - 40, 1996.
- MINSON J, ARNOLDA L, LIEWLLYN-SMITH I, PILOWSKY P and CHALMERS J. Altered c-fos in rostral medulla and spinal cord of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*, 27 (1):433-441, 1996.
- MIYAGAWA M, CHIDA K, KAWAMURA H and TAKASU T. Effects of chemical stimulation and lesion of the rostral ventrolateral medulla in spontaneously hypertensive rats. *Neuroscience Letters* 132 (1): 1 - 4, 1991.
- MORILAK DA, MORRIS M and CHALMERS J. Release of substance P in the nucleus tractus solitarius measured by in vivo microdialysis: response to stimulation of the aortic depressor nerves in rabbit. *Neuroscience Letters* 94 (1-2): 131 – 7, 1988.
- MORRISON SF; ERNSBERGER P; MILNER TA. A glutamate mechanism in the intermediolateral nucleus mediates sympathoexcitatory responses to stimulation of the rostral ventrolateral medulla. *Progress in Brain Research* 81; 159 – 169, 1989.

- MORRISON SF and REIS DJ. Responses of sympathetic preganglionic neurons to rostral ventrolateral medullary stimulation. *American Journal of Physiology* 261 (5 pt2): R1247 – 56, 1991.
- OTSUKA M and YOSHIOKA K. Neurotransmitter Functions of Mammalian Tachykinins. *Physiological Reviews*, 73 (2): 229 – 308, 1993.
- PATON JFR and KASPAROV S. Sensory channel specific modulation in the nucleus of the solitary tract. *Journal Autonomic Nervous System*. 80: 117- 129, 2000.
- PAXINOS G and WATSON C. *The rat brain in the stereotaxic coordinates*, 2 Edition, Academic Press, New York, 1986.
- PETTY M and REID J. The cardiovascular effects of centrally administered substance P in the anaesthetised rabbit. *European Journal of Pharmacology* 82(1-2): 9 -14, 1982.
- PIERCEY MF, DOBRY PJK, EINSPAHR FJ, SCHROEDER LA and MASIQUES N. Use of substance P fragmentos to differentiate substance P receptor of different tissues. *Regulatory Peptides*, 3: 337 – 349, 1982.
- PRZYBYLSKI J, TRZEBSKI A, CZYZEWSKI T and JODKOWSKI J. Responses to hyperoxia, hypoxia, hypercapnia and almitrine in spontaneously hypertensive rats. *Bull Eur Physiopath Resp* 18: 145 – 54, 1982.
- PUNNEN S, WILLETTE R and KRIEGER AJ. Cardiovascular response to injections of enkephalin in the pressor area of the ventrolateral medulla. *Neuropharmacology*. 23 (8):939 –946, 1984.
- REGOLI D, MIZRAHI J, D'ORLÉANS-JUSTE P and ESCHER E. Receptors for substance P II classification by agonist fragments and homologues. *European Journal of Pharmacology*, 97: 171 – 177, 1984.
- REGOLI K, DRAPEAU G, DION, S and COUTURE, R. New selective agonist for neurokinin receptors : pharmacologic tools for receptors characterization. *Trends Pharmacol Sci (TIPS)* 9: 290-95, 1988.
- REGOLI D, DION S and RHALEB NE. Selective agonists for receptors of substance P and related neurokinins. *Biopolymers* 28: 81-90, 1989.
- RIBEIRO-DA-SILVA A and HÖKFELT T. Neuroanatomical localisation of Substance P in the CNS and sensory neurons. *Neuropeptides* 34 (5): 256 – 71, 2000.

- ROSS CA, ARMSTRONG DM, RUGGIERO DA, PICKEL VM, JOH TH and REIS DJ. Adrenaline neurons in the rostral ventrolateral medulla innervate thoracic spinal cord: a combined immunocytochemical and retrograde transport demonstration. *Neuroscience letters* 25 (3): 257 – 262, 1981.
- ROSS C, RUGGIERO D, PARK DH, JOH TH, SVED F, FERNANDEZ-PARDAL J, SAAVEDRA JM, and REIS DJ. Tonic vasomotor control by rostral ventrolateral medulla: Effect of electrical or chemical stimulation of the area containing C₁ adrenaline neurons on arterial pressure, heart rate, and plasma catecholamines and vasopressin. *Journal of Neuroscience* 4, 474-494, 1984.
- ROSS CA, RUGGIERO DA and REIS DJ. Projections from the Nucleus Tractus Solitarius to the Rostral Ventrolateral Medulla. *Journal of Comparative Neurology*, 242: 511-534, 1985.
- RUGGIERO DA, MEELEY MP, ANWAR M and REIS DJ. Newly identified GABAergic neurons in regions of the ventrolateral medulla which regulate blood pressure. *Brain Research* 339: 171 - 177, 1985.
- SAKUMA M, YOSHIOKA K, SUZUKI H, YANAGISAWA M, ONISHI Y, KOBAYASHI N and OTSUKA M. Substance P-evoked release of GABA from isolated spinal cord of the newborn rat. *Neuroscience* 45 (2): 323-330, 1991.
- SAKURADA T, GREVES P, STEWART J and TERENIUS L. Measurement of substance P metabolites in rat CNS. *J. Neurochem.* 44: 718 - 722, 1985.
- SCHOBORG RV, HOOVER DB, TOMPKINS JD and HANCOCK JC. Increased ganglionic responses to substance P in hypertensive rats due to upregulation of NK1 receptors. *American Journal Physiology Regulatory Integrative Comparative Physiology* 279: R1685 – R 1694, 2000.
- SEAGARD JL, DEAN C and HOPP FA. Modulation of the carotid baroreceptor reflex by substance P in the nucleus tractus solitarius. *Journal of the Autonomic Nervous System* 78 (2-3): 77 – 85, 2000.
- SHIGEMATSU K, NIWA M and SAAVEDRA JM. Increased density of substance P binding sites in specific brainstem nuclei of spontaneously hypertensive rats. *Brain Research*, 370:383-387, 1986
- SHULTS CW, QUIRION R, CHRONWALL B, CHASE TN and O DONOHUE TL. A comparison of the anatomical distribution of substance P and substance P receptors in the rat central nervous system. *Peptides*, 5: 1097-1128, 1984.
- SMITH P, JAGO R and HEATH D. Glomic cells and blood vessels in the hyperplastic carotid bodies of spontaneously hypertensive rats. *Cardiovascular Research* 18 (8): 471 – 82, 1984.

- SPYER KM. Organisation of baroreceptor pathways in the brain stem. *Brain Research*. 87: 221 -226, 1975.
- SRINIVASAN M, GOINY M, PANTALEO T, LAGERCRANTZ H, BRODIN E, RUNOLD M and YAMAMOTO Y. Enhanced in vivo release of substance P in the nucleus tractus solitarii during hypoxia in the rabbit: role of peripheral input. *Brain Research* 546 (2): 211 – 6, 1991.
- STRACK AM, SAWYER WB, PLATT KB and LOEWY AD. CNS cell groups regulating the sympathetic outflow to adrenal gland as revealed by transneuronal cell body labeling with pseudorabies virus. *Brain Research* 491 (2): 279 - 296, 1989.
- SUN MK and GUYENET PG. Arterial baroreceptor and vagal inputs to sympathoexcitatory neurons in rat medulla. *American Journal Physiology*. 252: R699- R709, 1985.
- SUN MK and REIS DJ. Evidence nitric oxide mediates the vasodepressor response to hypoxia in sino-denervated rats. *Life Sci*. 50: 555 – 565, 1992.
- SUN MK and SPYER KM. Responses of RVL-spinal vasomotor neurons to chemoreceptor stimulation in rats. *Journal Autonomic Nervous System* 33:79 – 84, 1991.
- SUN M and GUYENET PG. Effects of vasopressin and other neuropeptides on rostral medullary sympathoexcitatory neurons “in vitro”. *Brain Research*, 492: 262 – 270, 1989.
- TAKANO Y, SAWYER WB and LOEWY AD. Substance P mechanisms of the spinal cord related to vasomotor tone in spontaneously hypertensive rat. *Brain Research* 334: 105 – 116, 1985.
- TAKAYAMA K and MIURA M. Glutamate-immunoreactive neurons of the central amygdaloid nucleus projecting to the subretrofacial nucleus of SHR and WKY rats-a double-labeling study. *Neuroscience Letter*. 134: 62 – 66, 1991.
- TRACZYK W Z and KUBICKI J. The pressor response to substance P and hexapeptide [pGlu⁶ SP₆₋₁₁ injections into the cerebral ventricles in rats. *Neuropharmacology*, 19:607 – 611, 1980.
- TSCHÖPE C, JOST N, UNGER T and CULMAN J. Central cardiovascular and behavioral effects of carboxy- and amino-terminal fragments of substance P in conscious rats. *Brain Research* 690: 15-24, 1995.
- UNGER T, ROCKHOLD RW, YUKIMURA T, RETTIG R and GANTEN D. Blood pressure and heart rate responses to centrally administered substance P are increased in spontaneously hypertensive rats. *Clinical Science*, 59: 299 - 302, 1980.

- UNGER T, RASCHER W, SCHUSTER C, PAVLOVITCH R, SCHÖMIG A, DIETZ R and GANTEN D. Central blood pressure effects of substance P and angiotensin II: role of the sympathetic nervous system and vasopressin. *European Journal of Pharmacology* 71(1): 33 – 42, 1981.
- URBANSKI RW, MURUGAIAN J, KRIEGER AJ and SAPRU H. Cardiovascular effects of Substance P receptor stimulation in ventrolateral medullary pressor and depressor areas. *Brain Research*, 491:383-389, 1989.
- VASQUEZ EC, LEWIS SJ, VARNER KJ and BRODY MJ. Chronic lesion of rostral ventrolateral medulla in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 19 (Suppl. II): 154 - 158, 1992.
- VERBERNE AJ and GUYENET PG. Medullary pathway of the Bezold-Jarisch reflex in the rat. *American Journal of Physiology* 263 (6 pt 2): R1195 – 202, 1992
- WANG H, WESTON MC, McQUISTON TJ, STORNETTA RL and GUYENET PG. Neurokinin-1 receptor-expressing cells regulate depressor region of rat ventrolateral medulla. *American Journal Physiology Heart Circulatory Physiology* 285: H 2757 – 2769, 2003.
- WERRY EL, LIU GJ and BENNETT MR. Glutamate-stimulated ATP release from spinal cord astrocytes is potentiated by substance P. *Journal of Neurochemistry* 99: 924 – 936, 2006.
- WIENRICH M and KETTENMANN H. Activation of Substance P receptors leads to membrane potential responses in cultured astrocytes. *Glia* 2 (3): 155 -160, 1989.
- WILLETTE RN, PUNNEN S, KRIEGER AJ and SAPRU HN. Differential regulation of regional vascular resistance by the rostral and caudal ventrolateral medulla in the rat. *Journal of the Autonomic Nervous System* 18 (2): 143 -51, 1987.
- WILLETTE RN, PUNNEN S, KRIEGER AJ and SAPRU HN. Cardiovascular control by cholinergic mechanisms in the rostral ventrolateral medulla. *Journal Pharmacology Exp Ther.* 231 (2): 457 – 463, 1984.
- WYSS JM. The role of sympathetic nervous system in hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2:265 - 73, 1993.
- YANG TL, CHAI CY and YEN CT. Enhanced sympathetic reactivity to glutamate stimulation in medulla oblongata of spontaneously hypertensive rats. *American Journal Physiology* 268: H1499 - 509, 1995.
- ZHANG C, BONAGAMBA LG and MACHADO BH. Blockade of NK-1 receptors in the lateral commissural nucleus tractus solitarii of awake rats had no effect on the cardiovascular responses

to chemoreflex activation. Brazilian Journal of Medical and Biological Research 33 (11): 1379 – 85, 2000.

ZHANG X, ABDEL-RAHMAN AA and WOOLES WR. Selective sensitization by L-glutamate of baroreflex-mediated bradycardia following microinjection into the rostral ventrolateral medulla. Brain Research 520: 141 – 150, 1990.

ZOLFAGHARI R, BAKER CR, CANIZARO PC, FEOLA M, AMIRGHOLAMI A and BEHAL FJ. Human lung post-proline endopeptidase: purification and action on vasoactive peptides. Enzyme. 36 (3): 165 -78, 1986.

APÊNDICE

Tabela 1: Efeitos cardiovasculares induzidos pela microinjeção unilateral de doses crescentes de Substância P [SP-(1-7)] na RVLM em ratos normotensos não-anestesiados.

GRUPO A – Sem resposta pressora										
Ratos	Valores Basais					Após microinjeção – SP-(1-7)				
	PAM (mmHg)					Δ PAM (mmHg)				
	TAMPÃO	1 pmol	10pmol	0.5nmol	1 nmol	TAMPÃO	1 pmol	10pmol	0.5nmol	1 nmol
1	---	114	---	---	---	---	+4.0	---	---	---
2	133	---	107	114	107	-4.0	---	+9.0	0	+2.0
3	110	---	107	99	---	0	---	+1.0	+5.0	---
4	117	---	111	108	---	+2.0	---	0	+5.0	---
5	84	82	---	---	83	0	-2.0	---	---	+2.0
x\pmepm	---	---	---	---	---	-0.5\pm1	1\pm3	3\pm3	3\pm2	2\pm0
GRUPO B – Com resposta pressora										
Ratos	Valores Basais					Após microinjeção – SP-(1-7)				
	PAM (mmHg)					Δ PAM (mmHg)				
	TAMPÃO	1 pmol	10pmol	0.5nmol	1 nmol	TAMPÃO	1 pmol	10pmol	0.5nmol	1 nmol
1	135	131	---	---	---	+3.0	+25.0	---	---	---
2	114	107	---	---	---	+3.0	+14.0	---	---	---
3	---	---	---	101	---	---	---	---	+36.0	---
4	116	---	119	117	119	+1.0	---	+13.0	+21.0	+17.0
5	---	---	113	128	116	---	---	+28.0	+31.0	+29.0
x\pmepm	---	---	---	---	---	2\pm1	19\pm5	20\pm7	29\pm4 **	23\pm6 *
GRUPO A + B						Após microinjeção – SP-(1-7)				
						Δ PAM (mmHg)				
						TAMPÃO	1 pmol	10pmol	0.5nmol	1 nmol
x\pmepm						0.7\pm0.9	10\pm6	10\pm5	16\pm6	12\pm6

(**/*) Diferente em relação ao controle Tampão (p<0.01 e p<0.05; ANOVA)

GRUPO A – Sem resposta pressora										
Ratos	Valores Basais					Após microinjeção – SP-(1-7)				
	FC (bpm)					Δ FC (bpm)				
	TAMPÃO	1 pmol	10pmol	0.5nmol	1 nmol	TAMPÃO	1 pmol	10pmol	0.5nmol	1 nmol
1	---	362	---	---	---	---	+6.0	---	---	---
2	302	---	272	298	290	+6.0	---	-9.0	-21.0	-25.0
3	341	---	349	329	---	+2.0	---	-25.0	-7.0	---
4	288	---	292	313	---	-1.0	---	-9.0	-19.0	---
5	294	290	---	---	289	+3.0	+3.0	---	---	+6.0
x±epm	---	---	---	---	---	2±1	4±1	-14±5 *	-16±4 *	-9±15
GRUPO B – Com resposta pressora										
Ratos	Valores Basais					Após microinjeção – SP-(1-7)				
	FC (bpm)					Δ FC (bpm)				
	TAMPÃO	1 pmol	10pmol	0.5nmol	1 nmol	TAMPÃO	1 pmol	10pmol	0.5nmol	1 nmol
1	368	278	---	---	---	+13.0	+11.0	---	---	---
2	302	311	---	---	---	+23.0	+5.0	---	---	---
3	---	---	---	313	---	---	---	---	-36.0	---
4	366	---	335	265	381	-3.0	---	+1.0	-25.0	-79.0
5	---	---	312	286	318	---	---	-7.0	-31.0	-22.0
x±epm	---	---	---	---	---	11±7	8±3	-3±4	-31±3**	-50±28 *
GRUPO A + B						Após microinjeção – SP-(1-7)				
						Δ FC (bpm)				
						TAMPÃO	1 pmol	10pmol	0.5nmol	1 nmol
x±epm						6±3	6±2	-10±4 *	-21±4 *	-30±18 *

(***) Diferente em relação ao controle Tampão (p<0.01 e p<0.05; ANOVA)

Tabela 2: Efeitos cardiovasculares induzidos pela microinjeção unilateral de doses crescentes de Substância P [SP-(5-11)] na RVLM em ratos normotensos não-anestesiados

Δ PAM (mmHg)						
Ratos	Valores Basais			Após microinjeção – SP-(5-11)		
	TAMPÃO	10 pmol	1 nmol	TAMPÃO	10 pmol	1 nmol
1	91	---	86	-1.0	---	+10.0
2	111	---	104	+3.0	---	+21.0
3	94	---	79	-5.0	---	+13.0
4	119	---	108	-4.0	---	+60.0
5	109	---	121	-3.0	---	+19.0
6	137	132	---	-5.0	+17.0	---
7	121	103	---	+4.0	+52.0	---
8	107	108	---	+4.0	+9.0	---
9	95	86	---	+4.0	+31.0	---
10	104	---	---	+8.0	---	---
x±epm	---	---	---	0.5±1	27±9 **	25±9 **

Δ FC (bpm)						
Ratos	Valores Basais			Após microinjeção – SP-(5-11)		
	TAMPÃO	10 pmol	1 nmol	TAMPÃO	10 pmol	1 nmol
1	368	---	325	+12.0	---	+4.0
2	359	---	392	-3.0	---	-52.0
3	348	---	323	+8.0	---	+2.0
4	374	---	336	+12.0	---	-39.0
5	368	---	346	-24.0	---	-20.0
6	349	346	---	+7.0	-25.0	---
7	404	400	---	-2.0	-32.0	---
8	315	389	---	+14.0	-5.0	---
9	344	329	---	-12.0	-18.0	---
10	348	---	---	+10.0	---	---
x±epm	---	---	---	2±4	-20±6 **	-21±11*

(*/**) Diferente em relação ao controle Tampão (p<0.01 e p<0.05; ANOVA e Teste-t não-pareado)

Tabela 3: Avaliação da duração do efeito do bloqueio vagal sobre a sensibilidade da bradicardia barorreflexa ($\Delta FC/\Delta PAM$, bpm/mmHg - $\Delta IP/\Delta PAM$, ms/mmHg) induzida pela injeção i.v. de fenilefrina (5 μ g/0.1ml) em ratos Wistar não-anestesiados

$\Delta FC/\Delta PAM$ - (bpm/mmHg)					
Controle	RATOS				x\pmepm
	01	02	03	04	
		2.0	1.7	1.7	1.65
Após Metil-Atropina (1mg/Kg)					
10	0.85	0.30	0.16	---	0.4\pm0.2**
30	0.50	0.50	1.2	0.52	0.7\pm0.2**
60	0.70	0.80	0.50	0.70	0.7\pm0.1**
90	0.90	1.20	0.46	0.66	0.8\pm0.1**
120	1.50	1.50	0.90	1.20	1.3\pm0.1*
150 min	1.30	1.70	1.10	1.40	1.4\pm0.1
$\Delta IP/\Delta PAM$ - (ms/mmHg)					
Controle	RATOS				x\pmepm
	01	02	03	04	
		1.5	0.90	1.2	0.96
Após Metil-Atropina (1mg/Kg)					
10	0.25	0.11	0.06	---	0.14\pm0.05**
30	0.19	0.17	0.37	0.16	0.22\pm0.05**
60	0.25	0.27	0.24	0.30	0.26\pm0.01**
90	0.37	0.53	0.20	0.26	0.34\pm0.1**
120	0.74	0.70	0.45	0.55	0.61\pm0.1**
150 min	0.70	0.82	0.48	0.67	0.70\pm0.1**

(***) Diferente em relação ao Controle ($p < 0.01$ e $p < 0.05$; ANOVA).

Tabela 4: Efeito da microinjeção bilateral de Substância P (1 pmol/100nl) na RVLM sobre as alterações da pressão arterial média (Δ PAM, mmHg) e de intervalo de pulso (Δ IP, ms) induzidas pela injeção i.v. de fenilefrina (5 μ g/0.1ml) sob bloqueio vagal em ratos Wistar não-anestesiados

PAM (mmHg)														
RATOS	Antes		Metil-Atropina		Substância P após Metil-Atropina									
	Metil-Atropina		Controle		10 min		20 min		30 min		45 min		60 min	
	Basal	Delta	Basal	Delta	Basal	Delta	Basal	Delta	Basal	Delta	Basal	Delta	Basal	Delta
1	87	+20	94	+28	---	---	89	+28	83	+22	98	+24	112	+29
2	94	+40	100	+43	92	+25	88	+36	89	+35	86	+33	85	+31
3	107	+48	107	+54	120	+48	120	+53	121	+50	126	+57	123	+51
4	95	+40	112	+44	107	+48	107	+45	108	+44	110	+50	105	+54
5	100	+46	112	+46	126	+29	125	+37	122	+43	122	+42	116	+44
6	91	+35	85	+48	93	+46	93	+52	97	+50	100	+45	100	+47
7	98	+44	111	+41	120	+36	115	+42	125	+45	119	+36	116	+48
X \pm	96	---	103	---	110	---	105	---	106	---	109	---	108	---
epm	± 2		± 4		± 6		± 6		± 6		± 5		± 5	
FC (bpm)														
RATOS	Antes		Metil-Atropina		Substância P após Metil-Atropina									
	Metil-Atropina		Controle		10 min		20 min		30 min		45 min		60 min	
	Basal	Delta	Basal	Delta	Basal	Delta	Basal	Delta	Basal	Delta	Basal	Delta	Basal	Delta
1	369	-27	444	-7	---	---	455	-9	443	-20	489	-15	509	-37
2	372	-49	497	-43	476	-19	425	-35	419	-38	420	-49	378	-28
3	319	-74	444	-36	380	-23	391	-31	413	-39	429	-64	457	-48
4	356	-70	496	-29	425	-34	420	-62	418	-59	432	-82	454	-104
5	394	-87	510	-25	399	-8	411	-14	423	-39	444	-56	408	-29
6	369	-89	424	-32	417	-37	437	-65	395	-60	391	-76	379	-92
7	352	-49	463	-7	480	-28	406	-6	426	-24	426	-11	431	-42
X \pm	362 \pm	---	468 \pm	---	429 \pm	---	421 \pm	---	420 \pm	---	433 \pm	---	431 \pm	---
epm	9		12**		17**		8**		5**		11**		18**	

(**) Diferente em relação ao valor anterior ao pré-tratamento com Metil-Atropina ($p < 0.01$; ANOVA).

Índice do Barorreflexo ($\Delta IP/\Delta PAM$, ms/mmHg)						
RATO	Metil-Atropina	Substância P após Metil-Atropina				
	Controle	10 min	20 min	30 min	45 min	60 min
1	0.07	---	0.10	0.32	0.12	0.30
2	0.25	0.20	0.36	0.40	0.57	0.39
3	0.22	0.21	0.26	0.30	0.42	0.31
4	0.16	0.25	0.53	0.54	0.64	0.72
5	0.13	0.10	0.13	0.32	0.48	0.25
6	0.25	0.30	0.46	0.54	0.82	1.10
7	0.05	0.25	0.05	0.18	0.08	0.31
x\pmepm	0.16\pm0.03	0.22\pm0.02	0.27\pm0.07	0.37\pm0.05 **	0.45\pm0.1 *	0.48\pm0.1 *

(***) Diferente em relação ao Controle ($p < 0.01$ e $p < 0.05$; ANOVA).

Tabela 5: Efeito da microinjeção bilateral de Salina (100nl) na RVLM sobre as alterações da pressão arterial média (Δ PAM, mmHg) e de intervalo de pulso (Δ IP, ms) induzidas pela injeção i.v. de fenilefrina (5 μ g/0.1ml) sob bloqueio vagal em ratos Wistar não-anestesiados

PAM (mmHg)														
RATOS	Antes		Metil-Atropina		Salina após Metil-Atropina									
	Metil-Atropina		Controle		10 min		20 min		30 min		45 min		60 min	
	Basal	Delta	Basal	Delta	Basal	Delta	Basal	Delta	Basal	Delta	Basal	Delta	Basal	Delta
1	100	+43	115	+35	117	+31	120	+36	116	+46	116	+39	114	+45
2	105	+44	122	+44	130	+33	131	+37	132	+45	126	+47	129	+42
3	107	+50	113	+47	136	+42	128	+52	124	+49	115	+63	120	+52
4	95	+49	92	+38	107	+26	102	+39	105	+39	103	+46	100	+48
5	110	+39	114	+48	123	+37	114	+39	115	+46	110	+56	106	+49
X \pm	103	---	111	---	123	---	119	---	118	---	114	---	114	---
epm	± 3		± 5		$\pm 5^*$		± 5		± 4		± 4		± 5	

FC (bpm)														
RATOS	Antes		Metil-Atropina		Salina após Metil-Atropina									
	Metil-Atropina		Controle		10 min		20 min		30 min		45 min		60 min	
	Basal	Delta	Basal	Delta	Basal	Delta	Basal	Delta	Basal	Delta	Basal	Delta	Basal	Delta
1	347	-73	484	-26	382	-17	416	-23	406	-26	427	-31	408	-46
2	337	-72	460	-23	490	-18	487	-24	416	-42	380	-38	422	-41
3	384	-55	423	-36	478	-21	471	-32	425	-31	427	-49	393	-35
4	362	-72	420	-19	373	-6	363	-10	374	-18	369	-20	369	-24
5	370	-46	435	-22	468	-19	438	-13	444	-14	413	-39	407	-35
X \pm	360 \pm	---	444 \pm	---	438 \pm	---	435 \pm	---	413 \pm	---	403 \pm	---	400 \pm	---
epm	8		12**		25**		22**		11**		12*		9*	

(***) Diferente em relação ao valor anterior ao pré-tratamento com Metil-atropina ($p < 0.01$ e $p < 0.05$; ANOVA).

Índice do Barorreflexo ($\Delta IP/\Delta PAM$, ms/mmHg)						
RATO	Metil-Atropina	Salina após Metil-Atropina				
	Controle	10 min	20 min	30 min	45 min	60 min
1	0.20	0.22	0.25	0.22	0.28	0.42
2	0.16	0.15	0.16	0.29	0.32	0.36
3	0.28	0.14	0.19	0.22	0.30	0.27
4	0.18	0.10	0.13	0.20	0.19	0.23
5	0.14	0.16	0.10	0.08	0.26	0.28
x\pmepm	0.19\pm0.02	0.15\pm0.02	0.17\pm0.02	0.21\pm0.03	0.27\pm0.02	0.31\pm0.03

Tabela 6: Avaliação da duração do efeito do bloqueio simpático cardíaco sobre a sensibilidade da bradicardia barorreflexa ($\Delta FC/\Delta PAM$, bpm/mmHg - $\Delta IP/\Delta PAM$, ms/mmHg) induzida pela injeção i.v. de fenilefrina (5 μ g/0.1ml) em ratos Wistar não-anestesiados

$\Delta FC/\Delta PAM$ - (bpm/mmHg)					
	RATOS				x\pmepm
	01	02	03	04	
	Controle	2.20	2.30	1.66	1.6
Após Atenolol					
10	1.20	1.20	1.00	0.74	1.0\pm0.1**
30	1.30	1.50	1.20	1.10	1.3\pm0.1**
60	1.00	1.30	0.96	1.20	1.1\pm0.1*
90	1.45	1.77	0.87	0.78	1.2\pm0.2**
120	1.30	1.20	1.25	0.82	1.1\pm0.1*
150 min	---	1.70	2.9	1.30	2.0\pm0.5
$\Delta IP/\Delta PAM$ - (ms/mmHg)					
	RATOS				x\pmepm
	01	02	03	04	
	Controle	1.38	1.2	1.10	0.87
Após Atenolol					
10	0.75	0.62	0.76	0.46	0.65\pm0.07**
30	0.84	0.72	0.69	0.71	0.74\pm0.03*
60	0.61	0.75	0.59	0.77	0.68\pm0.04*
90	0.90	1.00	0.87	0.78	0.71\pm0.14*
120	0.69	0.72	1.25	0.82	0.67\pm0.07*
150 min	---	1.00	1.8	1.30	1.40\pm0.4

(**/*) Diferente em relação ao Controle ($p < 0.01$ e $p < 0.05$; Teste-t Pareado).

Tabela 7: Efeito da microinjeção bilateral de Substância P (1pmol/100nl) na RVLM sobre as alterações da pressão arterial média (Δ PAM, mmHg) e de intervalo de pulso (Δ IP, ms) induzidas pela injeção i.v. de fenilefrina (5 μ g/0.1ml) sob simpático cardíaco em ratos Wistar não-anestesiados

PAM (mmHg)														
RATOS	Antes		Atenolol		Substância P após Atenolol									
	Atenolol		Controle		10 min		20 min		30 min		45 min		60 min	
	Basal	Delta	Basal	Delta	Basal	Delta	Basal	Delta	Basal	Delta	Basal	Delta	Basal	Delta
1	110	+50	106	+42	129	+52	124	+48	119	+47	118	+41	116	+44
2	110	+46	117	+45	110	+37	107	+32	110	+26	115	+37	119	+37
3	102	+37	92	+39	92	+46	102	+49	96	+53	96	+50	97	+54
4	110	+38	125	+40	118	+37	121	+33	126	+34	127	+36	125	+38
5	103	+35	116	+42	117	+29	115	+36	119	+40	123	+44	121	+40
X \pm	107	---	111	---	113	---	114	---	114	---	116	---	116	---
epm	± 2		± 6		± 6		± 6		± 5		± 5		± 5	

FC (bpm)														
RATOS	Antes		Atenolol		Substância P após Atenolol									
	Atenolol		Controle		10 min		20 min		30 min		45 min		60 min	
	Basal	Delta	Basal	Delta	Basal	Delta	Basal	Delta	Basal	Delta	Basal	Delta	Basal	Delta
1	390	-95	335	-45	306	-62	321	-57	340	-37	353	-12	366	-36
2	316	-74	292	-26	295	-15	296	-9	299	-13	322	-16	338	-14
3	339	-50	303	-52	291	-51	299	-31	293	-43	299	-44	323	-36
4	324	-89	297	-37	268	-34	281	-32	276	-46	299	-50	307	-62
5	366	-75	345	-38	292	-29	286	-12	300	-30	327	-54	330	-46
X \pm	347	---	314	---	290	---	297	---	302	---	320	---	333	---
epm	± 14		$\pm 11^*$		$\pm 6^{**}$		$\pm 7^{**}$		$\pm 10^*$		$\pm 10^*$		± 10	

(**/*) Diferente em relação ao valor anterior ao pré-tratamento com Atenolol ($p < 0.01$ e $p < 0.05$; ANOVA e Teste-*t* Student).

Índice do Barorreflexo ($\Delta IP/\Delta PAM$, ms/mmHg)						
RATO	Atenolol	Substância P após Atenolol				
	Controle	10 min	20 min	30 min	45 min	60 min
1	0.67	0.96	0.83	0.47	0.15	0.41
2	0.44	0.30	0.19	0.35	0.27	0.22
3	0.41	0.96	0.47	0.66	0.68	0.42
4	0.72	0.86	0.85	1.29	1.10	1.30
5	0.50	0.79	0.25	0.55	0.84	0.72
x\pmepm	0.55\pm0.1	0.77\pm0.1	0.52\pm0.1	0.66\pm0.2	0.61\pm0.2	0.61\pm0.2

Tabela 8: Avaliação da sensibilidade da bradicardia barorreflexa (Δ IP/ Δ PAM, ms/mmHg) induzida pela injeção i.v. de fenilefrina (5 μ g/0.1ml) antes e após a microinjeção bilateral de Substância P (1 pmol/100nl) na RVLM em ratos espontaneamente hipertensos não-anestesiados

PAM (mmHg)												
RATOS	Antes Substância P		Depois Substância P									
	Controle		10 min		20 min		30 min		45 min		60 min	
	Basal	Delta	Basal	Delta	Basal	Delta	Basal	Delta	Basal	Delta	Basal	Delta
1	182	+43	187	+31	189	+34	190	+26	190	+37	187	+39
2	139	+44	145	+34	149	+40	148	+40	140	+32	134	+37
3	152	+42	169	+29	---	---	170	+29	163	+29	159	+37
4	154	+38	182	+29	175	+29	183	+17	---	---	---	---
5	154	+46	172	+41	181	+36	182	+29	179	+29	170	+40
6	181	+43	181	+43	186	+38	183	+39	179	+42	182	+40
7	224	+40	223	+39	223	+38	216	+37	215	+39	220	+39
x \pm epm	169 \pm 11	---	180 \pm 9	---	184 \pm 10	---	182 \pm 8	---	178 \pm 10	---	175 \pm 12	---

FC (bpm)												
RATOS	Antes Substância P		Depois Substância P									
	Controle		10 min		20 min		30 min		45 min		60 min	
	Basal	Delta	Basal	Delta	Basal	Delta	Basal	Delta	Basal	Delta	Basal	Delta
1	369	-19	374	-39	364	-27	374	-52	397	-95	394	-30
2	346	-19	342	-12	377	-53	335	-21	341	-46	345	-34
3	317	-14	310	-15	---	---	292	-17	273	-38	257	-38
4	346	-26	328	-9	328	-5	372	-46	---	---	---	---
5	339	-34	353	-32	354	-23	358	-50	360	-44	356	-27
6	390	-33	350	-41	348	-50	360	-66	374	-62	358	-75
7	464	-31	404	-55	417	-63	407	-71	406	-79	418	-76
x \pm epm	367 \pm 18	---	352 \pm 11	---	365 \pm 12	---	357 \pm 13	---	358 \pm 20	---	355 \pm 22	---

Índice do Barorreflexo ($\Delta IP/\Delta PAM$, ms/mmHg)						
RATO	Antes Substância P	Depois Substância P				
	Controle	10 min	20 min	30 min	45 min	60 min
1	0.18	0.61	0.38	1.0	1.29	0.33
2	0.22	0.20	0.65	0.30	0.84	0.51
3	0.20	0.30	---	0.40	1.20	1.10
4	0.40	0.20	0.10	1.30	---	---
5	0.40	0.40	0.30	1.0	0.80	0.35
6	0.32	0.53	0.76	0.95	0.76	1.12
7	0.22	0.61	0.66	0.80	0.90	0.82
x\pmepm	0.3\pm0.03	0.4\pm0.1	0.5\pm0.1	0.8\pm0.1 **	1.0\pm0.1 **	0.7\pm0.1 *

(***) Diferente em relação ao Controle ($p < 0.01$ e $p < 0.05$; ANOVA).

Tabela 9: Avaliação da sensibilidade da bradicardia barorreflexa (Δ IP/ Δ PAM, ms/mmHg) induzida pela injeção i.v. de fenilefrina (5 μ g/0.1ml) antes e após a microinjeção bilateral de Salina (100nl) na RVLM em ratos espontaneamente hipertensos não-anestesiados

PAM (mmHg)												
RATOS	Antes Salina		Depois Salina									
	Controle		10 min		20 min		30 min		45 min		60 min	
	Basal	Delta	Basal	Delta	Basal	Delta	Basal	Delta	Basal	Delta	Basal	Delta
1	191	+45	206	+44	199	+38	206	+38	199	+41	194	+45
2	181	+53	209	+35	187	+47	207	+34	184	+49	200	+46
3	175	+55	173	+47	188	+36	179	+48	188	+33	169	+45
4	150	+42	147	+30	155	+33	162	+36	155	+37	154	+39
5	142	+53	150	+34	149	+40	158	+39	148	+45	153	+40
x\pmepm	168 \pm 9	---	177 \pm 13	---	176 \pm 10	---	182 \pm 10	---	175 \pm 10	---	174 \pm 10	---

FC (bpm)												
RATOS	Antes Salina		Depois Salina									
	Controle		10 min		20 min		30 min		45 min		60 min	
	Basal	Delta	Basal	Delta	Basal	Delta	Basal	Delta	Basal	Delta	Basal	Delta
1	349	-33	367	-43	351	-41	367	-22	358	-50	376	-48
2	341	-31	339	-13	324	-19	350	-17	312	-20	303	-19
3	376	-46	357	-63	307	-23	313	-34	332	-30	323	-38
4	354	-29	372	-18	371	-24	405	-33	400	-22	353	-32
5	373	-60	377	-52	338	-47	349	-47	353	-40	379	-71
x\pmepm	359 \pm 7	---	362 \pm 7	---	338 \pm 11	---	357 \pm 15	---	351 \pm 15	---	347 \pm 15	---

Índice do Barorreflexo ($\Delta IP/\Delta PAM$, ms/mmHg)						
RATO	Antes Salina	Depois Salina				
	Controle	10 min	20 min	30 min	45 min	60 min
1	0.64	0.50	0.58	0.29	0.68	0.53
2	0.32	0.20	0.25	0.26	0.26	0.28
3	0.42	0.76	0.44	0.48	0.54	0.53
4	0.38	0.27	0.33	0.36	0.24	0.36
5	0.55	0.76	0.72	0.69	0.49	0.92
x\pmepm	0.46\pm0.05	0.50\pm0.1	0.46\pm0.1	0.42\pm0.1	0.44\pm0.1	0.52\pm0.1

Tabela 10: Efeito da microinjeção bilateral de Substância P (1 pmol/100nl) na RVLM sobre as alterações da pressão arterial média (Δ PAM, mmHg) e de intervalo de pulso (Δ IP, ms) induzidas pela injeção i.v. de fenilefrina (5 μ g/0.1ml) sob bloqueio vagal em ratos SHR não-anestesiados

PAM (mmHg)														
RATOS	Antes		Metil-Atropina		Substância P após Metil-Atropina									
	Metil-Atropina		Controle		10 min		20 min		30 min		45 min		60 min	
	Basal	Delta	Basal	Delta	Basal	Delta	Basal	Delta	Basal	Delta	Basal	Delta	Basal	Delta
1	154	+48	139	+50	142	+36	160	+43	143	+43	151	+43	135	+50
2	156	+46	164	+41	160	+30	165	+30	164	+29	165	+37	158	+43
3	160	+36	183	+33	166	+37	170	+34	167	+43	169	+45	158	+56
4	180	+37	166	+45	194	+37	185	+38	183	+34	175	+35	171	+40
5	173	+40	162	+36	170	+41	170	+42	167	+36	170	+39	165	+36
6	162	+41	159	+49	174	+36	170	+35	173	+39	168	+45	161	+39
7	167	+37	161	+34	178	+38	181	+38	179	+39	177	+42	174	+43
X \pm	165	---	162	---	169	---	172	---	168	---	168	---	160	---
epm	± 3		± 5		± 6		± 3		± 5		± 3		± 5	
FC (bpm)														
RATOS	Antes		Metil-Atropina		Substância P após Metil-Atropina									
	Metil-Atropina		Controle		10 min		20 min		30 min		45 min		60 min	
	Basal	Delta	Basal	Delta	Basal	Delta	Basal	Delta	Basal	Delta	Basal	Delta	Basal	Delta
1	410	-38	454	-13	400	-13	456	-4	425	-11	431	-17	437	-21
2	381	-27	498	-12	430	-16	454	-15	443	-6	450	-17	443	-12
3	344	-16	474	-8	411	-5	416	-12	404	-15	412	-21	412	-38
4	396	-24	437	-14	479	-11	466	-9	470	-16	449	-10	418	-17
5	389	-27	421	-5	420	-5	426	-8	430	-9	428	-9	430	-9
6	335	-54	371	-10	423	-7	391	-10	373	-10	420	-31	392	-14
7	384	-49	442	-9	411	-7	434	-10	419	-14	427	-16	399	-22
X \pm	377 \pm	---	442 \pm	---	425 \pm	---	435 \pm	---	423 \pm	---	431 \pm	---	419 \pm	---
epm	10		15**		10*		10**		11*		5**		7*	

(*/**) Diferente em relação ao valor anterior ao pré-tratamento com Metil-Atropina ($p < 0.01$ e $p < 0.05$; ANOVA).

Índice do Barorreflexo ($\Delta IP/\Delta PAM$, ms/mmHg)						
RATO	Metil-Atropina	Substância P após Metil-Atropina				
	Controle	10 min	20 min	30 min	45 min	60 min
1	0.08	0.14	0.05	0.09	0.14	0.14
2	0.07	0.20	0.17	0.07	0.13	0.09
3	0.09	0.05	0.12	0.14	0.15	0.25
4	0.11	0.08	0.05	0.12	0.08	0.17
5	0.05	0.02	0.05	0.08	0.07	0.08
6	0.08	0.05	0.11	0.10	0.24	0.15
7	0.06	0.05	0.08	0.13	0.14	0.21
x\pmepm	0.07\pm0.01	0.09\pm0.03	0.09\pm0.02	0.10\pm0.01*	0.13\pm0.02*	0.15\pm0.02**

(***) Diferente em relação ao Controle ($p < 0.01$ e $p < 0.05$; ANOVA e Teste-*t* Pareado).

Tabela 11: Efeito da microinjeção bilateral de Substância P (1pmol/100nl) na RVLM sobre as alterações da pressão arterial média (Δ PAM, mmHg) e de intervalo de pulso (Δ IP, ms) induzidas pela injeção i.v. de fenilefrina (5 μ g/0.1ml) sob simpático cardíaco em ratos SHR não-anestesiados

PAM (mmHg)														
RATOS	Antes		Atenolol		Substância P após Atenolol									
	Atenolol		Controle		10 min		20 min		30 min		45 min		60 min	
	Basal	Delta	Basal	Delta	Basal	Delta	Basal	Delta	Basal	Delta	Basal	Delta	Basal	Delta
1	170	+27	169	+30	170	+29	174	+26	176	+23	172	+29	176	+29
2	171	+35	165	+34	173	+29	178	+30	174	+37	166	+44	166	+46
3	144	+43	132	+41	136	+44	137	+41	143	+38	137	+39	134	+39
4	192	+31	176	+41	190	+30	195	+31	190	+37	194	+28	196	+30
5	149	+35	158	+21	170	+18	159	+24	157	+25	153	+24	152	+31
6	189	+31	185	+30	198	+25	190	+26	199	+18	192	+24	184	+33
X \pm	169	---	164	---	173	---	172	---	173	---	169	---	168	---
epm	± 8		± 7		± 9		± 9		± 8		± 9		± 9	

FC (bpm)														
RATOS	Antes		Atenolol		Substância P após Atenolol									
	Atenolol		Controle		10 min		20 min		30 min		45 min		60 min	
	Basal	Delta	Basal	Delta	Basal	Delta	Basal	Delta	Basal	Delta	Basal	Delta	Basal	Delta
1	329	-26	310	-13	294	-14	289	-30	292	-8	274	-18	301	-19
2	372	-39	319	-15	287	-10	292	-9	299	-12	298	-15	303	-11
3	432	-38	318	-13	290	-21	288	-10	308	-8	289	-13	296	-12
4	391	-23	288	-10	280	-12	297	-12	303	-10	316	-6	314	-16
5	340	-37	329	-11	304	-12	302	-7	306	-7	303	-12	305	-10
6	338	-26	294	-8	282	-9	279	-6	280	-5	278	-16	284	-19
X \pm	367	---	310	---	289	---	291	---	298	---	293	---	300	---
epm	± 16		$\pm 6^{**}$		$\pm 3^{**}$		$\pm 3^{**}$		$\pm 4^{**}$		$\pm 6^{**}$		$\pm 4^{**}$	

(**) Diferente em relação ao valor anterior ao pré-tratamento com Atenolol (p<0.01; ANOVA).

Índice do Barorreflexo ($\Delta IP/\Delta PAM$, ms/mmHg)						
RATO	Atenolol	Substância P após Atenolol				
	Controle	10 min	20 min	30 min	45 min	60 min
1	0.30	0.34	0.92	0.26	0.52	0.48
2	0.26	0.27	0.23	0.22	0.25	0.15
3	0.19	0.36	0.19	0.13	0.23	0.20
4	0.19	0.33	0.26	0.19	0.11	0.33
5	0.33	0.44	0.17	0.20	0.33	0.19
6	0.20	0.28	0.19	0.22	0.54	0.45
$\bar{x} \pm \text{epm}$	0.24\pm0.02	0.34\pm0.02	0.33\pm0.12	0.20\pm0.02	0.33\pm0.07	0.30\pm0.06

Tabela 12: Efeito da microinjeção bilateral de Substância P (1 pmol/100nl) na RVLM sobre as alterações da pressão arterial média (Δ PAM, mmHg) e da frequência cardíaca (Δ FC, bpm) induzidas pela injeção i.v. de KCN (40 μ g/0.1ml) em ratos espontaneamente hipertensos não-anestesiados

PAM (mmHg)												
RATOS	Antes Substância P		Depois Substância P									
	Controle		10 min		20 min		30 min		45 min		60 min	
	Basal	Delta	Basal	Delta	Basal	Delta	Basal	Delta	Basal	Delta	Basal	Delta
1	187	+52	186	+50	185	+61	189	+53	187	+54	186	+50
2	148	+57	154	+39	150	+66	149	+59	140	+61	137	+67
3	153	+69	177	+38	183	+34	180	+45	179	+51	169	+61
4	186	+67	188	+54	186	+54	180	+51	181	+54	190	+46
5	218	+58	231	+53	222	+76	217	+60	219	+50	213	+62
x\pmepm	178 \pm 13	60\pm3	187 \pm 12	47\pm3	185 \pm 11	58\pm7	183 \pm 11	54\pm3	181 \pm 12	54\pm2	179 \pm 13	57\pm4

FC (bpm)												
RATOS	Antes Substância P		Depois Substância P									
	Controle		10 min		20 min		30 min		45 min		60 min	
	Basal	Delta	Basal	Delta	Basal	Delta	Basal	Delta	Basal	Delta	Basal	Delta
1	427	-297	374	-283	346	-237	385	-277	399	-259	405	-336
2	372	-180	339	-242	346	-249	339	-206	346	-254	344	-226
3	360	-185	361	-242	337	-213	356	-216	364	-243	383	-273
4	380	-191	348	-170	353	-214	356	-201	382	-252	387	-159
5	447	-192	419	-151	415	-284	402	-129	419	-288	411	-258
X	397	-209	368	-218	359	-239	368	-206	382	-259	386	-250
\pmepm	\pm 17	\pm22	\pm 14	\pm25	\pm 14	\pm13	\pm 11	\pm23	\pm 13	\pm8	\pm 12	\pm29

Tabela 13: Efeito da microinjeção bilateral de Salina (100nl) na RVLM sobre as alterações da pressão arterial média (Δ PAM, mmHg) e da frequência cardíaca (Δ FC, bpm) induzidas pela injeção i.v. de KCN (40 μ g/0.1ml) em ratos espontaneamente hipertensos não-anestesiados

PAM (mmHg)												
RATOS	Antes Salina		Depois Salina									
	Controle		10 min		20 min		30 min		45 min		60 min	
	Basal	Delta	Basal	Delta	Basal	Delta	Basal	Delta	Basal	Delta	Basal	Delta
1	160	+53	170	+54	167	+73	160	+61	175	+65	171	+50
2	159	+44	161	+48	165	+39	164	+47	159	+52	157	+45
3	147	+63	152	+47	155	+57	154	+51	158	+58	159	+58
x\pmepm	155 \pm 4	53\pm5	161 \pm 5	50\pm2	162 \pm 4	56\pm10	159 \pm 3	53\pm4	164 \pm 5	58\pm4	162 \pm 4	51\pm4

FC (bpm)												
RATOS	Antes Salina		Depois Salina									
	Controle		10 min		20 min		30 min		45 min		60 min	
	Basal	Delta	Basal	Delta	Basal	Delta	Basal	Delta	Basal	Delta	Basal	Delta
1	426	-194	397	-302	415	-292	378	-242	442	-282	406	-267
2	363	-160	354	-98	382	-149	409	-150	387	-163	378	-193
3	371	-237	379	-273	381	-278	369	-264	369	-198	412	-246
X	387	-197	377	-224	393	-240	385	-219	399	-214	399	-235
\pmepm	\pm 20	\pm22	\pm 12	\pm64	\pm 11	\pm45	\pm 12	\pm35	\pm 22	\pm35	\pm 10	\pm22

Tabela 14: Avaliação da sensibilidade da bradicardia barorreflexa (Δ IP/ Δ PAM, ms/mmHg) induzida pela injeção i.v. de fenilefrina (5 μ g/0.1ml) antes e após a microinjeção bilateral de CP 99,994 (5 μ /100nl) na RVLM em ratos espontaneamente hipertensos não-anestesiados

PAM (mmHg)												
RATOS	Antes		Depois CP 99,994									
	CP 99,994		10 min		20 min		30 min		45 min		60 min	
	Basal	Delta	Basal	Delta	Basal	Delta	Basal	Delta	Basal	Delta	Basal	Delta
1	169	+51	170	+31	178	+40	176	+41	185	+38	189	+39
2	155	+36	164	+31	173	+26	169	+27	169	+30	164	+34
3	151	+54	173	+26	179	+31	166	+31	161	+37	142	+44
4	197	+26	198	+26	192	+34	203	+23	204	+24	195	+27
5	193	+34	210	+29	212	+25	210	+27	199	+33	203	+23
x\pmepm	173 \pm 9	---	183 \pm 9	---	187 \pm 7	---	185 \pm 9	---	184 \pm 8	---	179 \pm 11	---

FC (bpm)												
RATOS	Antes		Depois CP 99,994									
	CP 99,994		10 min		20 min		30 min		45 min		60 min	
	Basal	Delta	Basal	Delta	Basal	Delta	Basal	Delta	Basal	Delta	Basal	Delta
1	305	-32	336	-13	318	-21	303	-30	318	-33	332	-42
2	343	-34	336	-20	362	-30	331	-26	350	-27	326	-23
3	339	-48	300	-30	277	-26	311	-45	327	-49	322	-37
4	361	-22	296	-24	303	-29	336	-33	347	-24	353	-43
5	349	-30	327	-45	331	-15	355	-21	338	-28	339	-23
x\pmepm	339 \pm 9	---	319 \pm 9	---	318 \pm 14	---	327 \pm 9	---	336 \pm 6	---	334 \pm 5	---

Índice do Barorreflexo ($\Delta IP/\Delta PAM$, ms/mmHg)						
RATO	Antes	Depois CP 99,994				
	CP 99,994	10 min	20 min	30 min	45 min	60 min
1	0.45	0.22	0.33	0.54	0.67	0.66
2	0.53	0.39	0.58	0.59	0.50	0.41
3	0.54	0.85	0.71	1.03	0.89	0.54
4	0.42	0.65	0.62	0.87	0.54	0.85
5	0.47	1.00	0.36	0.41	0.48	0.56
x\pmepm	0.48\pm0.02	0.62\pm0.1	0.52\pm0.1	0.68\pm0.1	0.62\pm0.1	0.60\pm0.1

Tabela 15: Efeito da microinjeção bilateral de CP 99,994 (5 μ /100nl) na RVLM sobre os parâmetros basais de pressão arterial média (PAM, mmHg) e de frequência cardíaca (FC, bpm) em ratos espontaneamente hipertensos não-anestesiados

PAM (mmHg)							
Rato	Controle	2min	4min	8min	10min	20 min	30 min
1	172	184	194	176	175	186	186
2	145	155	166	165	168	164	170
3	140	151	164	171	167	173	169
4	186	195	207	201	196	190	187
5	188	188	192		198	192	203
6	158	155	165	154	153	157	156
7	208	224	217	206	203	202	205
x\pmepm	171\pm9	179\pm10	186\pm8	179\pm8	180\pm7	181\pm6	182\pm7

FC (bpm)							
Rato	Controle	2min	4min	8min	10min	20 min	30 min
1	337	329	339	337	341	330	319
2	324	335	328	345	364	342	374
3	325	334	284	289	295	279	335
4	331	361	347	349	362	337	319
5	287	280	292		296	303	336
6	302	294	295	299	300	302	296
7	374	365	327	321	317	324	319
x\pmepm	326\pm10	328\pm12	316\pm9.5	323\pm10	325\pm11.5	317\pm9	328\pm9

Tabela 16: Efeito da microinjeção bilateral de CP 99,994 (5 μ /100nl) na RVLM sobre as alterações da pressão arterial média (Δ PAM, mmHg) e da frequência cardíaca (Δ FC, bpm) induzidas pela injeção i.v. de KCN (40 μ g/0.1ml) em ratos espontaneamente hipertensos não-anestesiados

PAM (mmHg)												
RATOS	Antes CP 99,994		Depois CP 99,994									
	Controle		10 min		20 min		30 min		45 min		60 min	
	Basal Delta		Basal Delta		Basal Delta		Basal Delta		Basal Delta		Basal Delta	
1	183	+69	182	+87	185	+56	189	+76	190	+83	193	+65
2	142	+79	167	+57	168	+63	164	+60	168	+55	164	+59
3	171	+45	167	+59	177	+45	164	+44	157	+49	147	+51
4	180	+48	193	+49	188	+50	188	+51	188	+44	140	+85
5	156	+57	156	+64	163	+63	148	+72	---	---	---	---
6	198	+50	215	+40	206	+43	207	+38	200	+48	199	+53
x\pmepm	172 \pm 8	58\pm5	180 \pm 9	59\pm6	181 \pm 6	53\pm3	177 \pm 9	57\pm6	181 \pm 8	56\pm7	169 \pm 12	63\pm6

FC (bpm)												
RATOS	Antes CP 99,994		Depois CP 99,994									
	Controle		10 min		20 min		30 min		45 min		60 min	
	Basal Delta		Basal Delta		Basal Delta		Basal Delta		Basal Delta		Basal Delta	
1	339	-208	342	-128	312	-225	322	-216	339	-213	349	-224
2	332	-59	348	-37	347	-56	337	-46	337	-64	346	-70
3	412	-299	294	-188	278	-115	301	-87	310	-92	325	-237
4	363	-81	367	-173	326	-223	309	-158	356	-225	271	-188
5	315	-218	307	-197	306	-171	292	-96	---	---	---	---
6	370	-249	327	-213	328	-219	336	-214	323	-213	328	-232
X	355	-186	331	-156	316	-168	316	-136	333	-161	324	-190
\pmepm	\pm 14	\pm39	\pm 11	\pm26	\pm 10	\pm28	\pm 7	\pm29	\pm 8	\pm34	\pm 14	\pm31

Tabela 17: Número total de células da RVLM imunorreativos a NK1 em ratos Wistar e SHR.

Número de Células da RVLM imunorreativos a NK1		
RATOS	WISTAR	SHR
1	457	315
2	301	497
3	855	481
4	751	882
5	613	585
6	568	785
7	631	830
x±epm	597±69	616±77

Tabela 18: Média do número de células da RVLM imunorreativos a NK1 em cada fatia em ratos Wistar e SHR.

Média do número de células da RVLM imunorreativas a NK1		
FATIAS	WISTAR	SHR
1	37.14	46.29
2	49.57	40.24
3	46.71	44.93
4	40.64	52.21
5	45.36	48.71
6	41.71	41.93
7	37.14	36.64
x±epm	42.6±3	44.4±3

Tabela 19: Média da porcentagem da Área da RVLM imunorreativa a NK1 da fatia em ratos Wistar e SHR.

Média da área da RVLM imunorreativa a NK1 (%)		
Fatias	WISTAR	SHR
1	7.54	9.15
2	9.22	8.88
3	8.72	9.16
4	8.56	10.31
5	8.80	9.75
6	8.24	9.30
7	8.93	9.39
x±epm	8.6±0.2	9.4±0.2 **

(**) Diferente em relação ao Grupo Wistar ($p < 0.01$; Teste- t não-pareado).

Tabela 20: Comparação do efeito facilitatório sobre a sensibilidade da bradicardia barorreflexa ($\Delta FC/\Delta PAM$, bpm/mmHg) promovida pela microinjeção bilateral de Substância P (1pmol/100nl) na RVLM em ratos Wistar e SHR não anestesiados.

Índice do Barorreflexo ($\Delta FC/\Delta PAM$, bpm/mmHg)				
RATOS	WISTAR		SHR	
	Controle	Efeito Máximo	Controle	Efeito Máximo
	Antes de SP	Após SP	Antes de SP	Após SP
1	1.30	1.90	0.40	2.60
2	1.60	2.40	0.40	1.40
3	1.10	1.50	0.30	1.30
4	1.30	2.10	0.70	---
5	1.70	1.75	0.70	1.50
6	1.50	2.10	0.80	1.50
7	1.40	2.40	0.80	2.00
8	1.20	1.40	---	---
x\pmepm	1.40\pm0.10	1.90\pm0.10**	0.60\pm0.07 ***	1.70\pm0.2**

(***) Diferente em relação ao Grupo Wistar ($p < 0.0001$; Teste- t não-pareado); (**) Diferente em relação ao controle ($p < 0.01$; Teste- t pareado).

Efeito facilitatório da Substância P na RVLM sobre a sensibilidade barorreflexa (%)		
RATOS	WISTAR	SHR
1	46.15	550.00
2	50.00	250.00
3	36.36	333.33
4	61.54	---
5	2.94	114.30
6	40.0	87.50
7	71.43	150.00
8	16.66	---
x\pmepm	41\pm8	247\pm71 **

(**) Diferente em relação ao Grupo Wistar ($p < 0.01$; Teste- t não-pareado).

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](#)