



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

Expressão da proteína c-Fos na via barorreflexa no modelo de hipertensão arterial induzida pelo L-NAME

Ricardo Motta Pereira

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

RICARDO MOTTA PEREIRA

Expressão da proteína c-Fos na via barorreflexa no modelo de hipertensão arterial induzida pelo L-NAME

Dissertação apresentada ao Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – FMRP/USP, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Fisiologia.

Orientador: Prof. Dr. Helio C. Salgado

Ribeirão Preto

2009

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

FICHA CATALOGRÁFICA

Pereira, Ricardo Motta

Expressão da proteína c-Fos na via barorreflexa no modelo de hipertensão arterial induzida pelo L-NAME.

Ribeirão Preto, 2009.

147 p.: il.; 30cm

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

Orientador: Prof. Dr. Helio Cesar Salgado.

1. Hipertensão arterial L-NAME
2. Proteína c-Fos
3. Barorreflexo
4. Óxido nítrico
5. Estimulação elétrica
6. Nervo depressor aórtico.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Ricardo Motta Pereira

Expressão da proteína c-Fos na via barorreflexa no modelo de hipertensão arterial induzida pelo L-NAME

Dissertação apresentada ao Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – FMRP/USP, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Fisiologia.

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

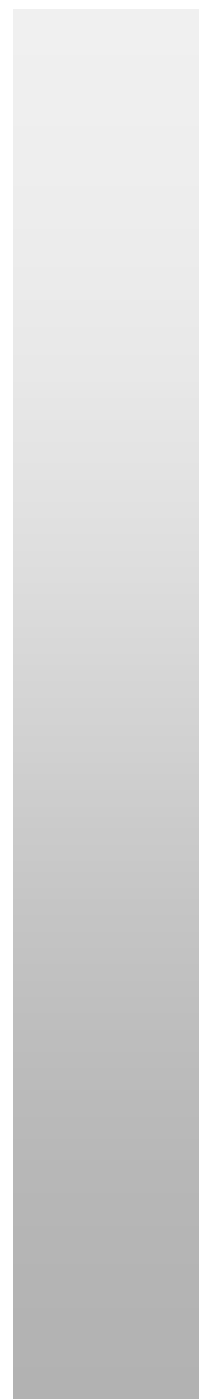
Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____



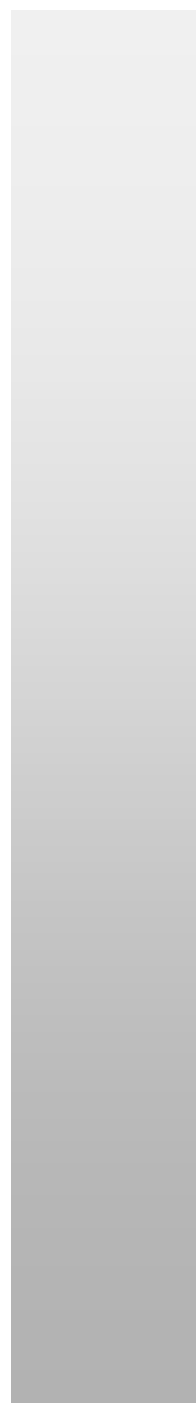
Dedicatória

Inteligência é a capacidade de escolher entre várias alternativas, de julgar, de discernir. Não basta vivenciar as verdades da vida, é preciso ciência para concatená-las, classificá-las.

Sabedoria consiste em utilizar esse conhecimento de forma prudente, moderada e útil. É preciso sensibilidade para encontrar nas coisas simples da vida, alento, inspiração, felicidade, paz...

Qualquer um pode se tornar inteligente, possuir conhecimento, mas ser sábio requer uma visão bem mais criteriosa. É preciso sabedoria para unir a simplicidade, a ciência e a sensibilidade, é preciso ser sábio para distinguir o verdadeiro do falso, avaliar e fazer a escolha conscientemente.

Dedico este trabalho a meu avô, Egydio Motta, personificação máxima das virtudes do homem do campo, responsável maior por meu orgulho em pertencer a esta família.



Agradecimientos

Aos meus pais, Celso e Maria Estela, pelo apoio incondicional em todos os momentos;

Ao meu irmão Rodrigo, pelo incentivo;

Ao meu orientador, Prof. Dr. Helio C. Salgado, pela competência e profissionalismo que muito contribuiu para meu enriquecimento profissional;

Ao Prof. Dr. José Antunes Rodrigues, por ceder seu laboratório e equipamento para a realização deste trabalho, exemplo de pesquisador e ser humano;

Às pós-graduandas Lisandra Margatho e Silvia Ruginsk, por dividirem seus conhecimentos, pelo auxílio prestado em todas as etapas deste trabalho e pela paciência!

Ao técnico Jaci A. Castania, pelo excelente trabalho na preparação cirúrgica dos animais, companheirismo e amizade;

Ao técnico Mauro de Oliveira, pelo auxílio na realização dos experimentos, companheirismo e amizade;

Aos técnicos Tadeu e Eleni, do Departamento de Farmacologia da FMRP/USP, pelo excelente trabalho na preparação imunohistológica;

Aos técnicos Beto e Leni, pela assistência no dia-a-dia e pela valiosa amizade;

À minha namorada Carolina, pelo carinho, companheirismo e pelo auxílio nas etapas finais deste trabalho;

Aos amigos de laboratório e demais colegas do Departamento de Fisiologia: Prof. Dr. Rúbens Fazan, Daniel Penteado, Renata, Valter, Fernanda Rodrigues, Fernanda Machado, João Paulo, Marina, Giu, Gabriela, Domitila, Daniel Zoccal, João Henrique, Cadu, Josiane, Érica, Márcio, Matheus, Fabiana, Mirian, Olagide, Arthur, Ernane, Ligia, André, Edu, Dawit, Rafael, Tatiane, Marcelo, Maria Ida, Leandro, Nadia, Lilian, Augusto, Andréia, Guilherme, Jalile, Renato, Lys, Evelyn, Rubinho, Clóvis e Maria Luiza, pelo convívio e amizade;

Aos funcionários da Secretaria do Departamento de Fisiologia, Elisa, Cláudia, Fernando e Carlos, pela eficiente assistência e agradável convivência;

Aos bioteristas Eduardo e Leonardo, pelo cuidado com os animais de experimentação;

As agências de fomento: CNPq, FAPESP, CAPES/PROEX e FAEPA, que proporcionaram o desenvolvimento deste trabalho.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADH.....	vasopressina
ANP.....	peptídeo natriurético atrial
AP.....	área postrema
CC.....	canal central
CIL.....	coluna intermedio lateral
CVLM.....	bulbo ventrolateral caudal
DAB.....	tetracloro de 3,3'-di-amino-benzidina
D-NAME.....	N ^ω -nitro-D-arginine methyl ester
EE.....	estimulação elétrica
eNOS.....	NOS endotelial
FC.....	frequência cardíaca
GABA.....	ácido gama-aminobutírico
iNOS.....	NOS induzível
L-NAME.....	N ^ω -nitro-L-arginine methyl ester
L-NMMA.....	N ^ω -monomethyl-L-arginine
L-NNA.....	N ^ω -nitro-L-arginine
NA.....	núcleo ambíguo
NDA.....	nervo depressor aórtico
NMDA.....	N-metil-D-aspartato
nNOS.....	NOS neural
NO.....	óxido nítrico
NOS.....	óxido nítrico sintase
NTS.....	núcleo do trato solitário
NTSc.....	NTS comissural caudal

NTSi.....NTS intermediário

NTSr.....NTS rostral

OT.....ocitocina

OVLT.....órgão vascular da lâmina terminal

PAG.....substância cinzenta periaquedutal

PaLM.....PVN magnocelular lateral

PaMa.....PVN magnocelular anterior

PaMM.....PVN magnocelular medial

PaMP.....PVN parvocelular medial

PaPO.....PVN parvocelular posterior

PE.....polietileno

PVN.....núcleo paraventricular do hipotálamo

RVLM.....bulbo ventrolateral rostral

SHR.....rato espontaneamente hipertenso

SNC.....sistema nervoso central

SON.....núcleo supra-óptico

VLM.....bulbo ventrolateral

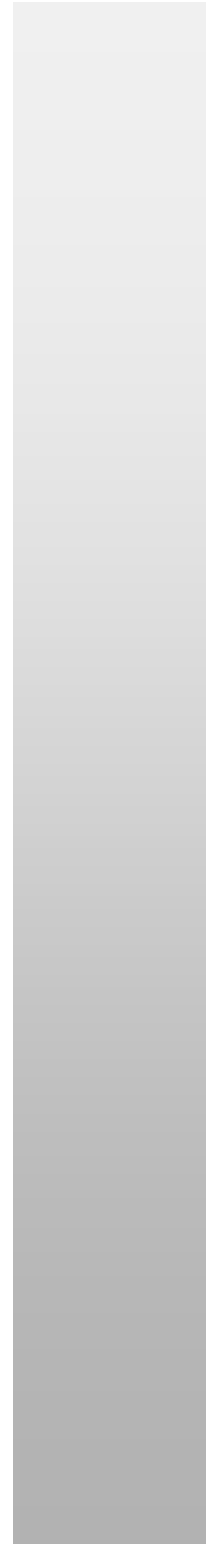
LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Principais vias do arco barorreflexo.....	12
Figura 2.	Protocolo Experimental 1.....	33
Figura 3.	Protocolo Experimental 2.....	34
Figura 4.	Variação da pressão arterial (Δ PAM) durante o protocolo de estimulação elétrica do NDA.....	46
Figura 5.	Variação da frequência cardíaca (Δ FC) durante o protocolo de estimulação elétrica do NDA.....	47
Figura 6.	Coloração de Nissl de cortes representativos do NTS.....	48
Figura 7.	Expressão da proteína c-Fos nos neurônios do NTSr.....	49
Figura 8.	Expressão da proteína c-Fos nos neurônios do NTSi.....	50
Figura 9.	Expressão da proteína c-Fos nos neurônios do NTSc.....	51
Figura 10.	Densidade da proteína c-Fos nos neurônios do NTS dos animais sem estimulação do NDA.....	52
Figura 11.	Densidade da proteína c-Fos nos neurônios do NTS dos animais com estimulação do NDA.....	53
Figura 12.	Agrupamento dos dados de expressão da proteína c-Fos nos neurônios do NTS de animais submetidos, ou não, à estimulação elétrica do NDA.....	55
Figura 13.	Coloração de Nissl de cortes representativos do VLM.....	58
Figura 14.	Expressão da proteína c-Fos nos neurônios do CVLM.....	59
Figura 15.	Densidade da proteína c-Fos nos neurônios do CVLM.....	60

Figura 16.	Expressão da proteína c-Fos nos neurônios do RVLM.....	62
Figura 17.	Densidade da proteína c-Fos nos neurônios do RVLM.....	63
Figura 18.	Agrupamento dos dados de expressão da proteína c-Fos nos neurônios do VLM de animais submetidos, ou não, à estimulação elétrica do NDA.....	65
Figura 19.	Coloração de Nissl de cortes representativos do PVN parvocelular.....	68
Figura 20.	Expressão da proteína c-Fos nos neurônios do PaMP.....	69
Figura 21.	Expressão da proteína c-Fos nos neurônios do PaPO.....	70
Figura 22.	Densidade da proteína c-Fos nos neurônios do PaMP.....	71
Figura 23.	Densidade da proteína c-Fos nos neurônios do PaPO.....	72
Figura 24.	Agrupamento dos dados de expressão da proteína c-Fos nos neurônios do PVN parvocelular de animais submetidos, ou não, à estimulação elétrica do NDA.....	74
Figura 25.	Coloração de Nissl de cortes representativos do PVN magnocelular.....	77
Figura 26.	Expressão da proteína c-Fos nos neurônios do PaMA.....	78
Figura 27.	Expressão da proteína c-Fos nos neurônios do PaMM.....	79
Figura 28.	Expressão da proteína c-Fos nos neurônios do PaLM.....	80
Figura 29.	Densidade da proteína c-Fos nos neurônios do PVN magnocelular dos animais sem estimulação do NDA.....	81
Figura 30.	Densidade da proteína c-Fos nos neurônios do PVN magnocelular dos animais com estimulação do NDA.....	82
Figura 31.	Agrupamento dos dados de expressão da proteína c-Fos nos neurônios do PVN parvocelular de animais submetidos, ou não, à estimulação elétrica do NDA.....	84

LISTA DE TABELAS

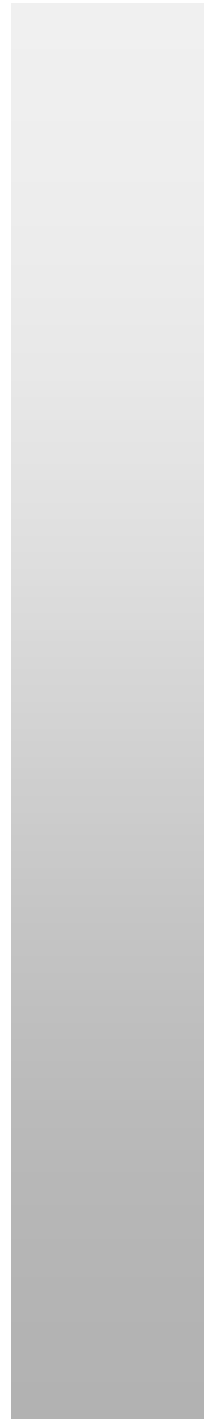
Tabela 1.	Valores hemodinâmicos basais.....	45
Tabela 2.	Densidade de c-Fos nos neurônios do NTS.....	54
Tabela 3.	Valores agrupados da densidade de c-Fos nos neurônios do NTS.....	56
Tabela 4.	Densidade de c-Fos nos neurônios do CVLM.....	61
Tabela 5.	Densidade de c-Fos nos neurônios do RVLM.....	64
Tabela 6.	Valores agrupados da densidade de c-Fos nos neurônios do VLM.....	66
Tabela 7.	Densidade de c-Fos nos neurônios do PVN parvocelular.....	73
Tabela 8.	Valores agrupados da densidade de c-Fos nos neurônios do PVN parvocelular.....	75
Tabela 9.	Densidade de c-Fos nos neurônios do PVN magnocelular.....	83
Tabela 10.	Valores agrupados da densidade de c-Fos nos neurônios do PVN magnocelular.....	85



Sumário

SUMÁRIO

RESUMO.....	01
ABSTRACT.....	04
INTRODUÇÃO.....	07
OBJETIVO.....	25
MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
Animais Experimentais.....	28
Desenvolvimento da hipertensão arterial pelo L-NAME.....	28
Determinação da pressão arterial pela artéria caudal do rato.....	28
Procedimentos Cirúrgicos.....	29
Protocolos e grupos experimentais.....	30
Procedimentos Histoquímicos.....	35
Análise Microscópica.....	37
Análise dos dados hemodinâmicos.....	39
Análise Estatística.....	40
RESULTADOS.....	41
Parâmetros Hemodinâmicos.....	42
Expressão de c-Fos nos neurônios do núcleo do trato solitário (NTS).....	42
Expressão de c-Fos nos neurônios do bulbo ventrolateral (VLM).....	57
Expressão de c-Fos nos neurônios do núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN).....	67
DISCUSSÃO.....	86
CONCLUSÕES.....	100
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	102
APÊNDICE.....	117

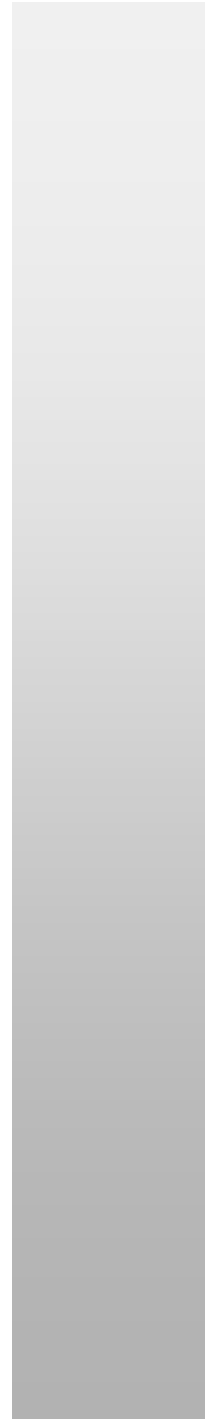


Resumo

PEREIRA, RM; SALGADO, HC. EXPRESSÃO DA PROTEÍNA c-FOS NA VIA BARORREFLEXA NO MODELO DE HIPERTENSÃO ARTERIAL INDUZIDA PELO L-NAME.

A função barorreflexa na hipertensão arterial induzida pelo L-NAME ainda é assunto controvertido, possivelmente devido aos efeitos de anestésicos e/ou drogas vasoativas, usualmente empregadas para o estudo do barorreflexo. O nosso laboratório desenvolveu a técnica da estimulação elétrica do nervo depressor aórtico (NDA), em ratos acordados, para estudar, o controle barorreflexo cardiocirculatório. OBJETIVO: Estudar a atividade neuronal na via barorreflexa e no PVN, por meio da expressão da proteína c-Fos, em ratos hipertensos L-NAME, acordados, submetidos à estimulação elétrica do NDA, a fim de se detectar possíveis alterações do barorreflexo nesse modelo de hipertensão arterial. MÉTODOS E RESULTADOS: Os animais foram tratados durante 14 dias com L-NAME (70 mg/kg, n=13) ou D-NAME (70 mg/kg, n=10) dissolvidos na água de beber, ou, somente, com água de beber (controles, n=13). Os ratos hipertensos L-NAME apresentaram pressão arterial média (163 ± 4 mmHg) e frequência cardíaca (404 ± 8 bpm) basais maiores que os normotensos D-NAME (108 ± 1 mmHg e 366 ± 8 bpm) e controles (100 ± 2 mmHg e 355 ± 7 bpm). Na véspera do experimento os animais foram anestesiados com tiopental para cateterização da artéria e veia femorais, e implantação dos eletrodos para estimulação elétrica (1mA, 2ms e 60Hz) do NDA, intermitente com ciclos de 5s de estimulação seguidos de 10s sem estimulação, durante 20 minutos. Duas horas após esse procedimento foi realizada a imunohistoquímica para c-Fos. As respostas hipotensora e bradicárdica devido à estimulação do NDA não diferiram entre os grupos, entretanto, a densidade de c-Fos nos animais estimulados foi

maior nos ratos hipertensos L-NAME no núcleo do trato solitário (NTS) intermediário (108 ± 6 vs. 47 ± 5 vs. 43 ± 5 N°Fos/mm²) e no NTS comissural caudal (107 ± 10 vs. 43 ± 1 vs. 44 ± 8 N°Fos/mm²), em relação aos normotensos D-NAME e controles estimulados. O protocolo de estimulação do NDA foi eficaz em aumentar, de forma semelhante, a expressão da proteína c-Fos na região caudal ventrolateral do bulbo (CVLM) dos animais estimulados. A estimulação do NDA levou ao aumento na densidade da proteína c-Fos nas porções magnocelulares anterior (PaMA) e medial (PaMM) do PVN. Nos neurônios parvocelulares do PVN a estimulação do NDA aumentou a expressão de c-Fos, somente, na região posterior (PaPO) dos ratos hipertensos L-NAME. CONCLUSÕES: 14 dias de tratamento com L-NAME induziu hipertensão arterial e taquicardia; a estimulação elétrica do NDA foi eficaz em ativar o barorreflexo; a maior densidade de c-Fos no NTS dos ratos hipertensos L-NAME estimulados sugere uma maior desinibição dos neurônios barorreceptores neste modelo de hipertensão arterial; a estimulação do NDA ativou neurônios do PVN magnocelular, responsáveis pela síntese de ocitocina e vasopressina; nos neurônios parvocelulares do PVN, a ativação do barorreflexo pela estimulação do NDA aumentou a expressão da proteína c-Fos somente nos ratos hipertensos L-NAME, o que sugere uma maior participação do PVN na modulação autonômica simpática nesse modelo de hipertensão arterial.



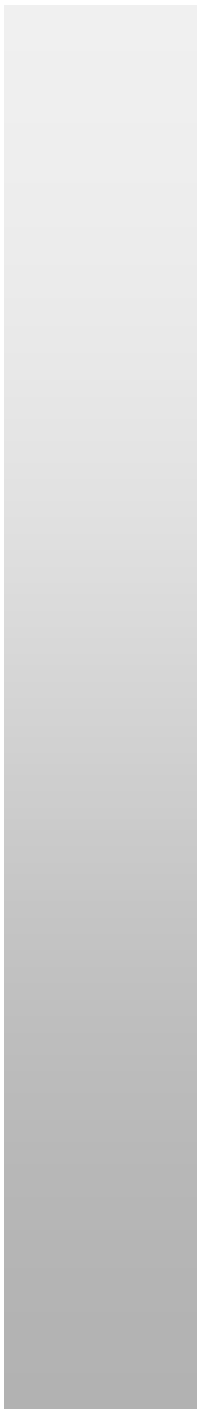
Abstract

PEREIRA, RM; SALGADO, HC. EXPRESSION OF c-FOS PROTEIN IN NEURONS OF BAROREFLEX PATHWAY IN CONSCIOUS L-NAME HYPERTENSIVE RATS.

Baroreflex function in hypertension induced by L-NAME is still a controversial issue, probably due to the effects of anesthetics and/or vasoactive drugs used to exam its mechanism. Our laboratory developed the technique of electrical stimulation of the aortic depressor nerve (ADN) in conscious rats to exam baroreflex function. OBJECTIVE: To evaluate the neuronal activity in the baroreflex pathway and paraventricular nucleus of the hypothalamus (PVN), through the expression of c-Fos protein in L-NAME hypertensive rats submitted to electrical stimulation of the ADN, in conscious state, in order to detect possible alterations of the baroreflex control in this model of hypertension. METHODS AND RESULTS: Rats were treated (p.o) during 14 days with L-NAME (70 mg/kg, n=13), D-NAME (70 mg/kg, n=10), or tap water (control, n=13). L-NAME hypertensive rats presented mean arterial pressure (163 ± 4 mmHg) and heart rate (404 ± 8 bpm) higher than normotensive D-NAME (108 ± 1 mmHg and 366 ± 8 bpm) and control rats (100 ± 2 mmHg and 355 ± 7 bpm). On the day before the experiment the animals were anesthetized with thiopental (50 mg/kg) for catheterization of the femoral artery and vein and implantation of electrodes around the ADN for intermittent (5s on / 10s off) electrical stimulation (1mA, 2ms, 60Hz) during 20min. Two hours after ADN stimulation the immunohistochemistry for c-Fos was carried out. The hypotensive response and bradycardia due to electrical stimulation of the ADN did not differ among groups. The density of c-Fos caused by ADN stimulationin was higher in L-NAME hypertensive rats in the intermediate nucleus of tractus solitary (NTS, 108 ± 6 vs. 47 ± 5 vs. 43 ± 5 N° Fos/mm²) and commissural

caudal NTS (107 ± 10 vs. 43 ± 1 vs. 44 ± 8 N° Fos/mm²) compared to normotensive control and D-NAME stimulated rats. Stimulation of the ADN increased, similarly, the expression of c-Fos protein in the caudal ventrolateral medulla (CVLM) in all groups. In the PVN, the stimulation of the ADN evoked an increase in density of the protein c-Fos in the anterior magnocellular (PaMA) and medial (PaMM) portions. Stimulation of the ADN increased expression of c-Fos only in the posterior parvocellular region (PaPO) of L-NAME hypertensive rats.

CONCLUSIONS: treatment with L-NAME during 14 days induced hypertension and tachycardia; the protocol of electrical stimulation of the ADN was effective to activate the baroreflex in all groups studied; the highest density of c-Fos in the NTS of L-NAME hypertensive rats suggests greater disinhibition of baroreceptors neurons in this model of hypertension; the stimulation of ADN activated neurons in magnocellular PVN, which is responsible for the synthesis of oxytocin and vasopressin; concerning the parvocellular neurons of the PVN, the activation of the baroreflex increased the expression of c-Fos protein only in L-NAME hypertensive rats, suggesting a greater involvement of the PVN in the sympathetic autonomic modulation in this model of hypertension.



Introdução

O modelo de hipertensão arterial induzida pelo L-NAME

O óxido nítrico (NO), caracterizado inicialmente como um fator relaxante derivado do endotélio (Furchgott e Zawadzki, 1980), possui um importante papel na modulação neuro-humoral das alterações cardiovasculares produzidas durante um processo mantido de hipertensão ou hipotensão arterial (Vallance e cols. 1989; Belder e cols., 1993). Várias células são capazes de sintetizar o NO por meio de hemeoproteínas chamadas de NO-sintases (NOS). Até o momento, foram isoladas três isoenzimas, sendo duas constitutivas e uma induzível, as quais são semelhantes estruturalmente, porém reguladas de diferentes modos (Bredt e cols., 1990; Wang e Mardsen, 1995). A Isoforma I, inicialmente purificada no cerebelo do camundongo e do porco (Schmidt e cols., 1991), também chamada de nNOS (*neuronal NO synthase*). A Isoforma II, que não é expressa constitutivamente, podendo ser induzida nos macrófagos e outras células por lipopolisacárides bacterianos e/ou citocinas (Stuehr e cols., 1991), e também chamada de iNOS (*inductible NO synthase*). Por fim, a Isoforma III, expressa constitutivamente nas células endoteliais, também chamada eNOS (*endothelial NO synthase*).

A biossíntese do NO requer a oxidação do nitrogênio guanidino terminal da L-arginina na presença de uma das isoformas da NOS gerando como produtos finais desta reação o NO e L-citrulina (Palmer e cols., 1989; Scrogin e cols. 1998; Wang e cols., 2005). Sendo assim, a inibição aguda ou crônica da síntese de óxido nítrico por análogos da L-arginina, como N^G-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) ou o N^G-monomethyl-L-arginina (L-NMMA), deriva da competição dessas substâncias pela NOS em suas diferentes isoformas, restringindo a síntese de NO e elevando a pressão arterial (Moncada, 1991, 1994; Ribeiro e cols., 1992). Dessa

forma, a hipertensão arterial induzida pelo L-NAME é causada, principalmente, pela inibição do efeito vasodilatador mediado pelo NO. Contudo a inibição da nNOS, responsável pela síntese de NO no sistema nervoso central (SNC), pode contribuir para esse efeito hipertensivo (Matsumura e cols., 1998; Scrogin e cols., 1998; Souza e cols., 2001).

O barorreflexo e o modelo de hipertensão arterial induzido pelo L-NAME

Os barorreceptores são terminações nervosas localizadas entre a camada adventícia e média dos grandes vasos, eles estão localizados principalmente no arco da aorta e nos seios carotídeos (Figura 1). O principal mecanismo de ativação dos barorreceptores é a sua deformação mecânica, decorrente da distensão da parede do vaso onde se encontram. Como são sensíveis às distensões da parede vascular, eles apresentam uma maior atividade durante o aumento da pressão arterial (PA), desencadeando ajustes reflexos que controlam ou se opõem ao aumento pressórico (Krieger e cols., 1982; Chapleau e cols., 1989). O grau da distensão vascular varia em função da pressão transmural exercida sobre a parede do vaso e da distensibilidade desta última (Chapleau e cols., 1991), sendo que o estiramento dos barorreceptores leva à abertura de canais iônicos responsáveis pela despolarização de sua membrana, gerando um potencial de ação (Chapleau e cols., 1995). Além disso, a atividade dos barorreceptores também pode ser modulada por substâncias neuro-humorais e fatores parácrinos liberados por células endoteliais (Chapleau e cols., 1992).

As aferências barorreceptoras originadas nos seios carotídeos trafegam pelo nervo carotídeo (nervo de Hering), o qual corresponde a um ramo do nervo glossofaríngeo (IX par craniano), enquanto que as aferências barorreceptoras

aórticas trafegam pelo nervo de Cyon, ou depressor aórtico (NDA), o qual corresponde a um ramo do nervo vago (X par craniano). Essas terminações nervosas alcançam o núcleo do trato solitário (NTS), situado bilateralmente no tronco cerebral, onde fazem sua primeira sinapse (Chalmers, 1975; Kirchheim, 1976). O NTS é formado por um conjunto de neurônios na porção dorso-medial do bulbo, os quais se projetam rostro-caudalmente como uma coluna bilateral a partir do núcleo motor facial até o óbex (Ciriello, 1983). Daí suas duas colunas formam uma estrutura única na linha média, que continua caudalmente até a decussação das pirâmides bulbares (Ciriello, 1983). O NTS atua como centro integrador das informações provenientes dos sistemas respiratório, gastrointestinal e cardiovascular, sendo que neste último inclui-se a modulação do barorreflexo, quimiorreflexo e do reflexo cardiopulmonar.

Sabe-se, em relação ao barorreflexo, que a região rostral ventrolateral do bulbo (RVLM) atua como área pressora por meio da ação de aminoácidos excitatórios glutamatérgicos cujas fibras simpáticas bulboespinhais descem através da coluna intermediolateral (Kirchheim, 1976; Krieger e cols., 1982). Sun e cols. (1988) mostraram, por meio de experimentos eletrofisiológicos, que neurônios do RVLM apresentam a capacidade de se despolarizar, espontaneamente, possuindo uma atividade de marca-passo (geração de tônus simpático); sendo assim, a ativação desta área bulbar leva ao aumento da PA. Por outro lado, está bem estabelecido que a região caudal ventrolateral do bulbo (CVLM) corresponde a uma área depressora, a qual atua, diretamente, sobre a região RVLM por meio de neurônios inibitórios GABAérgicos, levando à resposta hipotensora do barorreflexo (Chalmers, 1975; Salgado e cols., 1995). Elevações súbitas da PA provocam, reflexamente por meio das aferências barorreceptoras,

nítida bradicardia decorrente de uma inibição da atividade simpática e ativação vagal para o coração (Krieger e cols., 1982; Stornetta e cols., 1987). Por outro lado, quedas súbitas da PA levam à ativação simpática e inibição vagal resultando em taquicardia reflexa (Krieger e cols., 1982; Salgado e cols., 1995). Na instalação gradual de uma hipertensão arterial crônica observa-se, inicialmente, uma bradicardia reflexa que tende a desaparecer até retornar aos níveis basais; a este fenômeno dá-se o nome de adaptação do barorreflexo (Soato e Krieger, 1974; Krieger e cols., 1982; Salgado e cols., 1995). Durante o processo de adaptação do barorreflexo pode-se constatar a diminuição do ganho (inclinação) da curva de pressão-atividade neural (Brown, 1980; Krieger e cols., 1982; Chapleau e cols., 1988; Fazan e cols., 1997), contribuindo com alterações no controle circulatório reflexo durante a hipertensão crônica. A adaptação do barorreflexo pode ser decorrente de alterações periféricas (intrínsecas das terminações barorreceptoras) ou alterações centrais que podem resultar da interação com outros reflexos neurais, sistemas humorais ou alterações no acoplamento entre as aferências barorreceptoras e centros responsáveis pela modulação da atividade autonômica (Abboud e Thames, 1983; Chapleau e cols., 1989; Jimbo e cols., 1994). Além do NTS, a atividade simpática também é modulada pelo núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN), o qual está reciprocamente interligado as áreas envolvidas no controle do sistema cardiovascular (Swanson e Sawchenko, 1980; Luiten e cols., 1985).

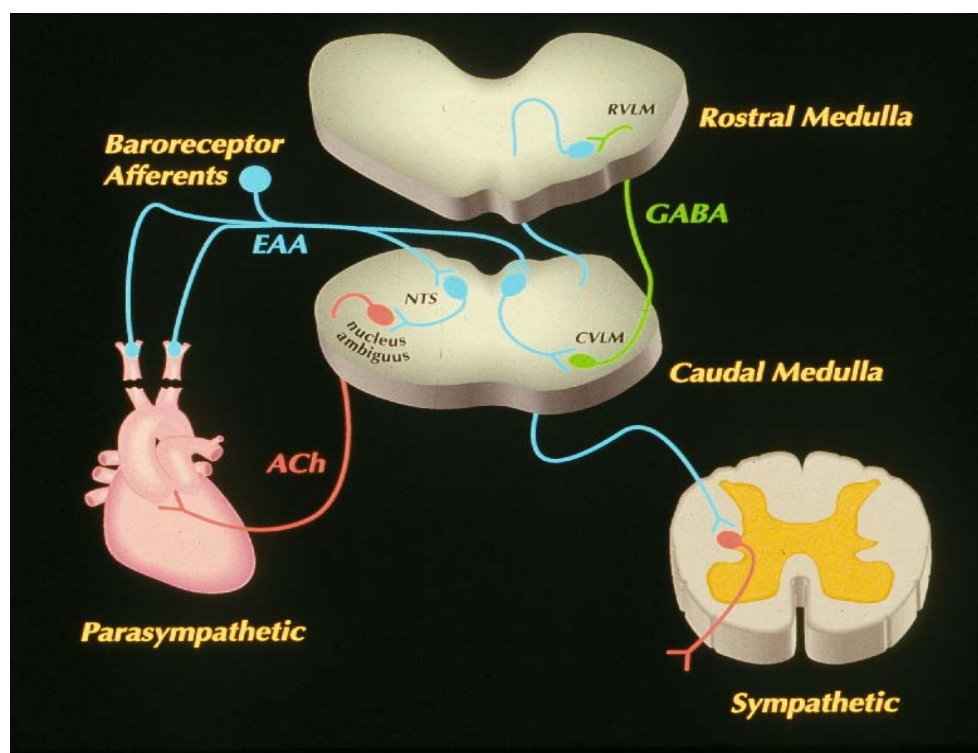


Figura 1. Principais vias do arco barorreflexo. EAA, aminoácido excitatório; GABA, ácido gama-aminobutírico; Ach, acetilcolina; NTS, núcleo do trato solitário; CVLM e RVLM: regiões caudal e rostral do bulbo ventrolateral; NA, núcleo ambíguo. Os barorreceptores aórticos não estão representados (adaptado de Sved e Gordon, 1994).

A ação do NO na regulação cardiovascular não está restrita, apenas, ao efeito direto desse gás em promover o relaxamento da musculatura lisa vascular, mas, também, por uma ação no SNC (Matsumura e cols., 1998; Resstel e Corrêa, 2006). Evidências apontam para uma ação na modulação autonômica onde o NO atuaria como um neurotransmissor não convencional (Zanzinger, 1999; Prast e Philippu, 2001). Estudos realizados em animais anestesiados, e acordados, têm indicado uma participação do NO na modulação barorreflexa, entretanto, os resultados obtidos ainda são controversos.

Trabalhos de Minami e cols. (1995) e Lin e cols. (2006) mostraram aumento do ganho (ou sensibilidade) barorreflexo, enquanto que os trabalhos de Jimbo e cols. (1994), Scrogin e cols. (1998), Fujisawa e cols. (1999) e Sener e Smith (2001), não observaram nenhuma variação no ganho barorreflexo após o tratamento com L-NAME. Por outro lado, Daubert e Brooks (2006) bloquearam a NOS com N^ω-nitro-L-arginina (L-NNA, 20mg/kg iv), em coelhos acordados submetidos ao estresse agudo provocado pela mudança ambiental não condicionada. Os resultados obtidos mostraram queda no ganho do barorreflexo. Recentemente, Mayorov (2007) estudou as variações autonômicas provocadas pelo NO na modulação da PA, FC e atividade do nervo simpático renal em coelhos submetidos ao *air-jet stress* após o bloqueio da NOS no RVLM com o L-NAME. Os resultados apresentaram uma queda em todos os parâmetros analisados (PA, FC e atividade do nervo simpático renal), sugerindo a capacidade do NO em favorecer a atividade simpática neste sítio central de modulação autonômica. Esses resultados contrários, usualmente observados na literatura, se devem provavelmente à utilização de diferentes espécies animais, anestesiados ou não, e às diferentes metodologias empregadas nesses estudos.

O NO pode influenciar na resposta barorreflexa tanto em sua aferência (Matsuda e cols., 1995; Meyrelles e cols., 2003; Salgado e cols., 2006), em seu centro integrador (Waki e cols., 2003; Mayorov, 2005) ou na eferência do arco reflexo (Matsumura e cols., 1998, Heaton e cols. 2005; Augustiniak e cols., 2006). Pode, até mesmo, influenciar as respostas de cronotropismo e inotropismo, por meio da ativação dos receptores cardíacos β -adrenérgicos (Choate e Paterson, 1999; Sears e cols., 2004). Quanto à aferência, Lin e cols. (2006) demonstraram que a nNOS pode se encontrar tanto em neurônios glutamatérgicos, bem como nas fibras dos barorreceptores aórticos, dando suporte à hipótese que ambos neurotransmissores interagem na transmissão de sinais aferentes ao SNC. Além disso, evidências mostram que o NO derivado da eNOS e da nNOS pode estar envolvido na modulação da adaptação e sensibilidade barorreceptora, entretanto, ainda há dúvidas sobre o seu papel nessa modulação (Meyrelles e cols., 2003; Salgado e cols., 2006). Observações recentes sobre a ação do NO e a função barorreceptora demonstraram que o NO, ou mesmo doadores de NO, têm influência inibitória na atividade barorreceptora, contribuindo para a rápida adaptação do barorreceptor durante a hipertensão aguda em coelhos anestesiados (Matsuda e cols., 1995; Meyrelles e cols., 2003). Salgado e cols. (2006) demonstraram que o bloqueio da NOS com L-NAME, ou TRIM, um inibidor específico para nNOS, foi eficaz em atenuar a rápida adaptação dos barorreceptores aórticos frente a um aumento da PA em ratos anestesiados. Quanto à sensibilidade do reflexo barorreceptor, somente o L-NAME foi capaz de alterá-la, sugerindo que o NO, proveniente de uma origem distinta da nNOS, diminui este parâmetro.

Existem ainda estudos que apontam outras contribuições do óxido nítrico no controle central do sistema cardiocirculatório, cujas evidências sugerem que NO neural, presente no NTS e RVLM, estaria envolvido na regulação reflexa da PA, facilitando a ativação barorreflexa (Dias e cols., 2005; Talman e Dragon, 2004; Mayorov, 2005; Carvalho e cols., 2006). Waki e cols. (2003) demonstraram que a eNOS presente no NTS age atenuando o componente simpático do reflexo barorreceptor. Outros estudos, utilizando a inibição intracerebroventricular da nNOS em regiões específicas como o NTS (Tseng e cols., 1996; Matsumura e cols., 1998), PVN (Zhang e cols., 1997) e RVLM (Tseng e cols., 1996) mostraram um aumento da atividade renal simpática, todavia esse efeito foi abolido com a injeção de NO nessas regiões. Em outro estudo, Carvalho e cols. (2006), utilizando camundongos *knockout* para nNOS, também observaram um aumento da atividade simpática. Augustyniak e cols. (2006) ao inibir a NOS, com L-NAME (i.v), de ratos acordados, submetidos à cirurgia de deservação sinoaórtica, tiveram um aumento da atividade simpática renal, quando comparados com ratos intactos. O que demonstra a capacidade do NO em modular a atividade simpática gerada centralmente (Sander e cols., 1995; Sakai e cols., 2000). Li e cols. (2001) sugeriram que a ligação do neurotransmissor glutamato aos receptores do tipo N-metil-D-aspartato (NMDA) seria responsável pela formação de óxido nítrico no PVN levando ao aumento da atividade simpática renal, PA e FC. Dados de Zhang e cols. (1997) e Horn (1994) se opõem a esse fato, pois, em seus estudos, a administração de um doador de NO ao PVN induziu uma queda da atividade simpática renal, PA e FC. Outros estudos têm sugerido uma atuação do óxido nítrico no controle autonômico parassimpático (Ruggeri e cols., 2000). Heaton e cols. (2005) demonstraram que a transferência de genes de nNOS no nervo vago

cardíaco aumentou a sensibilidade barorreflexa e a resposta da FC frente à estimulação vagal.

Vários estudos têm demonstrado o desenvolvimento de uma elevada hipertensão arterial com a administração central de L-NAME (Matsumura e cols., 1998; Resstel e Corrêa, 2006). Matsumura e cols. (1998), ao administrar L-NAME intracerebroventricular, em coelhos anestesiados, observaram aumento da PA, bradicardia, elevação da atividade do nervo simpático renal, e aumento da sensibilidade do barorreflexo no controle da FC, associado ao incremento dos níveis de catecolaminas plasmáticas. Resstel e Corrêa (2006) obtiveram uma redução na bradicardia reflexa em resposta ao aumento da PA provocada pela fenilefrina, utilizando microinjeções bilaterais de L-NAME na porção ventral do córtex pré-frontal de ratos acordados e concluíram que a nNOS estaria envolvida na modulação do componente parassimpático do barorreflexo. Vasquez e cols. (1994) examinaram o reflexo barorreceptor em ratos acordados tratados com L-NAME durante 6 dias, e observaram que a inibição crônica da NOS produziu apreciável taquicardia devido ao aumento na atividade simpática cardíaca, e supressão do tônus vagal, associados ao aumento do ganho na função barorreflexa. Por outro lado, Scrogin e cols. (1998) observaram uma atenuação da curva barorreflexa com que doses moderadas de L-NAME (10 mg/100ml), administradas durante 7 dias.

Em nosso laboratório, Souza e cols. (2001), observaram um aumento significativo na PA associado à taquicardia, aumento no tônus simpático cardíaco, aumento da variabilidade da FC e uma atenuação do controle do barorreflexo ao avaliar as alterações no controle autonômico da FC em ratos acordados com hipertensão arterial induzida pelo L-NAME. É provável que o aumento da FC

basal seja devido a uma inibição mais intensa da produção de NO, pois no estudo de Souza e cols. (2001) a dosagem utilizada foi aproximadamente seis vezes maior do que a utilizada por Scrogin e cols. (1998), apesar de ambos utilizarem curtos períodos (7 dias) de tratamento com L-NAME dissolvido na água de beber.

Como visto nos estudos citados acima, o controle barorreflexo no modelo de hipertensão L-NAME apresenta, ainda, mecanismos poucos esclarecidos. Quanto à sensibilidade ou ganho do barorreflexo, no modelo de hipertensão arterial induzida pelo L-NAME, os estudos se mostram contraditórios, ora sugerindo um aumento (Vasquez e cols., 1994; Matsumura e cols., 1998), ora uma diminuição (Scrogin e cols., 1998; Souza e cols., 2001) ou, até mesmo, uma inalteração desse parâmetro (Fujisawa e cols., 1999). No presente estudo, a expressão da proteína c-Fos, será utilizada como método de detecção de possíveis alterações do barorreflexo no modelo de hipertensão arterial L-NAME. Além disso, na maioria desses estudos, os animais estavam anestesiados e as respostas barorreflexas foram avaliadas com o uso de drogas vasoativas o que pode ter levado a resultados conflitantes devido aos efeitos diretos dessas substâncias sobre o coração, vasos e/ou na ativação de áreas neuronais envolvidas nesta resposta reflexa.

Estimulação elétrica dos barorreceptores aórticos no rato acordado

Krieger e Marseillan (1963) mapearam o curso das fibras do nervo depressor aórtico (NDA), na região cervical de ratos Wistar normotensos anestesiados, por meio de técnicas de eletroneurografia e estimulação elétrica. Estes autores (Krieger e Marseillan, 1963) verificaram que os seguintes parâmetros, voltagem fixa de 2 volts, frequência entre 80-150 Hz e duração de 1.2

ms, induziu respostas hipotensoras significativas. No rato, o NDA tem sido mais estudado devido ao fato do nervo do seio carotídeo ser anatomicamente mais curto e de difícil manipulação. Em um único trabalho, realizado por Sapru e Krieger (1977) foi mostrado o registro da atividade elétrica do nervo carotídeo, *in situ*, onde se demonstrou a presença de atividade quimiorreceptora neste nervo, e ausência no NDA. Posteriormente, Fan e Andresen (1998), verificaram, por meio da estimulação elétrica do NDA de ratos normotensos anestesiados, que as repostas barorreflexas à estimulação elétrica com baixas frequências são inteiramente dependentes de fibras não mielinizadas, e que mesmo frequências muito baixas, provocavam respostas hipotensoras acentuadas. Por outro lado, as fibras mielinizadas requerem frequências muito mais elevadas para produzirem respostas similares às não mielinizadas. Em síntese, os autores concluíram que os diferentes tipos de fibras evocam respostas reflexas diferenciadas, sugerindo uma diferenciação nos mecanismos de processamento da informação sensorial.

A estimulação elétrica de aferências neurais, com os mais variados objetivos, é uma técnica utilizada há muito na literatura. A estimulação elétrica dos barorreceptores, como método de tratamento da hipertensão arterial (Griffith e Schwartz, 1964), foi proposta tendo em vista as limitações da terapia anti-hipertensiva da época, início dos anos 60, em função dos efeitos colaterais e falta de resposta de alguns pacientes aos medicamentos disponíveis (Schwartz e Griffith, 1967). Warner (1958) mostrou que a ativação barorreflexa por meio da estimulação elétrica do nervo do seio carotídeo (nervo de Hering) reduziu a pressão arterial de cães anestesiados por períodos de até 90 minutos. No homem, a estimulação elétrica do nervo de Hering durante 10-20 segundos mostrou resultados semelhantes de quedas de PA e FC após a estimulação

(Carlsten e cols., 1958). Esta técnica de estimulação elétrica crônica dos barorreceptores arteriais de pacientes hipertensos foi posteriormente abandonada devido às limitações tecnológicas da época (estimulador grande, ausência de controle externo de intensidade de corrente, a estimulação de tecidos adjacentes provocavam dor, impossibilidade de recarregar a bateria).

A estimulação elétrica dos barorreceptores arteriais de animais de experimentação continuou sendo uma ferramenta muito útil para a investigação da regulação reflexa da pressão arterial e frequência cardíaca em várias espécies animais (Douglas e cols., 1956; Fan e Andresen, 1998). De Paula e cols. (1999) produziram queda da PA, bradicardia e vasodilatação no trem posterior de ratos normotensos, utilizando a técnica da estimulação elétrica do NDA em ratos acordados com livre movimentação ao variar a intensidade (voltagem) do estímulo. Estes autores observaram que a atropina bloqueou a bradicardia induzida pela estimulação elétrica do NDA, sem, no entanto, afetar a resposta hipotensora, demonstrando que a queda da PA foi, exclusivamente, pela redução da resistência periférica causada pela inibição simpática durante a estimulação. A técnica da estimulação elétrica do NDA também foi utilizada para demonstrar a contribuição dos receptores NMDA e não-NMDA na mediação dos componentes simpáticos e parassimpáticos no controle barorreflexo da PA no rato acordado, sem a indesejável presença de anestésicos ou drogas vasoativas (Machado e cols., 2000). Resultados do nosso laboratório (Salgado e cols., 2007) mostraram que a estimulação elétrica do NDA em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) acordados produziu quedas da PA e frequência cardíaca (FC), em valores relativos (%), semelhantes aos ratos Wistar normotensos.

Atualmente, o uso da técnica de estimulação elétrica dos barorreceptores

arteriais está voltando a ser considerada em humanos, uma vez que os problemas encontrados inicialmente parecem terem sido resolvidos com a utilização de novas tecnologias para a fabricação de eletrodos e aparelhos geradores de pulso. Além disso, o eletrodo de estimulação passou a ser implantado no seio carotídeo minimizando a probabilidade de lesão no nervo carotídeo. Estudos clínicos utilizando estimulação elétrica da bifurcação carotídea já estão em andamento, especialmente para o tratamento de indivíduos hipertensos resistentes à terapia farmacológica (Illig e cols., 2006; Filippone e Bisognano, 2007; Schmidli e cols., 2007; Tordoir e cols., 2007). Esses estudos utilizando-se da estimulação aguda (Illig e cols., 2006; Schmidli e cols., 2007) ou prolongada (Tordoir e cols., 2007) do seio carotídeo têm mostrado uma efetiva redução da pressão arterial e frequência cardíaca, mostrando-se uma técnica promissora para o tratamento da hipertensão arterial resistente à abordagem farmacológica.

Diante disso, entende-se que estudos complementares são necessários, para melhor elucidar o papel dos barorreceptores no controle da PA, e que sejam realizados em animais acordados, livres da ação indesejável de anestésicos, e sem o uso de substâncias vasoativas. No presente estudo, a estimulação elétrica do NDA será utilizada para induzir a expressão da proteína c-Fos a fim de detectar possíveis alterações do barorreflexo no modelo de hipertensão arterial induzida pelo L-NAME.

Expressão da proteína c-Fos

Nos últimos anos, inúmeros avanços na área da Neurobiologia Molecular foram observados, um exemplo disso, foi o estudo realizado por Montarolo e cols.

(1986), em *Aplysia*, uma espécie de molusco, que certos comportamentos adaptativos ao meio ambiente levavam à expressão de determinados genes. Sugerindo que alterações na expressão gênica teriam a capacidade de atuar, no sentido de adaptar o organismo, frente a diferentes estímulos. Os primeiros genes a serem ativados frente a um estímulo externo são os chamados genes de ativação imediata ou *immediate early genes* (IEGs), cuja síntese é rápida e transitória (Morgan e Curran, 1989). Substâncias que interagem com receptores localizados na membrana celular, ou no meio intracelular, podem levar à fosforização de proteínas, alterarem canais e o fluxo iônico, induzindo à expressão dos IEGs. Os proto-oncogenes *c-fos* e *c-jun* pertencem à classe dos IEGs e sintetizam respectivamente as proteínas Fos e Jun. Essas proteínas levam à codificação de fatores de transcrição ou *inducible transcription factors* (ITFs), que atuam no DNA celular provocando a transcrição de inúmeros genes alvos (*target genes*, TG), relacionados com modificações do fenótipo celular frente à estimulação ambiental significativa (Morgan e Curran, 1989; Sheng e Greenberg, 1990). Assim, esses genes têm sido considerados terceiro-mensageiros dentro do processo de transdução de sinais, ou melhor, na transmissão das informações celulares (Morgan e Curran, 1995). Os IEGs são expressos sob diversas formas, em diferentes áreas do SNC, sendo que seus produtos protéicos seriam importantes ferramentas utilizadas para mapeamento da atividade neuronal (Morgan e Curran, 1991, 1995; Chan e cols., 1998).

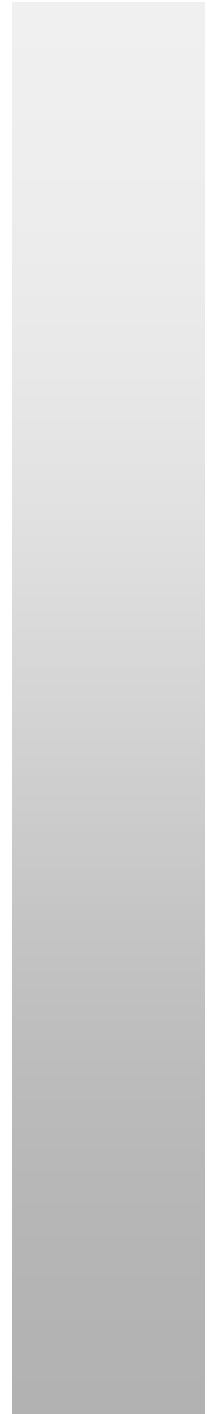
Estudos pioneiros de Curran e Morgan (1985) mostraram o aumento da expressão da proteína *c-Fos* em células nervosas após o contato com fator de crescimento neural. Vários trabalhos procuraram demonstrar o aumento nos níveis de *c-Fos* frente aos mais variados estímulos, incluindo o estresse de

imobilização, térmico, inflamação, hemorragia, variações da pressão osmótica, estimulação elétrica do nervo do seio carotídeo ou do NDA (Ceccatelli e cols., 1989; Erickson e Millhorn, 1991; Hunt e cols., 1987), entre outras formas de estresse. Como a expressão da proteína do gene c-fos é amplamente utilizada como marcador da atividade neuronal (Dragunow e cols., 1989; Morgan e Curran, 1989), sua detecção possui elevado potencial para determinar, no SNC, as vias polissinápticas que envolvem respostas fisiológicas específicas.

Vários estudos utilizaram técnicas de imunocitoquímica para mapear as regiões cerebrais relacionadas com alterações cardiovasculares encontrando um significativo aumento na expressão da proteína c-Fos no NTS, principalmente em sua porção comissural caudal, tanto em animais anestesiados como em acordados, tornando essa região o principal foco de estudos dessa natureza (Cheng-Dean e cols., 1996). McKittrick e cols. (1992) com a finalidade de determinar a expressão de c-Fos no cérebro de ratos após 1 hora de estimulação elétrica do NDA, em animais anestesiados, encontraram indícios dessa expressão em diversos locais do SNC, incluindo o NTS, RVLM e CVLM, NA, área postrema (AP), formação reticular bulbopontina, órgão subfornical e nos núcleos hipotalâmicos: PVN e supra-óptico (SON). Em outro estudo, Erickson e Millhorn (1991) estimularam o nervo do seio carotídeo de ratos anestesiados ou acordados, submetendo-os à hipóxia, com o intuito de observar a expressão de c-Fos no bulbo. Os resultados mostraram padrões similares na localização da expressão protéica como NTS, CVLM, RVLM, AP e núcleo pálido da rafe, com aumento de c-Fos nos animais anestesiados. Com esse mesmo objetivo, Miura e cols. (1994) se propuseram a estudar a expressão da proteína c-Fos após sucessivas estimulações do barorreflexo, por meio da administração de fenilefrina

em animais anestesiados. A proteína c-Fos foi encontrada em diversos núcleos do tronco encefálico, hipotálamo e até na base do telencéfalo, fato este, que evidencia a ação da anestesia, de maneira ainda desconhecida, na expressão dessa proteína. A expressão da proteína c-Fos foi maior no NTS (principalmente em sua região medial), entretanto, também foi expressa na AP, CVLM, RVLM, substância cinzenta periaquedutal (PAG) e órgão vasculoso da lâmina terminal (OVLT). Samuel e cols. (2004) observaram uma queda nos níveis da expressão de c-Fos no NTS de animais que tiveram o barorreflexo estimulado por infusão de fenilefrina quando submetidos à microinjeções de substâncias inibitórias da enzima nNOS. Estudos de Badoer (1998), utilizando traçadores neuronais mostraram que neurônios do PVN com projeções para o RVLM ou para a coluna intermediolateral (CIL), obtiveram um aumento na expressão de c-Fos após o estímulo de hipovolemia, entretanto, não obtiveram aumento dessa expressão quando o estímulo foi uma hipertensão causada por hipervolemia. Os resultados apresentados pelos trabalhos citados acima (Erickson e Millhorn, 1991; Mckitric e cols., 1992; Miura e cols., 1994; Cheng-Dean e cols., 1996; Badoer, 1998; Samuel e cols., 2004), foram obtidos em animais anestesiados, contudo há na literatura forte evidência de que a presença de anestésicos e/ou o emprego de drogas vasoativas podem influenciar de maneira substancial a expressão da proteína c-Fos nessas áreas mencionadas. Takayama e cols. (1994) compararam os efeitos de vários anestésicos comumente utilizados em estudos relacionados à expressão da proteína c-Fos em diferentes núcleos do tronco encefálico, hipotálamo e telencéfalo. Dentre os anestésicos analisados a uretana induziu o maior número de neurônios a expressar c-Fos, enquanto que a combinação fentanil/midazolam o menor.

Utilizando-se da técnica da estimulação elétrica do NDA esperamos no presente trabalho caracterizar, sem a indesejável presença de anestésico, o padrão da expressão da proteína c-Fos nas vias e áreas do SNC tradicionalmente relacionadas ao controle barorreflexo. Dado que na literatura atual não há trabalhos desta natureza (estimulação elétrica do NDA com o rato acordado e expressão de c-Fos no modelo de hipertensão L-NAME), espera-se, ainda, encontrar evidências da localização dos prováveis sítios (ou sítio) responsáveis (responsável) pela atenuação do controle barorreflexo no modelo de hipertensão arterial induzida pelo L-NAME. Propõe-se, portanto, verificar se há uma alteração na ativação neuronal, por meio da expressão da proteína c-Fos, nos neurônios das áreas centrais envolvidas na resposta barorreflexa após a estimulação elétrica do NDA de ratos hipertensos L-NAME acordados.



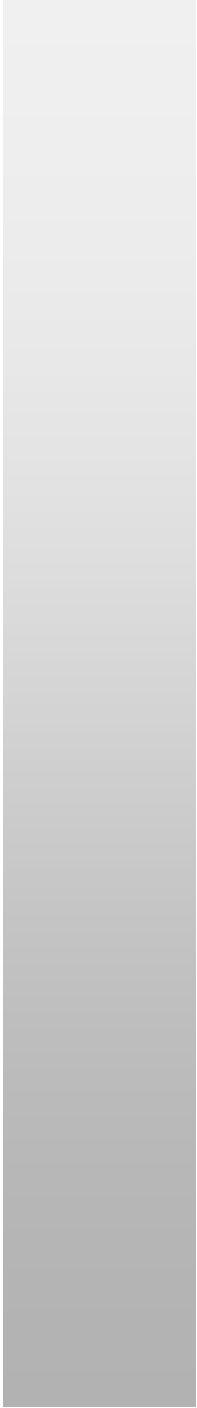
Objetivo

Objetivo Geral

Estudar a atividade neuronal na via barorreflexa e no PVN, por meio da expressão da proteína c-Fos, em ratos hipertensos L-NAME, acordados, submetidos à estimulação elétrica do NDA, a fim de se detectar possíveis alterações do barorreflexo nesse modelo de hipertensão arterial.

Objetivos Específicos

- Detectar possíveis alterações do barorreflexo no modelo de hipertensão arterial induzida pelo L-NAME;
- Avaliar a expressão da proteína c-Fos no NTS, local de 1° sinapse dos barorreceptores no bulbo;
- Avaliar a expressão da proteína c-Fos no CVLM, região inibitória do gerador da atividade simpática (RVLM);
- Avaliar a expressão da proteína c-Fos no RVLM;
- Avaliar a expressão da proteína c-Fos no PVN, região modulatória da atividade simpática.



Material e Métodos

3.1. Animais Experimentais

Foram utilizados ratos Wistar machos, com peso entre 300 e 350 gramas, provenientes do Biotério Central do Campus da USP de Ribeirão Preto. Os animais foram acondicionados, individualmente, em caixas plásticas, alocadas em uma sala climatizada (24° C), com ciclo claro/escuro controlado (12/12h), no biotério do Departamento de Fisiologia da FMRP/USP. Os protocolos realizados foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CETEA), da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (Proc. Nº 104/2007).

3.2. Desenvolvimento da hipertensão arterial pelo L-NAME

Para obtenção da hipertensão arterial os ratos receberam L-NAME (70mg/kg) dissolvido na água de beber durante duas semanas (14 dias). No décimo quarto dia os animais foram submetidos às cirurgias de cateterização e implante do eletrodo para estimulação do NDA. Após a cirurgia, os animais retornaram às caixas individuais para recuperação e continuação da ingestão de L-NAME. No dia seguinte os animais, acordados, foram submetidos ao protocolo de estimulação do NDA. Os animais normotensos foram submetidos aos mesmos procedimentos experimentais.

3.3. Determinação da pressão arterial pela artéria caudal do rato

O acompanhamento da instalação e desenvolvimento da hipertensão arterial dos ratos tratados com L-NAME, e dos normotensos, foi feita pelo método indireto (não invasivo) de medida da PA o qual utiliza a detecção do pulso arterial da cauda do animal (*IITC, Incorporation, Woodland Hills, 29-SSP, CA, USA*). A

medida indireta da PA foi realizada antes de iniciar o tratamento com L-NAME, D-NAME, um isômero inativo da molécula de L-NAME, ou água de beber. As medidas da PA foram realizadas no início do tratamento (1º dia), e no décimo terceiro dia, ou seja, 24h antes dos procedimentos cirúrgicos. O animal tratado com L-NAME e que não desenvolveu uma pressão arterial média acima de 140 mmHg não foi utilizado.

3.4. Procedimentos Cirúrgicos

Os animais foram anestesiados com tiopental sódico (50 mg/kg, i.p.), sob respiração assistida (*Small Animal Respiration Monitoring Instrumentation, CIV-101, Columbus Instruments, Columbus, OH, USA*), e monitorização do CO₂ do ar expirado (*5008 Co₂ Monitor, Stoelting, Wood Dale, IL, USA*), foram posicionados em decúbito dorsal sobre a mesa cirúrgica. Ampla cervicotomia foi realizada, e o NDA do lado esquerdo foi identificado por meio de um microscópio cirúrgico (*MC-M902MFZ, D.F.V. Com. Ind. Ltda, São Paulo, SP, BRA*), isolado, e posicionado sobre um par de eletrodos de aço inoxidável. Após amplificação do sinal, por meio de um pré-amplificador programável (*CyberAmp 380, Axon Instruments, Inc, Foster City, CA, USA*), o nervo teve sua atividade espontânea visualizada em um osciloscópio (*Agilent Technologies, China*) e monitorizada por um alto-falante. Após a identificação do potencial espontâneo o par de eletrodos foi implantado e fixado por uma resina de polivinilsiloxano (*Bisico, Bielefeld, Germany*). A extremidade do fio do eletrodo estimulador foi soldada a uma pequena tomada para ser conectada ao estimulador elétrico. Em seguida, a artéria e veia femoral do lado esquerdo foram cateterizadas com um tubo de polietileno [(PE-50 soldado a um PE-10), *Becton, Dickinson and Company, New Jersey, USA*], para registro

da pressão arterial e administração de anestésico, respectivamente. Tanto a tomada do eletrodo de estimulação como as cânulas implantadas foram exteriorizadas na região interescapular do animal. As incisões cirúrgicas foram suturadas, e o animal colocado para recuperação, até o dia seguinte, para realização do experimento sem anestesia.

3.5. Protocolos e grupos experimentais

3.5.1. Protocolos Experimentais

- Protocolo experimental 1 (estimulador elétrico desligado): Durante o experimento, a cânula arterial femoral permaneceu conectada a um transdutor de pressão (*Statham P23 Gb, Hato Rey, Porto Rico*) cujos sinais foram levados a um microcomputador (*IBM/PC*) por intermédio de um conversor A/D modelo DI 220 (*Dataq Instruments Inc., Akron, EUA*). Os eletrodos foram conectados ao estimulador elétrico (*AVS-10, AVS Projetos Especiais, São Paulo, Brasil*) o qual permaneceu desligado por um período de 20 minutos. Dessa forma, foram realizados registros da PA e FC basais (10 minutos) e com o estimulador desligado (20 minutos), após um período de 2 horas, foi realizada a perfusão transcardíaca e dado início aos procedimentos histoquímicos (Figura 2);
- Protocolo experimental 2 (estimulador elétrico ligado): Assim como no protocolo 1, durante o experimento a cânula arterial femoral permaneceu conectada a um transdutor de pressão e os sinais levados a um microcomputador por intermédio de um conversor A/D. Em seguida os eletrodos foram conectados ao estimulador elétrico o qual foi ligado fornecendo estímulos com amperagem fixa de 1 mA, duração de 2 ms, com ciclos de estimulação intermitente com estimulador ligado (*on*) durante 5s e

estimulador desligado (*off*) durante 10s com frequência de 60 Hz, por um período de 20 minutos. Dessa forma, foram realizados registros da PA e FC basais (10 minutos) e durante o a estimulação do NDA (20 minutos), após um período de 2 horas, foi realizada a perfusão transcardíaca e dado início aos procedimentos histoquímicos (Figura 3);

3.5.2. Grupos Experimentais

- Grupo 1 (n=7): Ratos normotensos controles, tratados somente com água de beber, submetidos aos procedimentos cirúrgicos, porém sem a estimulação elétrica do NDA (controle de c-Fos para manipulação animal, administração de anestésico e procedimentos cirúrgicos);
- Grupo 2 (n=6): Ratos normotensos controles, submetidos aos procedimentos cirúrgicos e ao protocolo de estimulação elétrica do NDA (controle de c-Fos para a estimulação elétrica do nervo depressor aórtico);
- Grupo 3 (n=5): Ratos normotensos D-NAME (70mg/kg) submetidos aos procedimentos cirúrgicos, porém sem a estimulação elétrica do NDA (controle de c-Fos para administração de D-NAME);
- Grupo 4 (n=5): Ratos normotensos D-NAME (70mg/kg) submetidos aos procedimentos cirúrgicos e ao protocolo de estimulação elétrica do NDA (controle de c-Fos para a administração de D-NAME associada à estimulação do nervo depressor aórtico);
- Grupo 5 (n=6): Ratos hipertensos L-NAME (70mg/kg) submetidos aos procedimentos cirúrgicos, porém sem a estimulação elétrica do NDA (controle de c-Fos para administração de L-NAME);

- Grupo 6 (n=7): Ratos hipertensos L-NAME (70mg/kg) submetidos aos procedimentos cirúrgicos e ao protocolo de estimulação elétrica do NDA (controle de c-Fos para administração de L-NAME associada à estimulação elétrica).

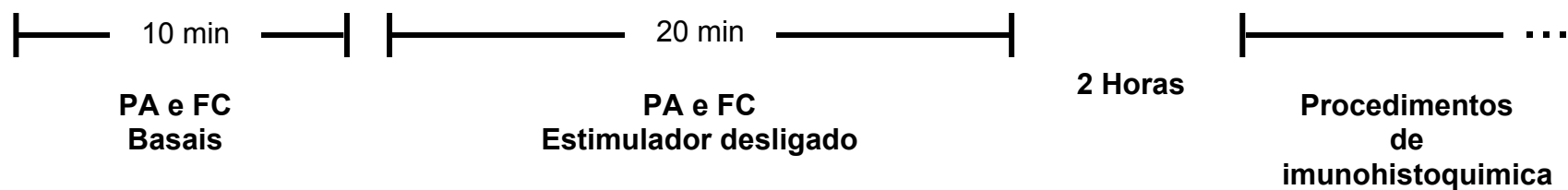
Protocolo experimental 1

Figura 2. Protocolo experimental 1: Registros basais da PA e FC (10 minutos) com o estimulador desligado (20 minutos). Duas horas após esse procedimento foi realizada a perfusão transcardíaca para dar início aos ensaios histoquímicos. PA=pressão arterial, FC= frequência cardíaca.

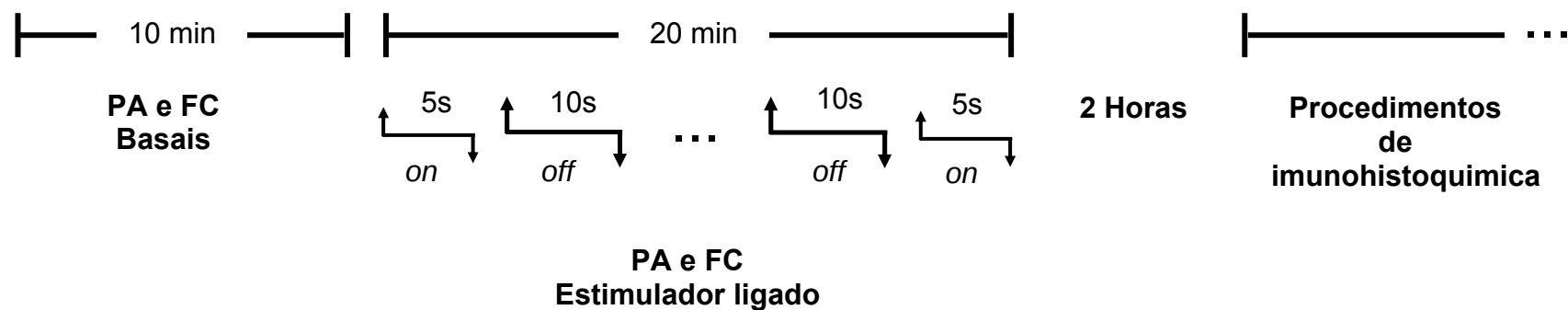
Protocolo experimental 2

Figura 3. Protocolo experimental 2: Registros basais da PA e FC (10 minutos) com o estimulador ligado (20 minutos). Duas horas após esse procedimento foi realizada a perfusão transcárdica para dar início aos ensaios histoquímicos. PA=pressão arterial, FC= frequência cardíaca, parâmetros de estimulação: 1mA, 2ms, 60Hz.

3.6. Procedimentos Histoquímicos

Duas horas após a ativação do barorreflexo os animais foram anestesiados com tiopental sódico (50 mg/kg, i.v) para realização da perfusão transcardíaca com auxílio de uma bomba injetora com velocidade controlada (*Bomba Dosadora Peristáltica Milan 202, Milan[®] – Equipamentos Científicos LTDA, BRA*). Os animais foram perfundidos com 300 ml de solução fosfato-salina (PBS) a 0,01M e pH 7,4, seguidos de 300 ml paraformaldeído (PFA) 4% (*Sigma Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA*) em tampão fosfato 0,1M (pH 7,4). Após esse procedimento os encéfalos foram removidos, fixados por duas horas em PFA (o mesmo usado para a perfusão), e estocados em sacarose 30% (*Vetec Química Fina Ltda, Duque de Caxias, RJ, BRA*) pelo tempo de 40-48 horas para crioproteção. Após esse tempo, seguiu o congelamento dos encéfalos em *Tissue Teck (Sakura Finetek Inc., Torrance, CA, USA)*, para serem seccionados em cortes de 40µm de espessura usando um aparelho criostato (*Mícron, International GmbH, Waldorf, Germany*). Os cortes foram recolhidos em placas acrílicas perfuradas contendo PBS e solução anti-congelante (50% de tampão fosfato 50 mM, 30% etilenoglicol e 20% glicerina). As placas foram armazenadas em freezer -20°C.

3.6.1. Coloração de Nissl

As secções que estavam em sistema de *free floating* foram montadas em lâminas gelatinizadas para secagem à temperatura ambiente (24h). Após esse período, os cortes foram hidratados e colocados por 1 minuto em solução de Cresil Violeta 0,25% em tampão acetato e depois lavados em água corrente por 10 minutos. Em seguida as lâminas foram desidratadas e montadas com

lamínulas usando *PermOUNT*[®] (*Entellan, Merck, Darmstadt, Germany*) como meio de montagem.

3.6.2. Imunohistoquímica para detecção da proteína c-Fos

A imunohistoquímica para a proteína c-Fos foi realizada de acordo com a metodologia descrita por De Oliveira, Del Bel e Guimarães (2000). Os cortes foram lavados e incubados para revelação da proteína c-Fos como é mostrado abaixo:

- Três lavagens de 5 minutos sob agitação de 30 rpm em PBS 0,01M (pH 7,4);
- Bloqueio com H₂O₂ (Vetec[®]) 1% durante 10 minutos (para redução da atividade da peroxidase endógena);
- Três lavagens de 5 minutos sob agitação de 30 rpm em PBS 0,01M (pH 7,4);
- Incubação em solução de bloqueio (PBS+: albumina bovina 0,1% em PBS 0,1M acrescido de Triton-X 0,02%), durante duas horas, para bloqueio dos sítios de ligações inespecíficas;
- Incubação de 48 horas (temperatura de 4°C e agitação constante de 30 rpm) com anticorpo primário policlonal de coelho anti-Fos (*Santa Cruz Biotechnology*) 1:2.000, diluído em PBS+, desenvolvido contra resíduos 2-16 da porção N-terminal da proteína c-Fos;
- Três lavagens de 5 minutos sob agitação de 30 rpm em PBS 0,01 M (pH 7,4);
- Incubação de 2 horas (temperatura ambiente e agitação constante de 30 rpm) com anticorpo secundário biotinilado anti-coelho (*Vector Laboratories*) 1:1.500, diluído em PBS+. Este anticorpo possui moléculas de biotina em sua porção longa e liga-se ao anticorpo primário, específico contra a proteína c-Fos;
- Três lavagens de 5 minutos sob agitação de 30 rpm em PBS 0,01M (pH 7,4);

- 1 hora de incubação à temperatura ambiente com Complexo ABC avidina-biotina-peroxidase (Vectastain ABC Kit, *Vector Laboratories*) 1:1.500, diluído em PBS 0,01M. A avidina é uma proteína que possui quatro sítios de ligação para biotina, molécula pela qual possui alta afinidade. Nesta etapa, há formação *in vitro* do complexo avidina-biotina-peroxidase, o qual, por sua vez, liga-se à biotina associada ao anticorpo secundário;
- Três lavagens de 5 minutos sob agitação de 30 rpm em PBS 0,01M (pH 7,4);
- 10 minutos de incubação com solução de tetracloreto de 3,3'-di-amino-benzidina (DAB) contendo H₂O₂ a 0,02% em PBS 0,01M para revelação da atividade da peroxidase. A di-amino-benzidina é um cromógeno que na presença de H₂O₂ e de peroxidase forma um precipitado de cor marrom que pode ser visualizado no interior dos núcleos neuronais contendo a proteína c-Fos;
- Após adequadamente lavados, os cortes foram desidratados por meio de uma série de alcoóis (70, 80, 95 e 100%, 5 minutos cada) e clareados com xilol (duas vezes por 10 minutos). Os cortes foram montados em lâminas gelatinizadas, cobertas com *Permount*[®] e lamínulas para observação ao microscópio de luz.

3.7. Análise Microscópica

A visualização microscópica do tecido permitiu, em primeira estância, analisar o padrão espacial das imunomarcas. As imagens foram adquiridas em níveis semelhantes para todos os animais de acordo com as coordenadas do Atlas de Paxinos e Watson (2008).

A análise das imunomarcações dos neurônios imunorreativos à proteína c-Fos (Fos-IR) no núcleo do trato solitário (NTS) foi realizada em três diferentes níveis, no sentido rostro-caudal: a) NTS rostral (NTSr: -13.44mm atrás do

bregma); b) NTS intermediário (NTSi: -14.04mm atrás do bregma) e c) NTS comissural caudal (NTSc: -14.40mm atrás do bregma). O núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) foi subdividido em cinco porções: a) PVN magnocelular anterior (PaMA: -1.32mm em relação ao bregma); b) PVN magnocelular medial (PaMM: -1.56mm em relação ao bregma); c) PVN magnocelular lateral (PaLM: -1.80mm em relação ao bregma); d) PVN parvocelular medial (PaMP: -1.80mm em relação ao bregma) e e) PVN parvocelular posterior (PaPO: -2.04mm em relação ao bregma). Além dessas áreas também foram analisados a porção caudal ventrolateral do bulbo (CVLM: -14.04mm atrás do bregma) e a porção rostral ventrolateral do bulbo (RVLM: -12.24mm atrás do bregma).

As imagens foram capturadas empregando uma câmara de vídeo de alta resolução (aumento de 10x), que capta imagens de cor acoplada a um microscópio Leica DM 4500 B provido de óptica para campo claro. As fotomicrografias das seções representativas dos grupos controles e experimentais foram submetidas apenas a ajustes de tamanho, balanço de cores e contraste com o auxílio do *Adobe Photoshop Image Analysis Program (CS2)*. Estas imagens foram transferidas para um computador dotado do programa SCION IMAGE® (Videoblaster/ SCION IMAGE, NIH, 1997) onde foram definidos um tamanho nuclear e um limiar de intensidade de cor que correspondesse aos sinais positivos da Fos-IR. O número de células apresentando Fos-IR foi quantificado em um único nível, no hemisfério cerebral esquerdo, ipsilateral à implantação do eletrodo de estimulação elétrica do NDA. O limite corresponde à região de interesse foi dada com base nas coordenadas do Atlas de Paxinos e Watson (2008) e da coloração de Nissl do corte adjacente. A contagem de c-Fos também foi realizada manualmente para confirmar a similaridade das contagens e

repetida ao menos duas vezes em cada secção analisada por diferentes pesquisadores (sem conhecimento dos tratamentos prévios que os animais foram submetidos), para se certificar que os perfis obtidos nas contagens fossem similares.

As contagens obtidas permitiram obter uma comparação relativa (e não absoluta) das imunomarcas, tendo em vista que para os objetos (núcleos) contados a espessura das secções não variou entre os tratamentos. Além disso, os objetos não apresentaram variação em sua dimensão, tendo sido fixado um valor padrão (em pixels) para o tamanho dos núcleos de coloração negra intensa e um limiar de coloração (*threshold*) para o plano de fundo (*background*), a fim de minimizar sua influência. Os valores estão expressos em densidade de c-Fos (N° de Fos / área em mm^2) $\pm$ EPM.

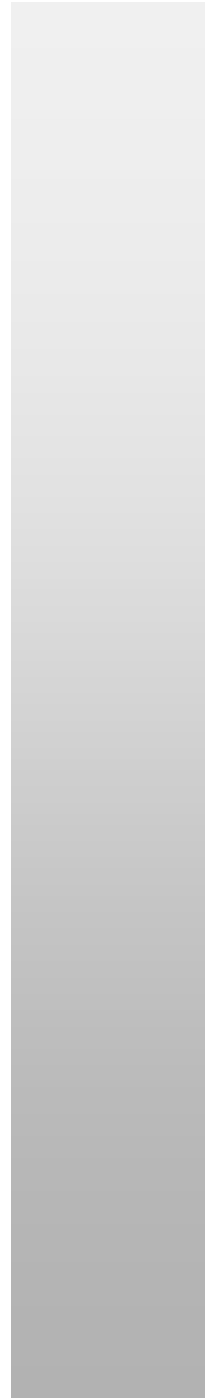
3.8. Análise dos dados hemodinâmicos

Os registros da pressão arterial foram obtidos por meio de um programa computacional que detecta pontos de inflexão em sinais periódicos (*Advanced CODAS, Dataq Instruments, OH, EUA*). Para análise dos dados de estimulação elétrica do NDA as séries temporais da pressão arterial média (PAM) e FC foram analisadas em períodos de 2 minutos, onde os efeitos da estimulação elétrica intermitente estão representados como a média das deflexões obtidas em cada período, ao longo dos 20 minutos estabelecidos.

3.9. Análise Estatística

A análise estatística dos dados foi realizada com a assistência do Centro de Métodos Quantitativos (CEMEQ) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – FMRP/USP.

Para análise dos parâmetros hemodinâmicos basais (PAM e FC) e da densidade da proteína c-Fos nas diferentes regiões mensuradas, utilizou-se a metodologia de análise de variância (ANOVA). A análise dos dados hemodinâmicos (PAM e FC), durante a realização do protocolo de estimulação elétrica do NDA, utilizou o modelo linear de efeitos mistos (aleatórios e fixos). As análises foram realizadas por meio do programa (*software*) SAS[®] 8.0 com as diferenças consideradas significantes quando $p \leq 0,05$.



Resultados

Os resultados são apresentados como média $\pm$ EPM sob a forma de figuras e tabelas. Os valores individuais são apresentados no apêndice sob a forma de tabelas.

4.1. Parâmetros Hemodinâmicos

4.1.1. Parâmetros hemodinâmicos basais

A tabela 1 apresenta os valores basais de pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) após 14 dias de tratamento para os três grupos experimentais: ratos normotensos controle, D-NAME e hipertensos L-NAME. Estes resultados mostram que os animais hipertensos L-NAME apresentaram valores de PAM e FC significativamente maiores que os ratos controle e D-NAME.

4.1.2. Respostas hemodinâmicas à estimulação elétrica do NDA

As figuras 4 e 5 ilustram, respectivamente, as respostas da PAM e FC de ratos normotensos controle, D-NAME e hipertensos L-NAME, a cada intervalo de 2 minutos de estimulação elétrica do NDA, ao longo de 20 minutos. Observa-se que a estimulação elétrica do nervo depressor aórtico (NDA) induziu quedas da PAM e FC similares nos três grupos experimentais.

4.2. Expressão de c-Fos nos neurônios do núcleo do trato solitário (NTS)

A figura 6 mostra a coloração de Nissl de cortes representativos do NTS rostral (NTSr), NTS intermediário (NTSi) e NTS caudal (NTSc) de um rato controle não submetido ao protocolo de estimulação do NDA. A coloração de Nissl juntamente com o atlas de Paxinos e Watson (2008) foi utilizada para delimitar a

área de interesse (linha pontilhada) para a mensuração da densidade de proteína c-Fos.

As figuras 7, 8 e 9 ilustram a expressão da proteína c-Fos em ratos normotensos controle, D-NAME e hipertensos L-NAME submetidos, ou não, à estimulação do NDA. Observa-se que a estimulação levou a um aumento na expressão de c-Fos no NTSi e NTSc nos três grupos experimentais.

4.2.1. Expressão da proteína c-Fos nos neurônios do NTS de animais não submetidos à estimulação elétrica do NDA

A figura 10 ilustra graficamente que não houve diferença na densidade de c-Fos mensurada no NTS dos diferentes grupos experimentais quando não houve estimulação elétrica do NDA.

4.2.2. Expressão da proteína c-Fos nos neurônios do NTS de animais submetidos à estimulação elétrica do NDA

A figura 11 representa a densidade de c-Fos no NTS nos três diferentes grupos experimentais submetidos à estimulação elétrica do NDA. Nota-se maior expressão de c-Fos no NTSi e NTSc após a ativação do barorreflexo.

A tabela 2 sumariza as densidades de c-Fos obtidos nos diferentes níveis do NTS nos animais controle, D-NAME e hipertensos L-NAME submetidos, ou não, à estimulação elétrica do NDA.

4.2.3. Agrupamento dos dados de expressão da proteína c-Fos nos neurônios do NTS de animais submetidos, ou não, à estimulação elétrica do NDA

A figura 12 ilustra graficamente que a estimulação elétrica do NDA aumentou a expressão da proteína c-Fos no NTSi e NTSc. Esse aumento foi maior nos hipertensos L-NAME quando comparado com os animais não estimulados (controle, D-NAME e L-NAME) e normotensos estimulados (controle e D-NAME).

A tabela 3 sumariza as densidades de c-Fos após o agrupamento de dados, nos diferentes níveis do NTS, nos grupos não estimulados (controle, D-NAME e L-NAME), normotensos estimulados (controle e D-NAME) e estimulados L-NAME.

Tabela 1. Valores basais ($\bar{x} \pm \text{EPM}$) de pressão arterial média (PAM, mmHg) e frequência cardíaca (FC, bpm) de ratos normotensos controle, D-NAME e hipertensos L-NAME.

	<u>PAM</u>	<u>FC</u>
Controle (n=13)	100 $\pm$ 2	355 $\pm$ 7
D-NAME (n=10)	108 $\pm$ 1	366 $\pm$ 8
L-NAME (n=13)	163 $\pm$ 4*	404 $\pm$ 8*

*P $\leq$ 0,05 em relação aos grupos controle e D-NAME.

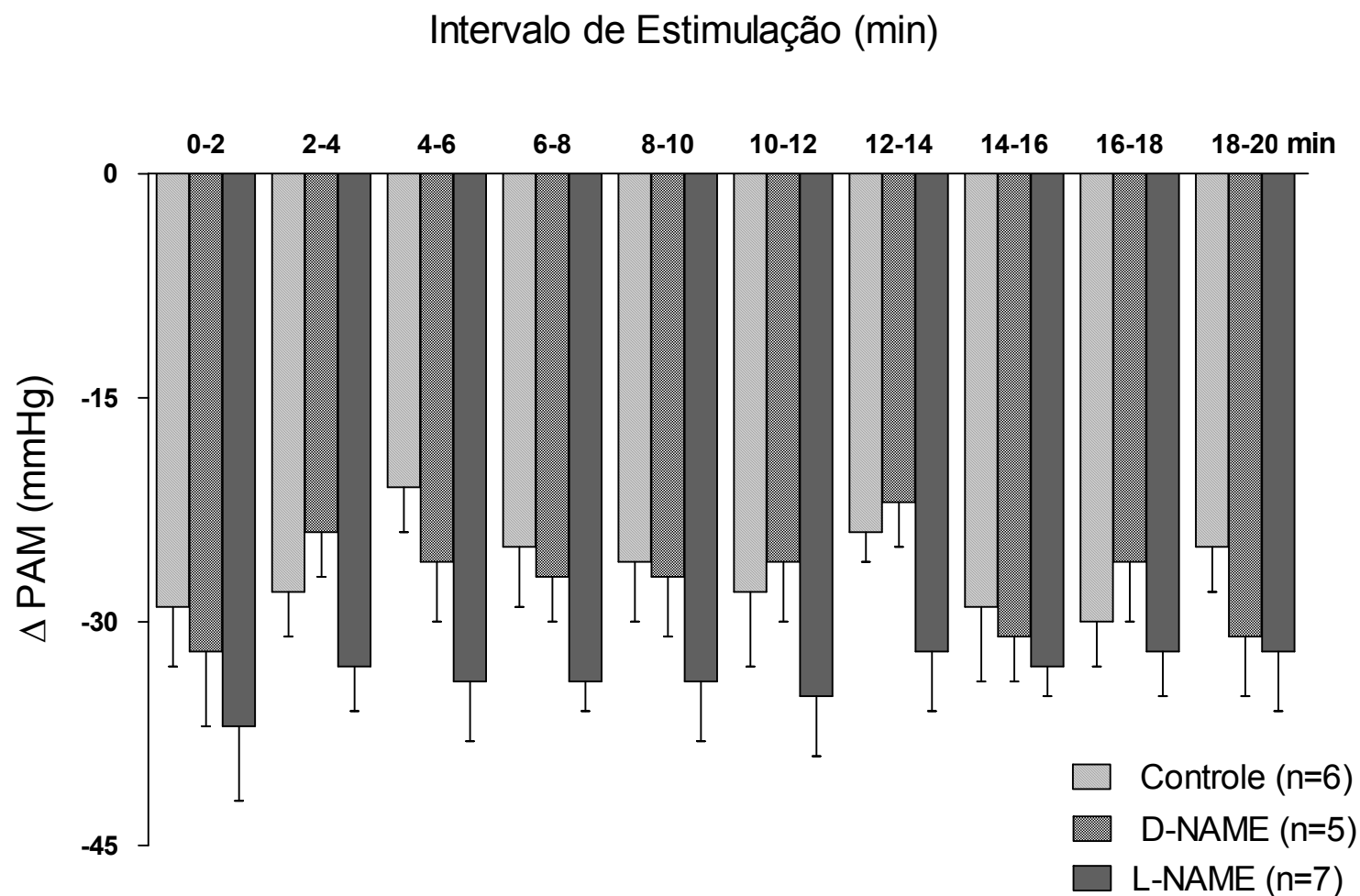


Figura 4. Quedas ($\bar{x} \pm \text{EPM}$) da pressão arterial média (ΔPAM) nos intervalos de 2 minutos de estimulação elétrica do NDA ao longo de 20 minutos.

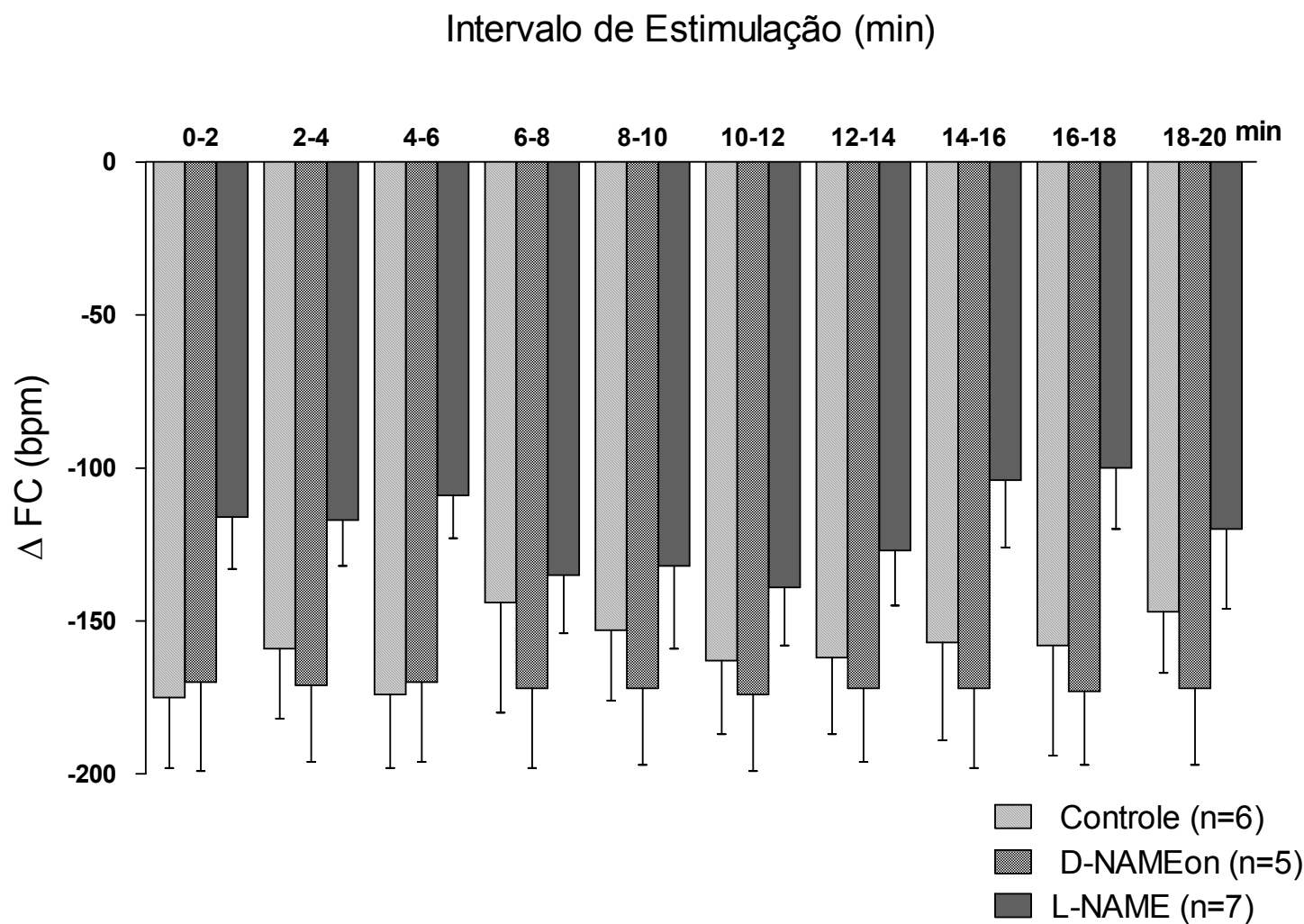


Figura 5. Quedas ($\bar{x} \pm \text{EPM}$) da frequência cardíaca (ΔFC) nos intervalos de 2 minutos de estimulação elétrica do NDA ao longo de 20 minutos.

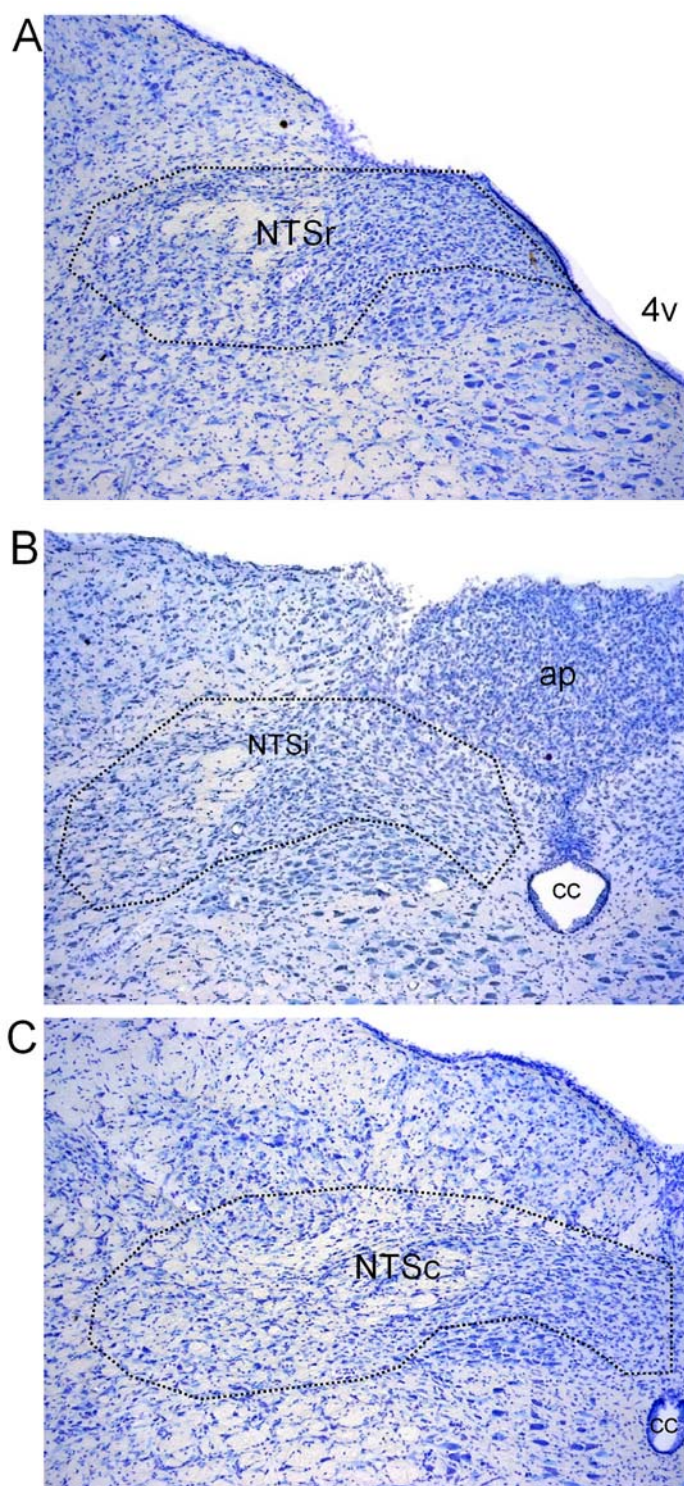


Figura 6. Coloração de Nissl de cortes representativos do NTS. A: NTS rostral (NTSr), B: NTS intermediário (NTSi) e C: NTS caudal (NTSc) de um rato normotenso controle não submetido ao protocolo de estimulação elétrica do NDA. A linha pontilhada delimita esquematicamente a área estudada. 4v = quarto ventrículo; ap = área postrema; cc = canal central.

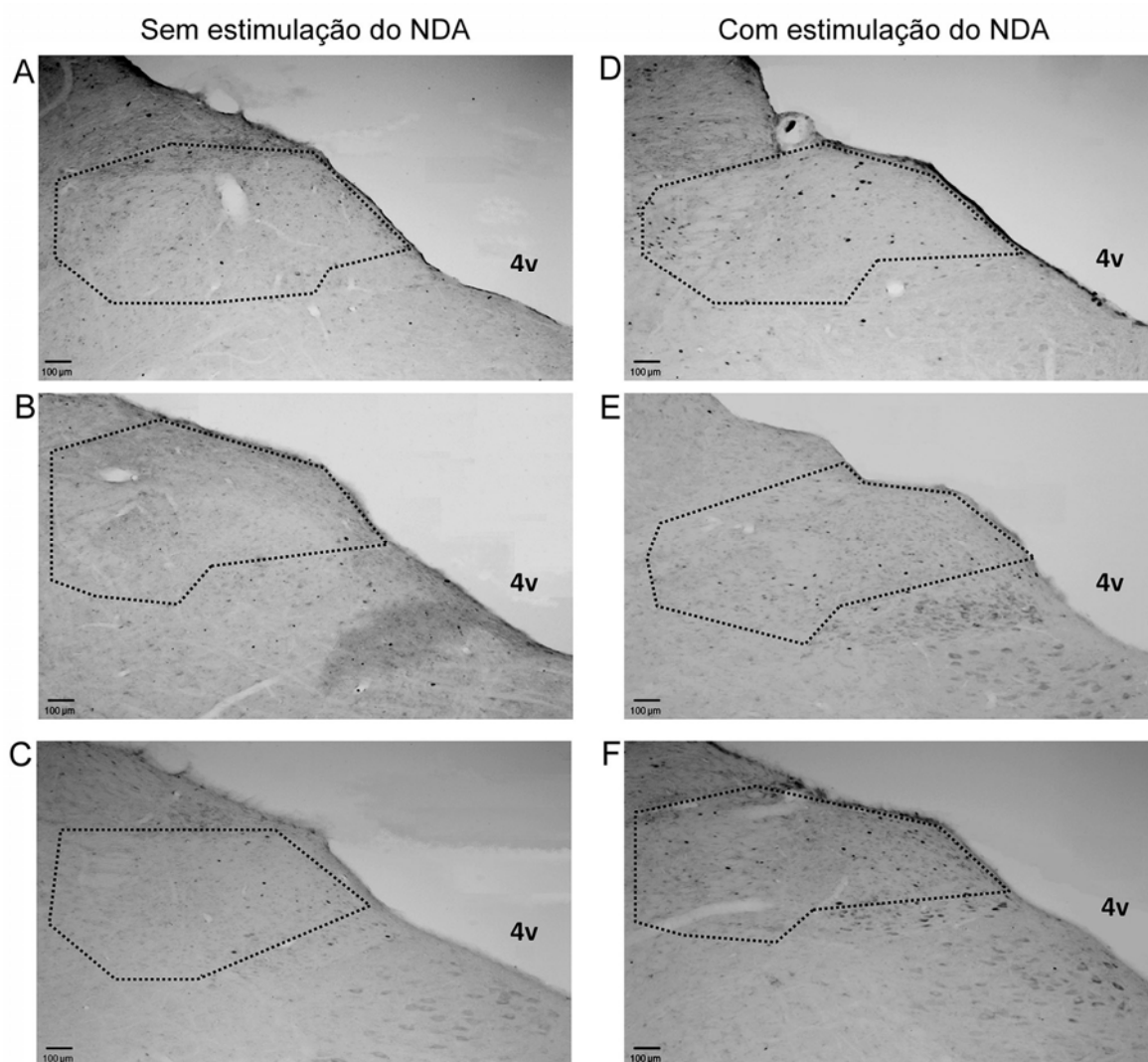


Figura 7. Expressão da proteína c-Fos nos neurônios do NTS rostral (NTSr) de ratos controle (A e D), D-NAME (B e E) e hipertensos L-NAME (C e F). Os painéis à esquerda representam os animais sem estimulação do NDA (A, B e C), enquanto à direita representam os animais submetidos à estimulação elétrica do NDA (D, E e F). A linha pontilhada delimita esquematicamente a área estudada. 4v = quarto ventrículo.

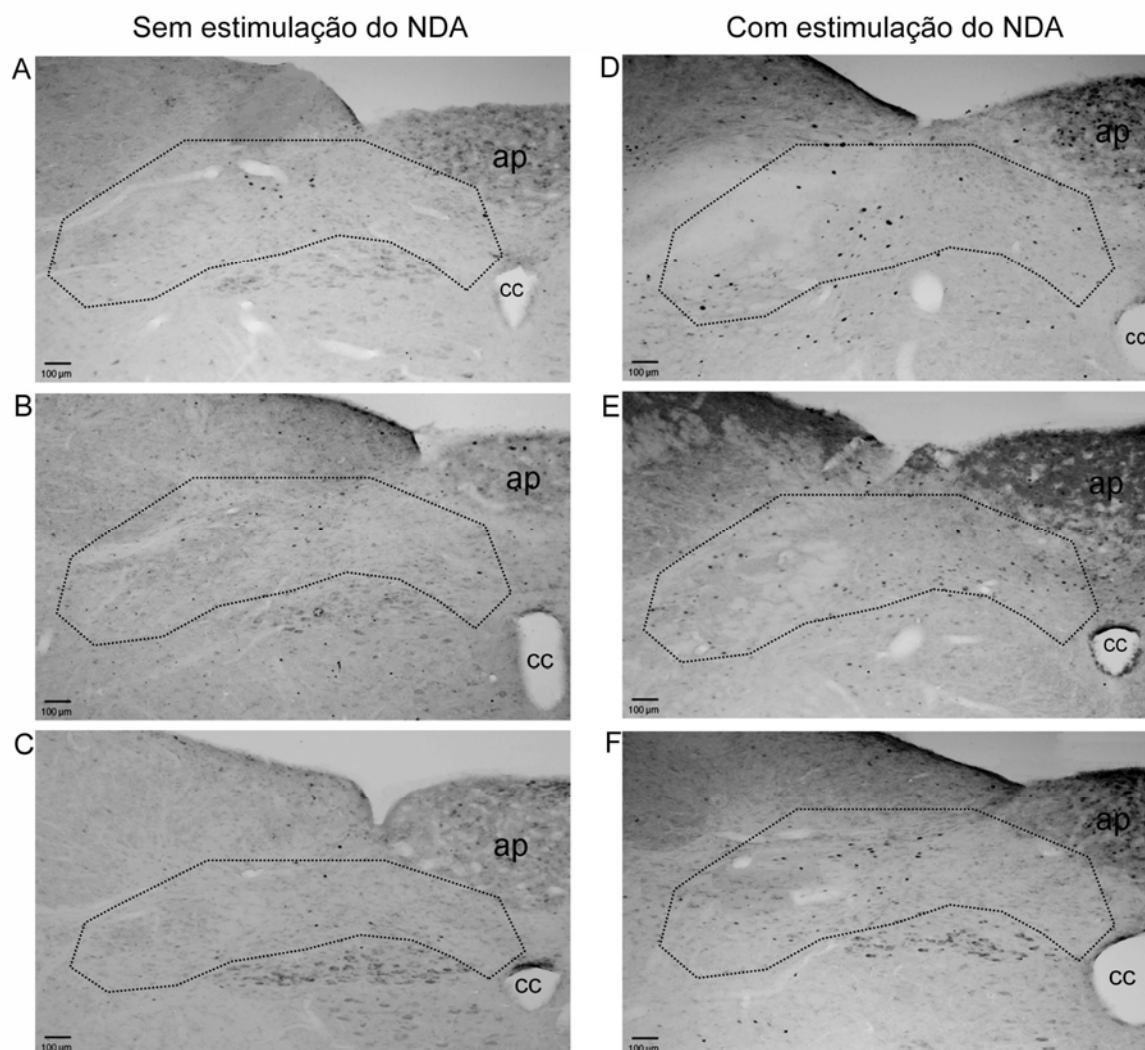


Figura 8. Expressão da proteína c-Fos nos neurônios do NTS intermediário (NTSi) de ratos controle (A e D), D-NAME (B e E) e hipertensos L-NAME (C e F). Os painéis à esquerda representam os animais sem estimulação do NDA (A, B e C), enquanto à direita representam os animais submetidos à estimulação elétrica do NDA (D, E e F). A linha pontilhada delimita esquematicamente a área estudada. ap = área postrema; cc = canal central.

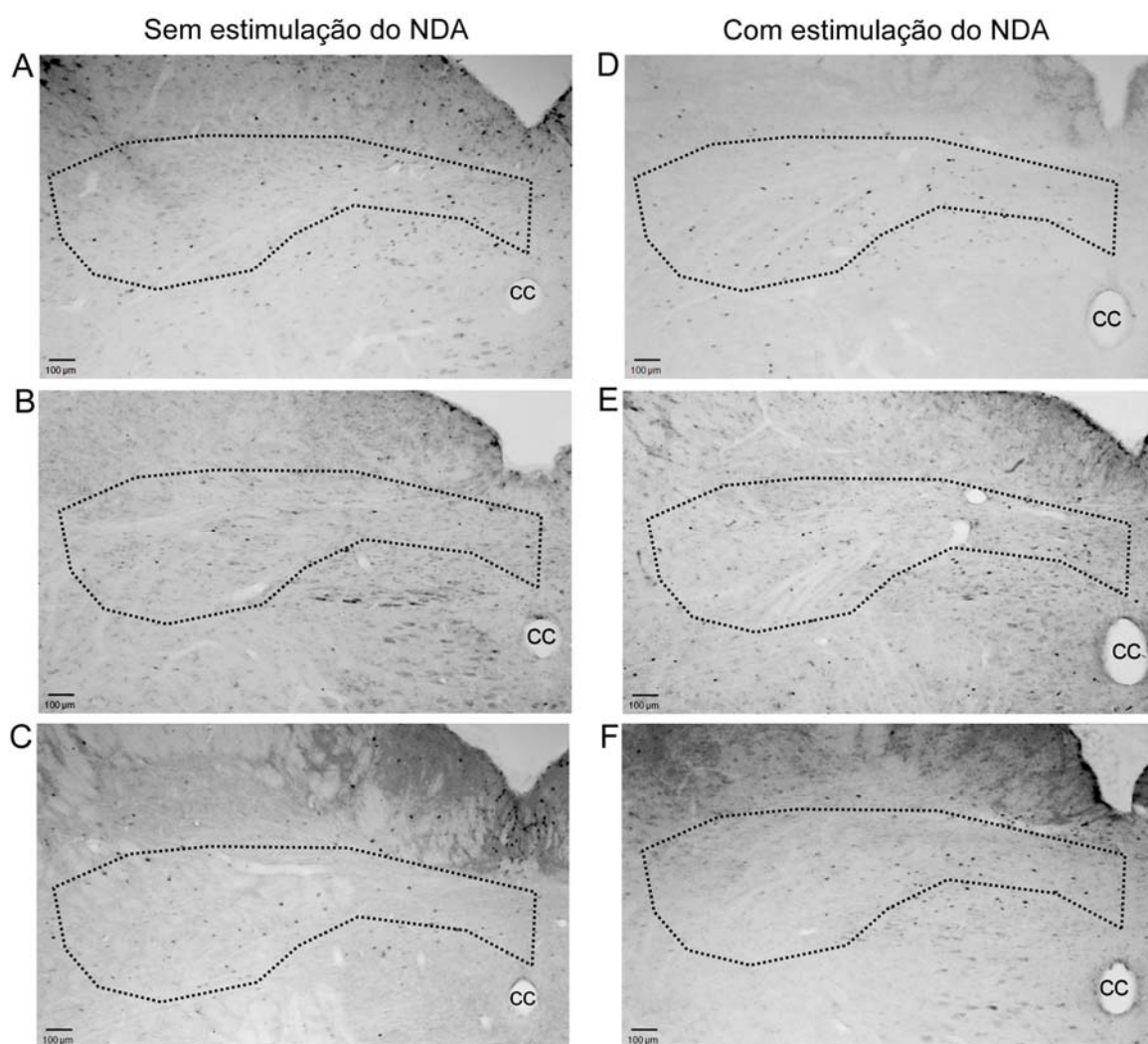


Figura 9. Expressão da proteína c-Fos nos neurônios do NTS caudal (NTSc) de ratos controle (A e D), D-NAME (B e E) e hipertensos L-NAME (C e F). Os painéis à esquerda representam os animais sem estimulação do NDA (A, B e C), enquanto à direita representam os animais submetidos à estimulação elétrica do NDA (D, E e F). A linha pontilhada delimita esquematicamente a área estudada. cc = canal central.

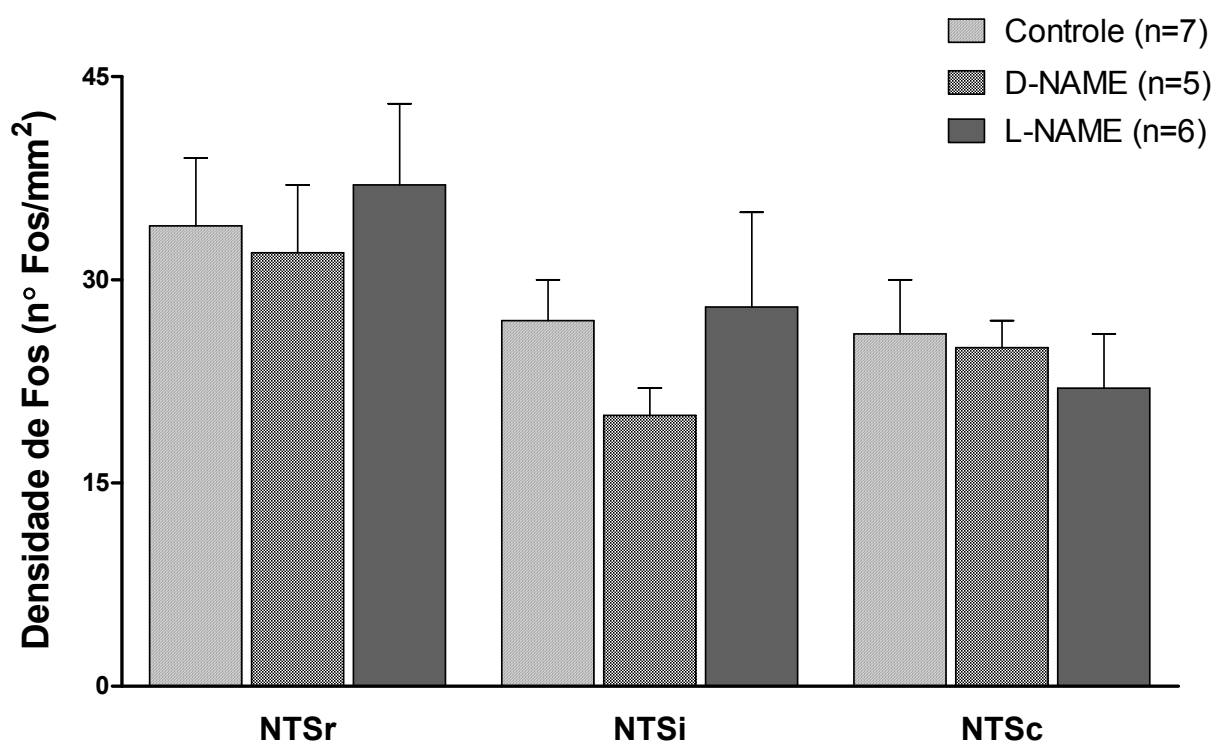


Figura 10. Densidade da proteína c-Fos nos neurônios do NTS dos animais que não foram submetidos ao protocolo de estimulação elétrica do NDA. NTS rostral (NTSr), intermediário (NTSi) e caudal (NTSc).

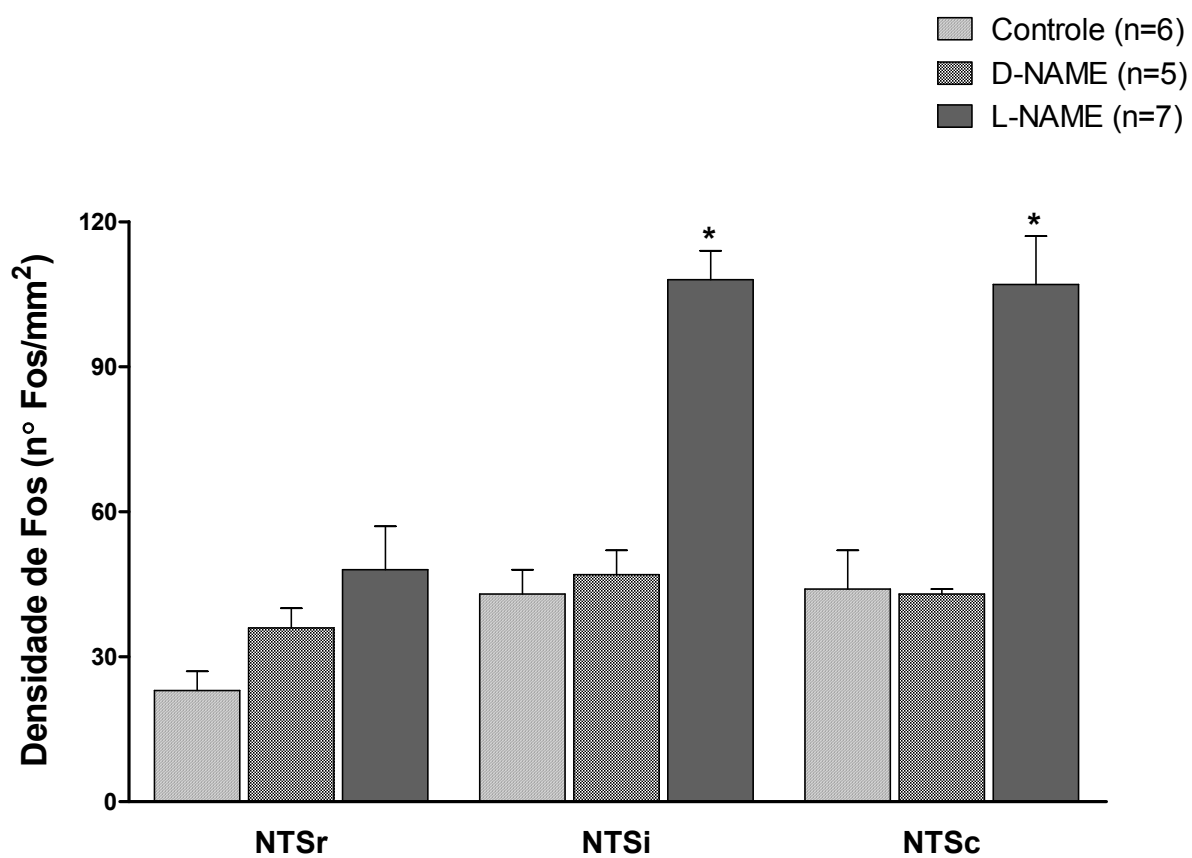


Figura 11. Densidade da proteína c-Fos nos neurônios do NTS dos animais submetidos à estimulação elétrica do NDA. NTS rostral (NTSr), intermediário (NTSi) e caudal (NTSc). * $P \leq 0,05$ em relação aos grupos controle e D-NAME.

Tabela 2. Densidade de c-Fos (Nº Fos/mm²) nos neurônios do núcleo do trato solitário rostral (NTSr), intermediário (NTSi) e caudal (NTSc) de ratos controle, D-NAME e hipertensos L-NAME submetidos, ou não, à estimulação elétrica do NDA.

	<u>NTSr</u>			<u>NTSi</u>			<u>NTSc</u>		
	Controle	D-NAME	L-NAME	Controle	D-NAME	L-NAME	Controle	D-NAME	L-NAME
Não estimulado	34±5 (n=7)	32±5 (n=5)	37±6 (n=6)	27±3 (n=7)	20±2 (n=5)	28±7 (n=6)	26±4 (n=7)	25±2 (n=5)	22±4 (n=6)
Estimulado	23±4 (n=6)	36±4 (n=5)	48±9 (n=7)	43±5* (n=6)	47±5* (n=5)	108±6* (n=7)	44±8* (n=6)	43±1* (n=5)	107±10* (n=7)

*P ≤ 0,05 em relação aos animais não estimulados.

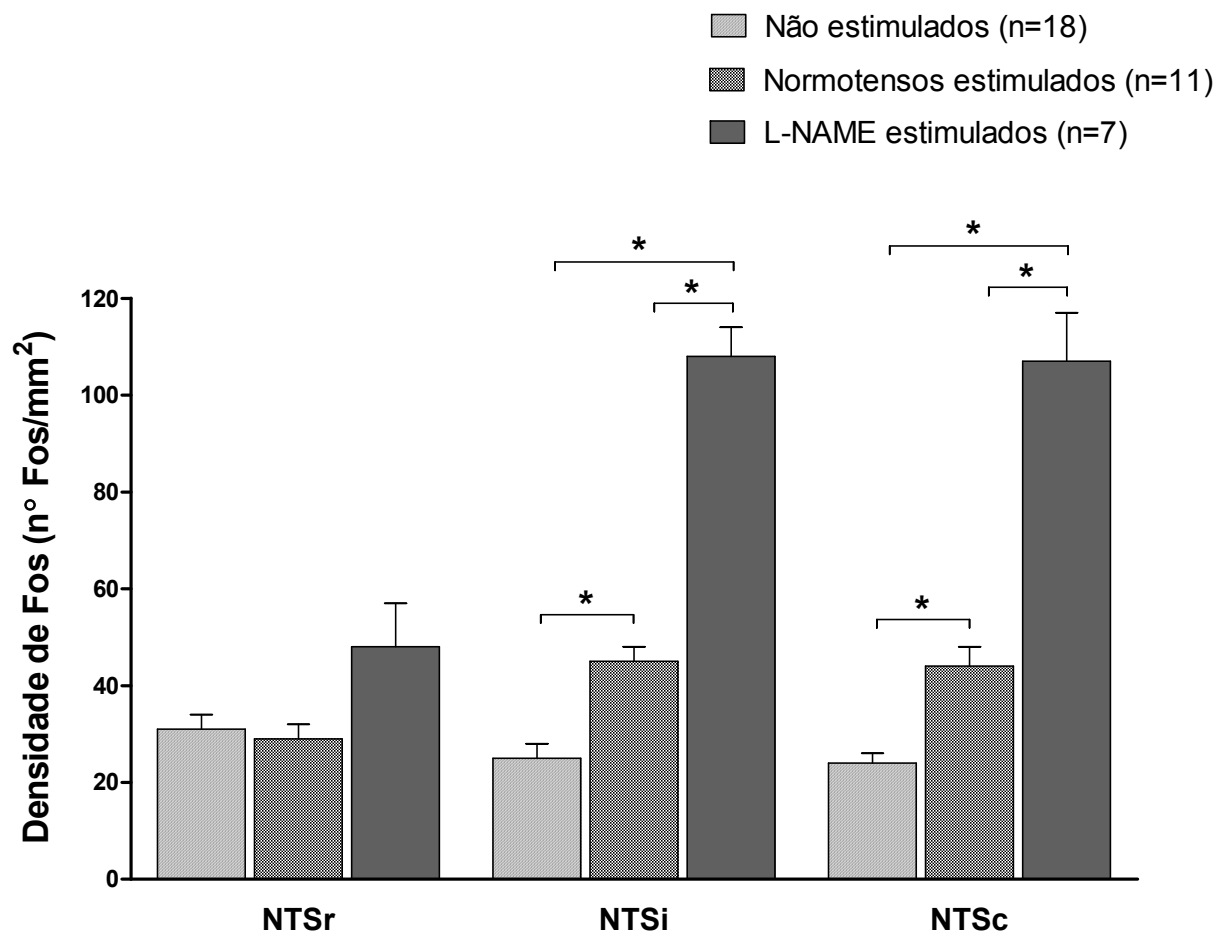


Figura 12. Densidade da proteína c-Fos nos neurônios do NTS rostral (NTSr), intermediário (NTSi) e caudal (NTSc) de animais não estimulados (controle, D-NAME e L-NAME), normotensos estimulados (controle e D-NAME) e estimulados L-NAME. * $P \leq 0,05$.

Tabela 3. Densidade de c-Fos (Nº Fos/mm²) nos neurônios do núcleo do trato solitário rostral (NTSr), intermediário (NTSi) e caudal (NTSc) de ratos não estimulados (controle, D-NAME e hipertensos L-NAME), normotensos estimulados (controle e D-NAME) e L-NAME estimulados.

	<u>NTSr</u>	<u>NTSi</u>	<u>NTSc</u>
Não estimulados (n=18)	31±3	25±3	24±2
Normotensos estimulados (n=11)	29±3	45±3*	44±4*
L-NAME estimulados (n=7)	48±9	108±6*†	107±10*†

P ≤ 0,05 em relação aos animais não estimulados (*) e normotensos estimulados (†).

4.3. Expressão de c-Fos nos neurônios do bulbo ventrolateral (VLM)

A figura 13 ilustra a coloração de Nissl de cortes representativos da porção caudal ventrolateral do bulbo (CVLM) e da porção rostral ventrolateral do bulbo (RVLM), de um animal controle não submetido à estimulação elétrica do NDA. A coloração de Nissl, juntamente com o atlas de Paxinos e Watson (2008) foi utilizada para delimitar a área de interesse (linha pontilhada) para a mensuração da densidade de proteína c-Fos.

As figuras 14 e 16 ilustram a expressão da proteína c-Fos no CVLM e no RVLM de ratos normotensos controle, D-NAME e hipertensos L-NAME submetidos, ou não, ao protocolo de estimulação elétrica do NDA. Observa-se nas figuras 15 e 17 que a estimulação do NDA induziu maior ativação neuronal, apenas, no CVLM (Figura 15) em relação aos ratos sem estimulação.

As tabelas 4 e 5 apresentam os valores da densidade da proteína c-Fos no CVLM e RVLM, nos animais controle, D-NAME e hipertensos L-NAME submetidos, ou não, à estimulação elétrica do NDA.

4.3.1. Agrupamento dos dados de expressão da proteína c-Fos nos neurônios do VLM de animais submetidos, ou não, à estimulação elétrica do NDA

A figura 18 ilustra graficamente que houve maior expressão da proteína c-Fos no CVLM dos animais normotensos estimulados (controle e D-NAME) e hipertensos L-NAME estimulados, quando comparados com os animais não estimulados (controle, D-NAME e L-NAME). No RVLM, a estimulação do NDA não alterou a densidade da proteína c-Fos.

A tabela 6 mostra a densidade de c-Fos após o agrupamento de dados no CVLM e RVLM nos animais não estimulados (controle, D-NAME e L-NAME), normotensos estimulados (controle e D-NAME) e estimulados L-NAME.

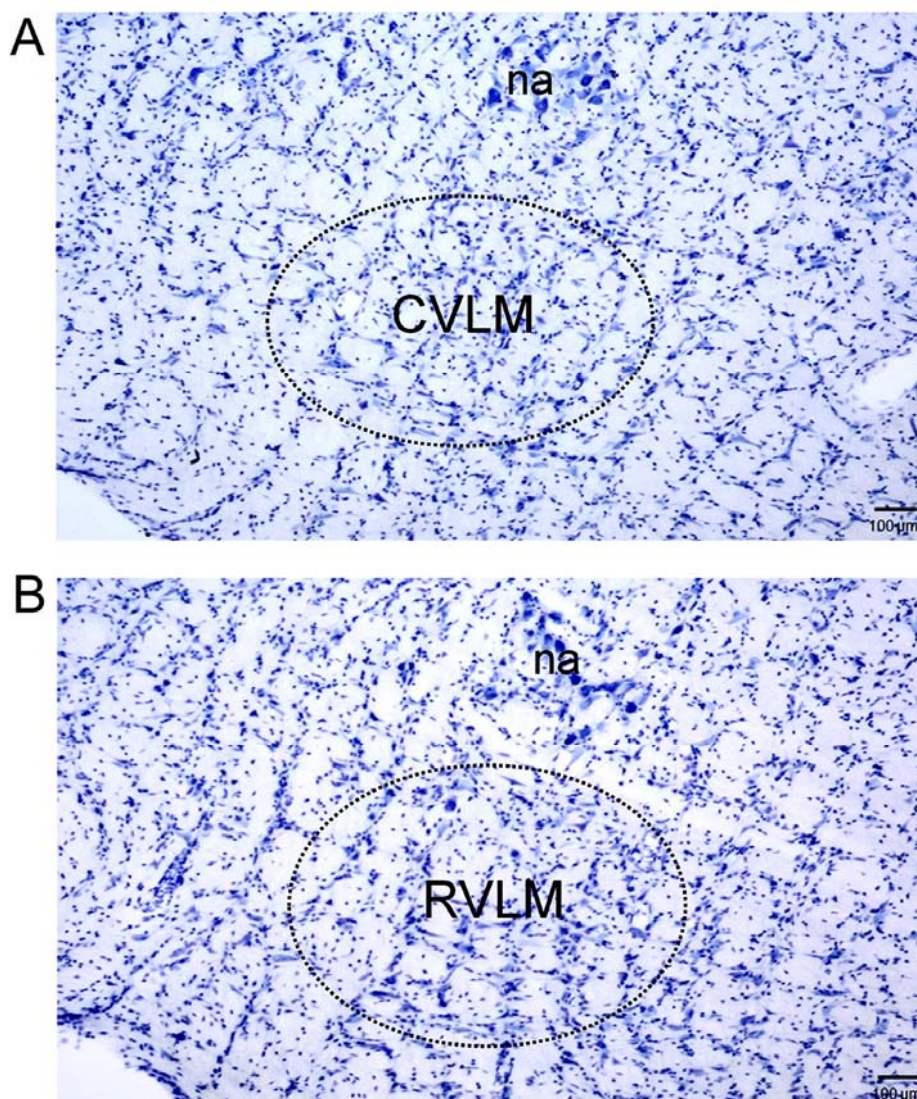


Figura 13. Coloração de Nissl de cortes representativos da porção ventrolateral do bulbo (VLM), de um rato controle sem estimulação elétrica do NDA. A: região caudal ventrolateral do bulbo (CVLM), B: região rostral ventrolateral do bulbo (RVLM). A linha pontilhada delimita esquematicamente a área estudada. na = núcleo ambíguo.

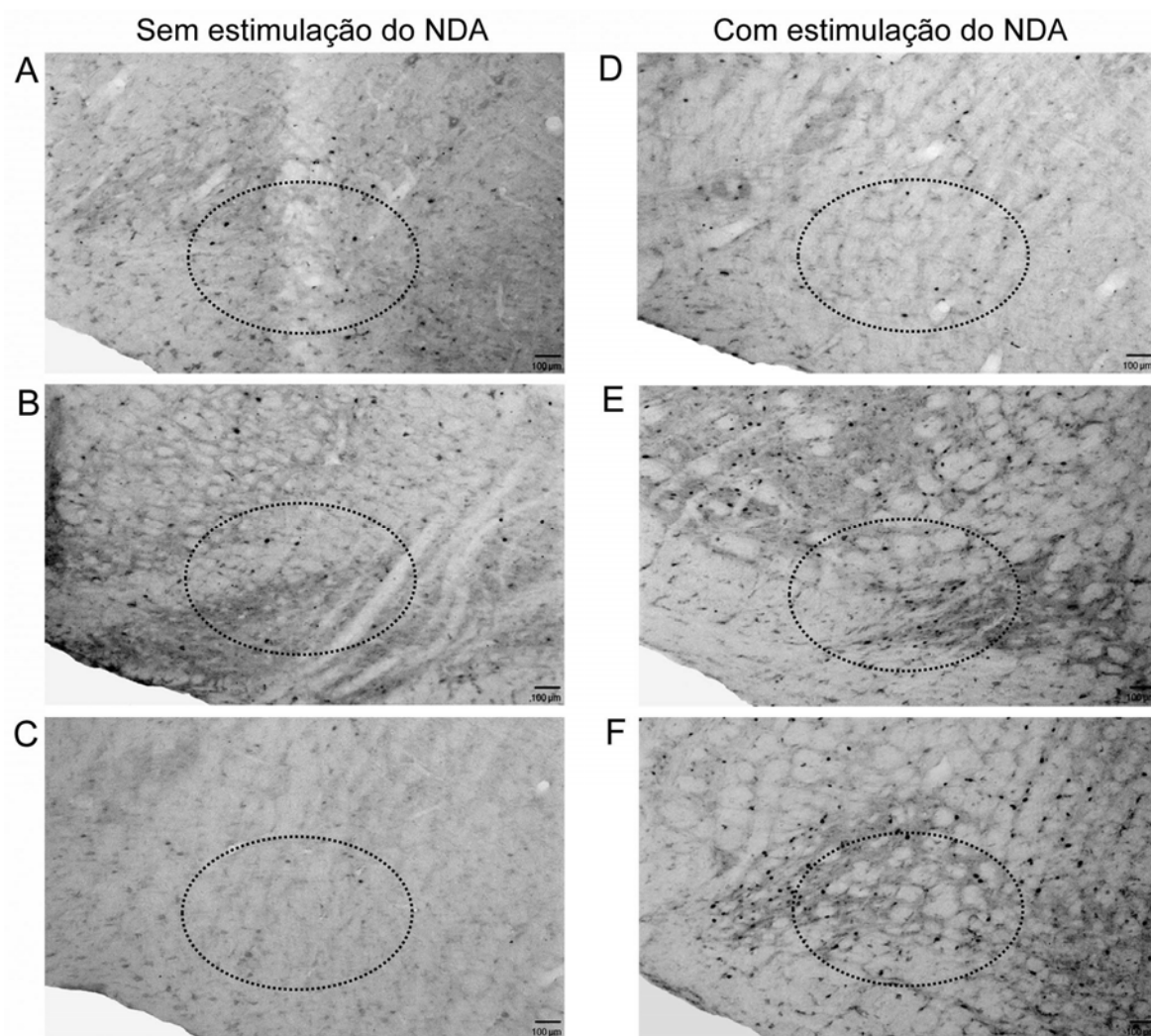


Figura 14. Expressão da proteína c-Fos nos neurônios do bulbo ventrolateral caudal (CVLM) de ratos controle (A e D), D-NAME (B e E) e hipertensos L-NAME (C e F). Os painéis à esquerda representam os animais sem estimulação do NDA (A, B e C), enquanto à direita representam os animais com estimulação elétrica do NDA (D, E e F). A linha pontilhada delimita esquematicamente a área estudada.

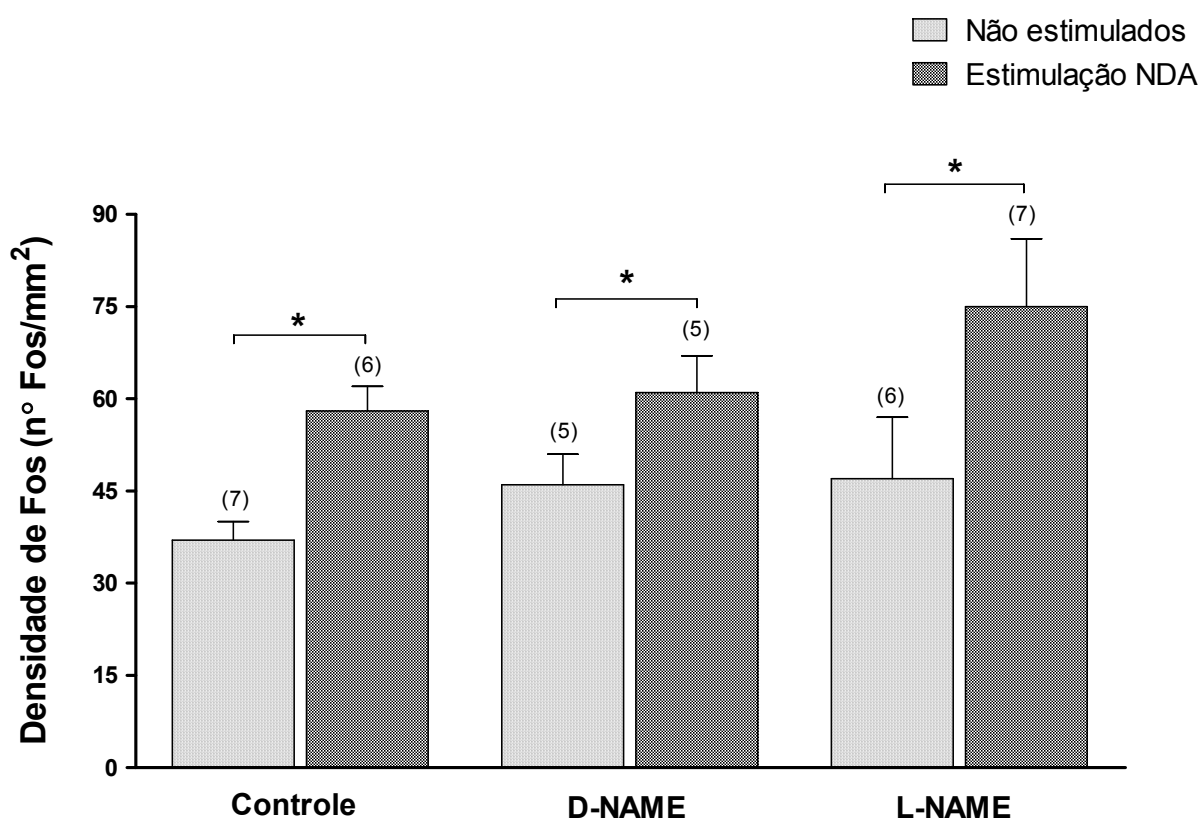


Figura 15. Densidade da proteína c-Fos nos neurônios do bulbo ventrolateral caudal (CVLM) de ratos submetidos à estimulação elétrica NDA e ratos não estimulados. Entre parênteses o número de animais (n). * $P \leq 0,05$ em relação aos ratos não estimulados.

Tabela 4. Densidade de c-Fos (Nº Fos/mm²) nos neurônios do bulbo ventrolateral caudal (CVLM) de ratos controle, D-NAME e hipertensos L-NAME submetidos, ou não, à estimulação elétrica do NDA.

	<u>Controle</u>	<u>D-NAME</u>	<u>L-NAME</u>
Não Estimulado	37 ± 3 (n=7)	46 ± 5 (n=5)	47 ± 10 (n=6)
Estimulado	58 ± 4* (n=6)	61 ± 6* (n=5)	75 ± 11* (n=7)

*P ≤ 0,05 em relação aos animais não estimulados.

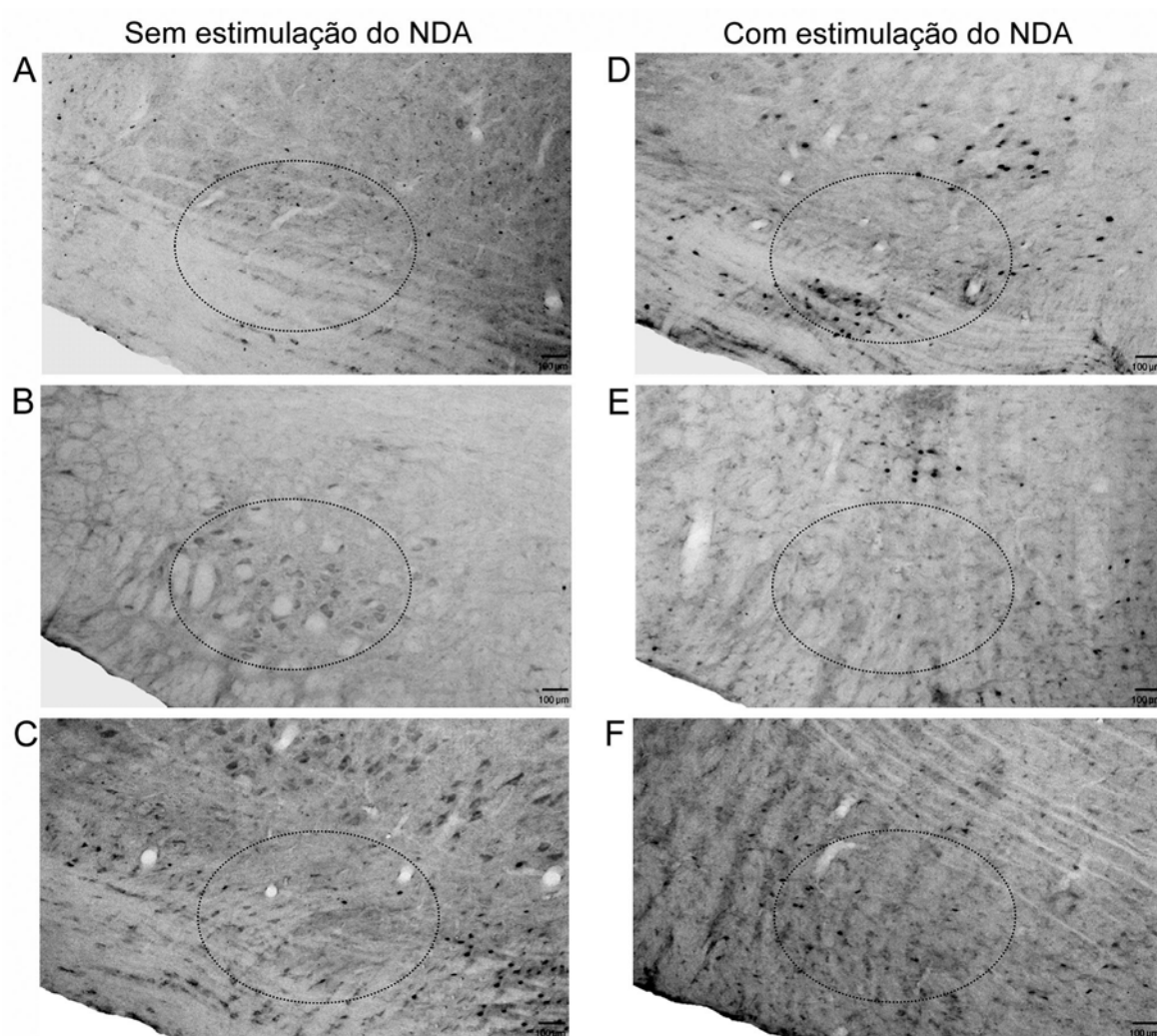


Figura 16. Expressão da proteína c-Fos nos neurônios do bulbo ventrolateral rostral (RVLM) de ratos controle (A e D), D-NAME (B e E) e hipertensos L-NAME (C e F). Os painéis à esquerda representam os animais sem estimulação do NDA (A, B e C), enquanto à direita representam os animais com estimulação elétrica do NDA (D, E e F). A linha pontilhada delimita esquematicamente a área estudada.

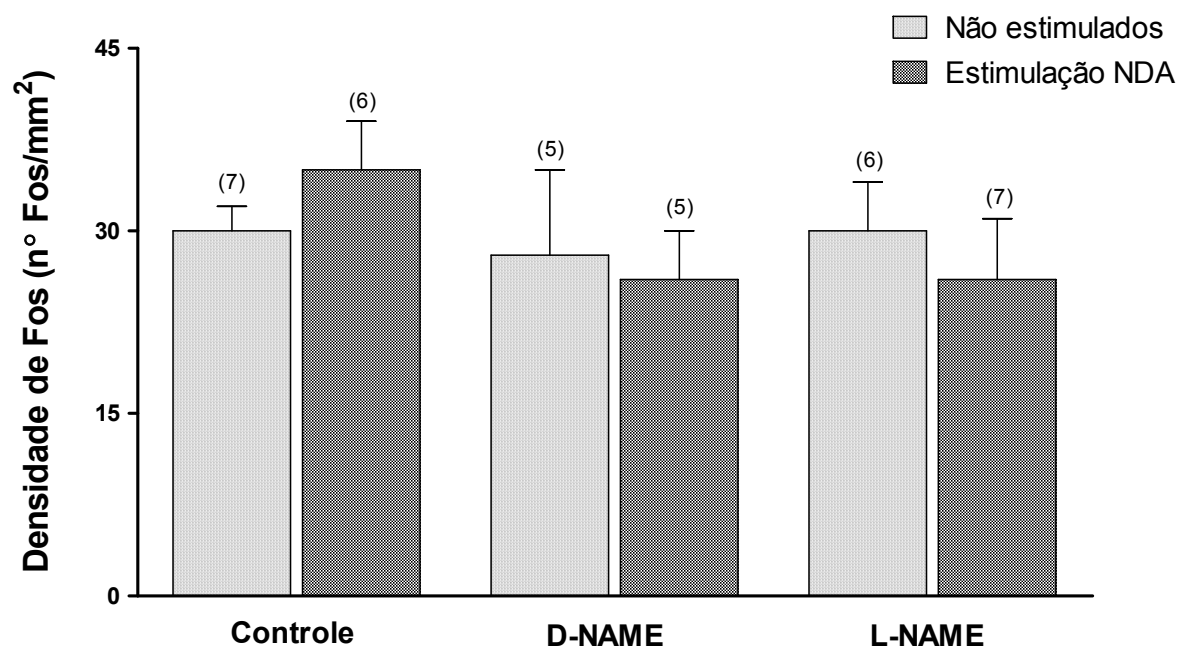


Figura 17. Densidade da proteína c-Fos nos neurônios do bulbo ventrolateral rostral (RVLM) de ratos submetidos à estimulação elétrica do NDA e ratos não estimulados. Entre parênteses o número de animais (n).

Tabela 5. Densidade de c-Fos (Nº Fos/mm²) nos neurônios do bulbo ventrolateral rostral (RVLM) de ratos controle, D-NAME e hipertensos L-NAME submetidos, ou não, à estimulação elétrica do NDA.

	<u>Controle</u>	<u>D-NAME</u>	<u>L-NAME</u>
Não Estimulado	30 ± 2 (n=7)	28 ± 7 (n=5)	30 ± 4 (n=6)
Estimulado	35 ± 4 (n=6)	26 ± 4 (n=5)	26 ± 5 (n=7)

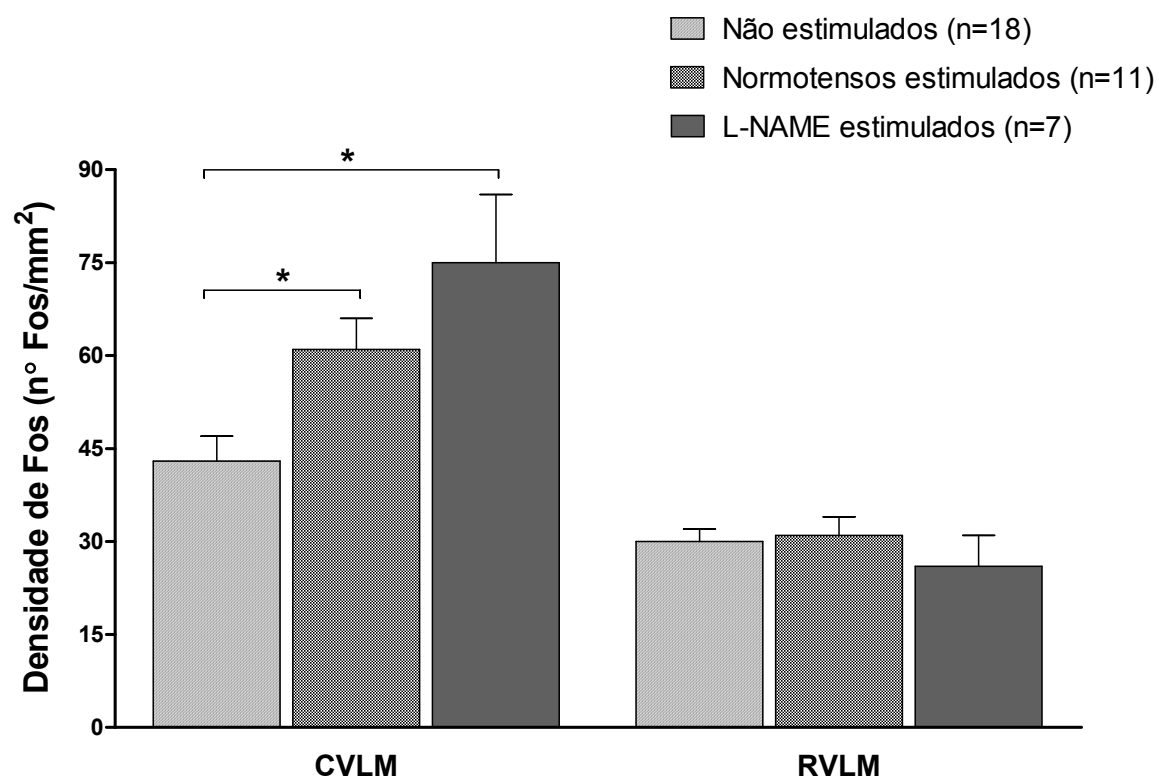


Figura 18. Densidade da proteína c-Fos nos neurônios do VLM (CVLM e RVLM) dos animais não estimulados (controle, D-NAME e L-NAME), normotensos estimulados (controle e D-NAME) e estimulados L-NAME. * $P \leq 0,05$.

Tabela 6. Densidade de c-Fos (Nº Fos/mm²) nos neurônios do CVLM e RVLM de ratos não estimulados (controle, D-NAME e hipertensos L-NAME), normotensos estimulados (controle e D-NAME) e L-NAME estimulados.

	<u>CVLM</u>	<u>RVLM</u>
Não estimulados (n=18)	43±4	30±2
Normotensos estimulados (n=11)	61±5*	31±3
L-NAME estimulados (n=7)	75±11*	26±5

*P ≤ 0,05 em relação aos animais não estimulados.

4.4. Expressão de c-Fos nos neurônios do núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN)

4.4.1. Expressão da proteína c-Fos nos neurônios parvocelulares do PVN

A figura 19 mostra a coloração de Nissl de cortes representativos da porção parvocelular do PVN de um rato controle não submetido à estimulação elétrica do NDA. A coloração de Nissl juntamente com o atlas de Paxinos e Watson (2008) foi utilizada para delimitar a área de interesse (linha pontilhada) para a mensuração da densidade de proteína c-Fos.

As figuras 20 e 21 ilustram respectivamente a expressão da proteína c-Fos no PVN parvocelular medial (PaMP) e PVN parvocelular posterior (PaPO), de ratos normotensos controle, D-NAME e hipertensos L-NAME submetidos, ou não, a estimulação elétrica do NDA. Não houve diferença na expressão da proteína c-Fos entre os ratos estimulados e não estimulados nos três grupos experimentais (Figuras 22 e 23).

A tabela 7 apresenta os valores da densidade de c-Fos no PVN parvocelular nos animais controle, D-NAME e hipertensos L-NAME submetidos, ou não, à estimulação elétrica do NDA.

4.4.1.2. Agrupamento dos dados de expressão de c-Fos nos neurônios do PVN parvocelular de animais submetidos, ou não, à estimulação elétrica do NDA

A figura 24 ilustra graficamente que houve maior expressão da proteína c-Fos apenas no PaPO nos animais hipertensos L-NAME estimulados quando comparados com os animais não estimulados (controle, D-NAME e L-NAME) e normotensos estimulados (controle e D-NAME). A tabela 8 sumariza as densidades de c-Fos após o agrupamento de dados no PVN parvocelular dos diferentes grupos de animais.

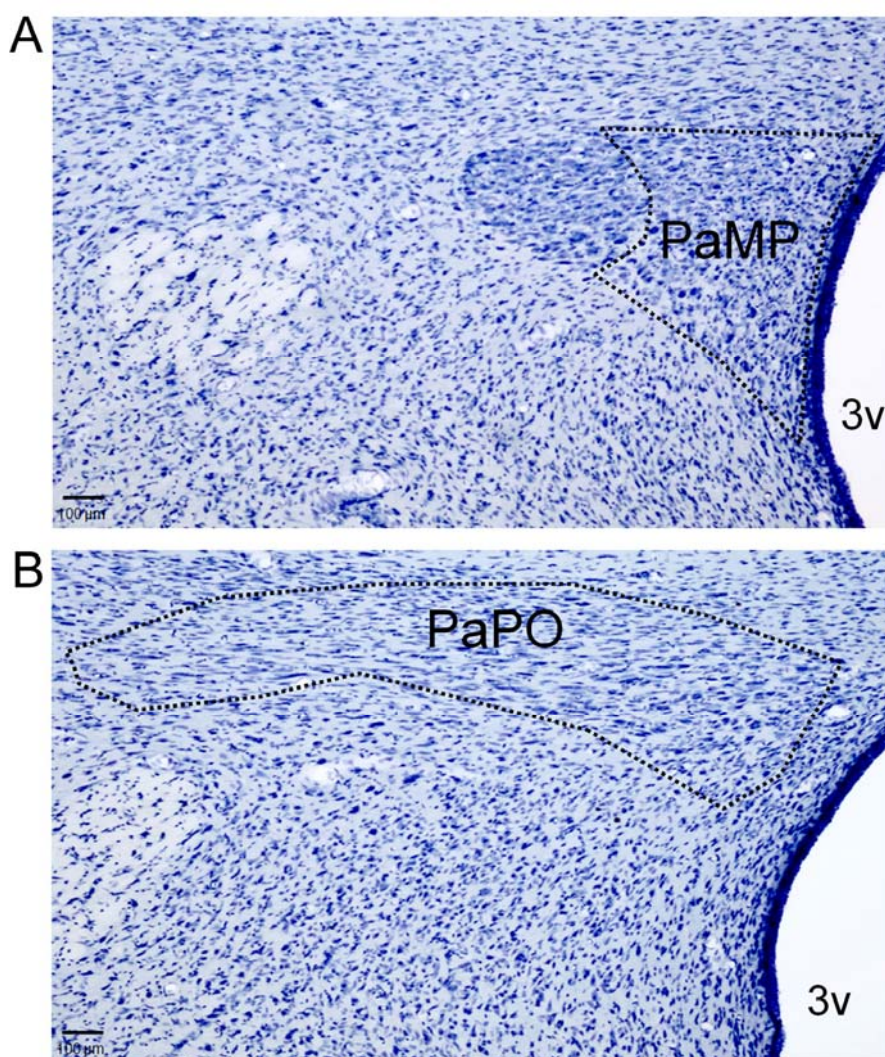


Figura 19. Coloração de Nissl de cortes representativos da porção parvocelular do PVN de um rato controle sem estimulação elétrica do NDA. A: PVN parvocelular medial (PaMP), B: PVN parvocelular posterior (PaPO). A linha pontilhada delimita esquematicamente a área estudada. 3v = terceiro ventrículo.

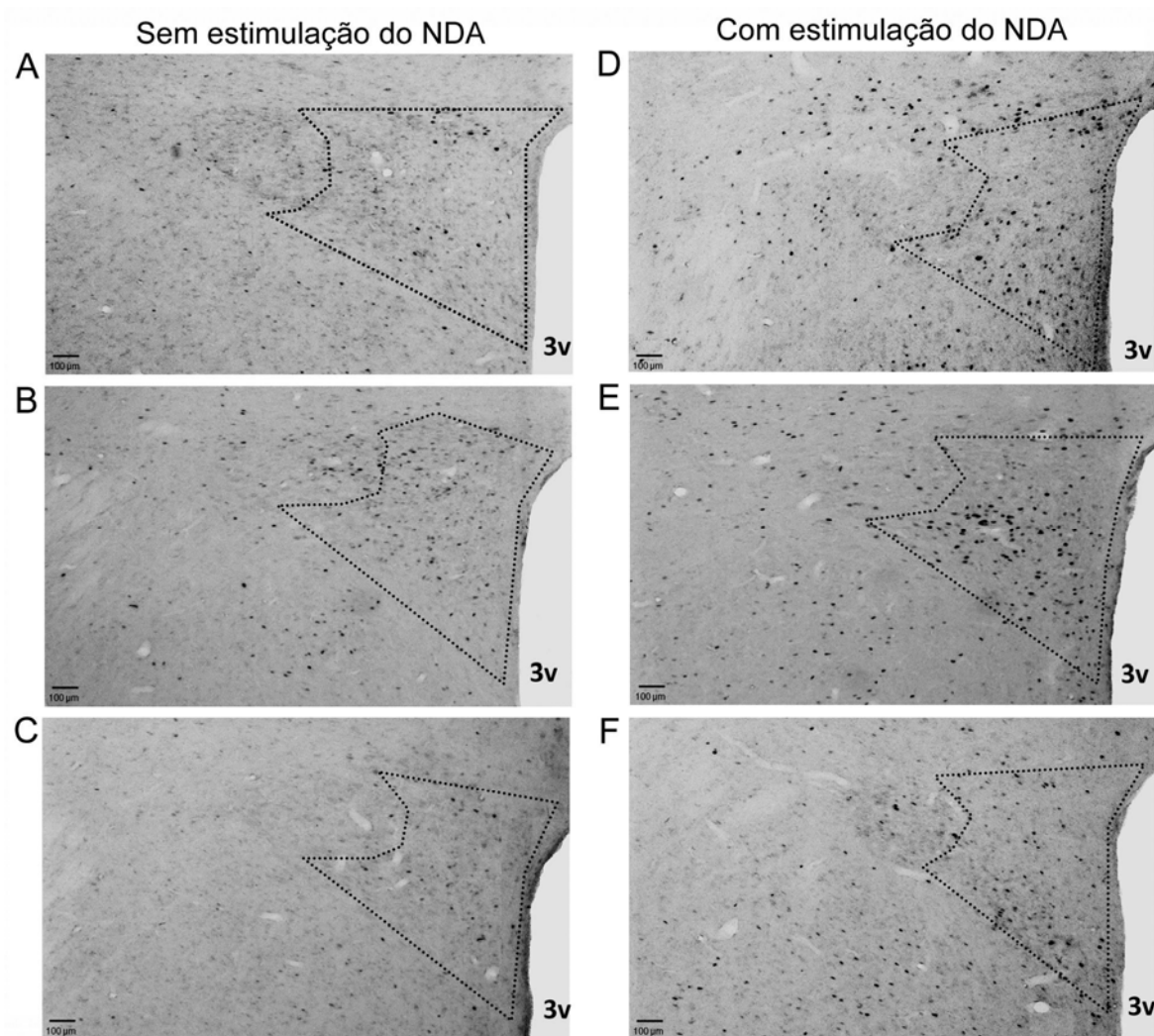


Figura 20. Expressão da proteína c-Fos nos neurônios do PVN parvocelular medial (PaMP) de ratos controle (A e D), D-NAME (B e E) e hipertensos L-NAME (C e F). Os painéis à esquerda representam os animais sem estimulação do NDA (A, B e C), enquanto à direita representam os animais com estimulação elétrica do NDA (D, E e F). A linha pontilhada delimita esquematicamente a área estudada. 3v = terceiro ventrículo.

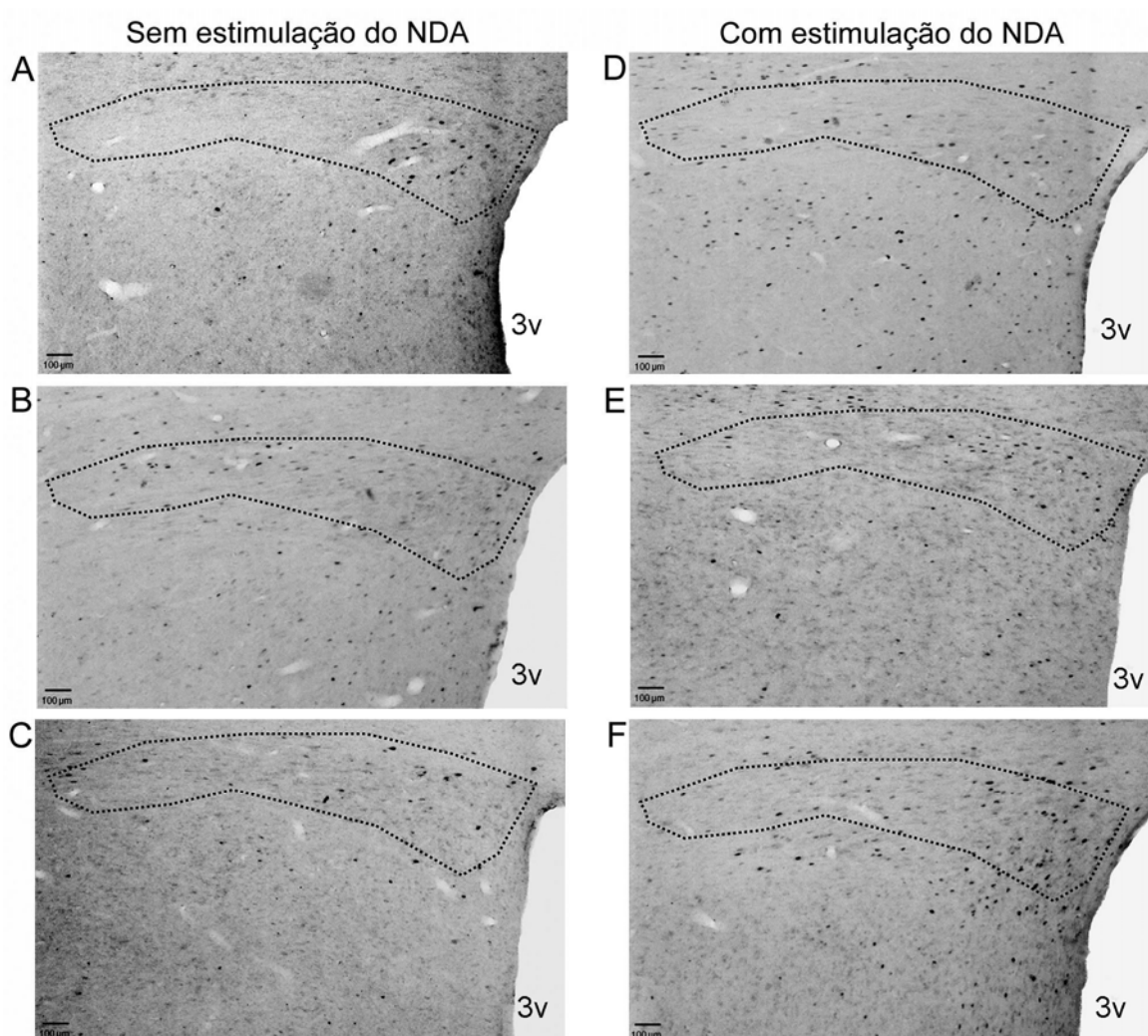


Figura 21. Expressão da proteína c-Fos nos neurônios do PVN parvocelular posterior (PaPO) de rato controle (A e D), D-NAME (B e E) e hipertensos L-NAME (C e F). Os painéis à esquerda representam os animais sem estimulação do NDA (A, B e C), enquanto à direita representam os animais com estimulação do NDA (D, E e F). A linha pontilhada delimita esquematicamente a área estudada. 3v = terceiro ventrículo.

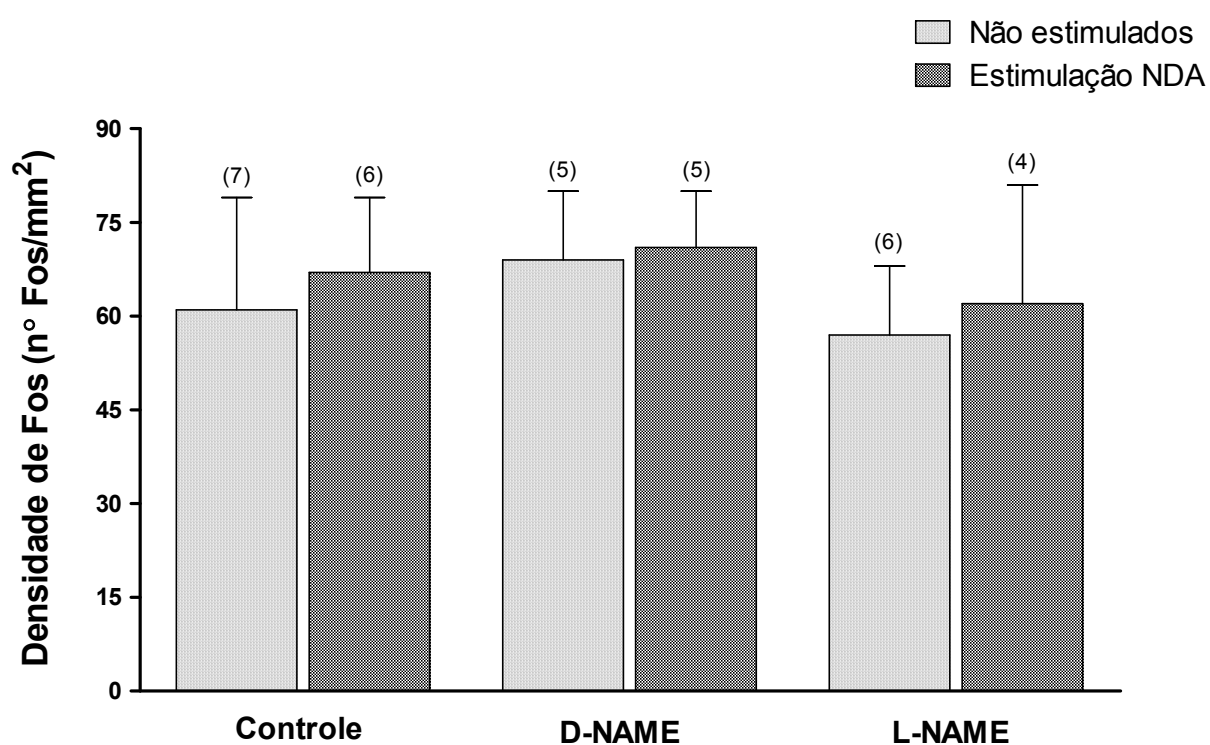


Figura 22. Densidade da proteína c-Fos nos neurônios do PVN parvocelular medial (PaMP) de ratos submetidos à estimulação elétrica do NDA e ratos não estimulados. Entre parênteses o número de animais (n).

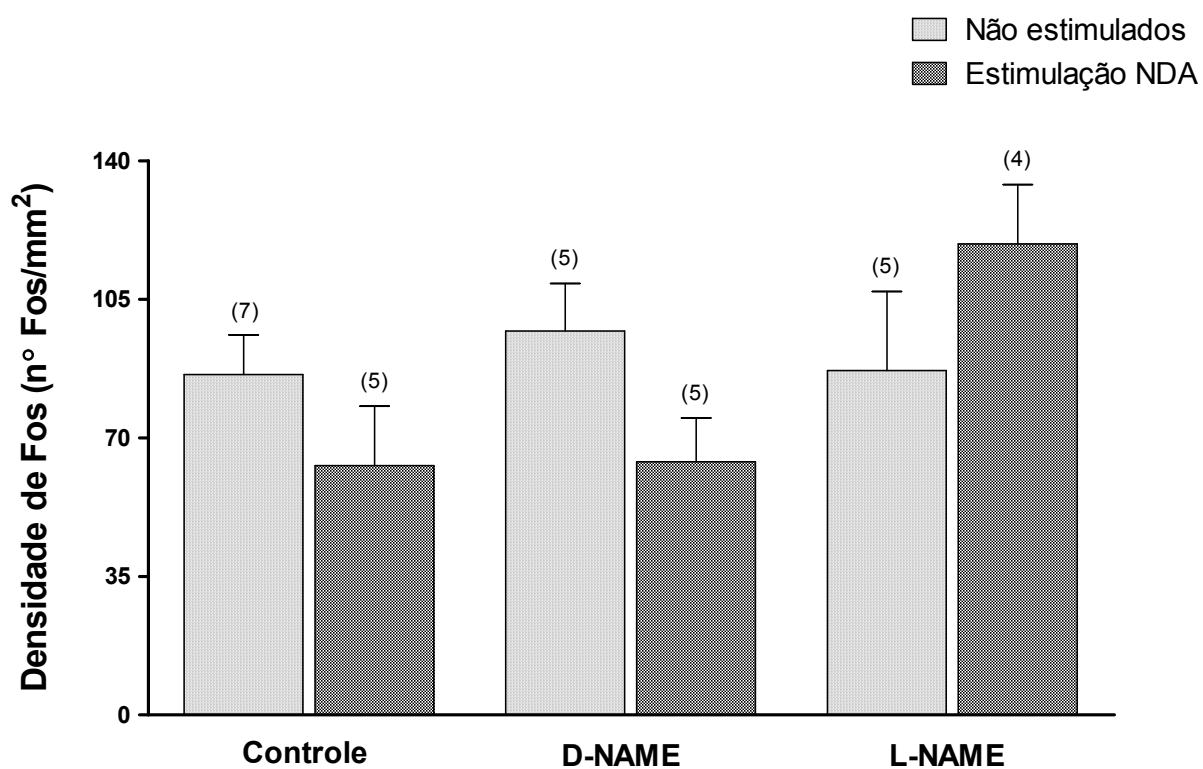


Figura 23. Densidade da proteína c-Fos nos neurônios do PVN parvocelular posterior (PaPO) de ratos submetidos à estimulação elétrica do NDA e ratos não estimulados. Entre parênteses o número de animais (n).

Tabela 7. Densidade de c-Fos (Nº Fos/mm²) nos neurônios do PVN parvocelular medial (PaMP) e parvocelular posterior (PaPO) de animais normotensos controle, normotensos D-NAME e hipertensos L-NAME submetidos, ou não, à estimulação elétrica do NDA.

	<u>PaMP</u>			<u>PaPO</u>		
	Controle	D-NAME	L-NAME	Controle	D-NAME	L-NAME
Não estimulado	61 ± 18 (n=7)	69 ± 11 (n=5)	57 ± 11 (n=6)	86 ± 10 (n=7)	97 ± 12 (n=5)	87 ± 20 (n=5)
Estimulado	67 ± 12 (n=6)	71 ± 9 (n=5)	62 ± 19 (n=4)	63 ± 15 (n=5)	64 ± 11 (n=5)	119 ± 15 (n=4)

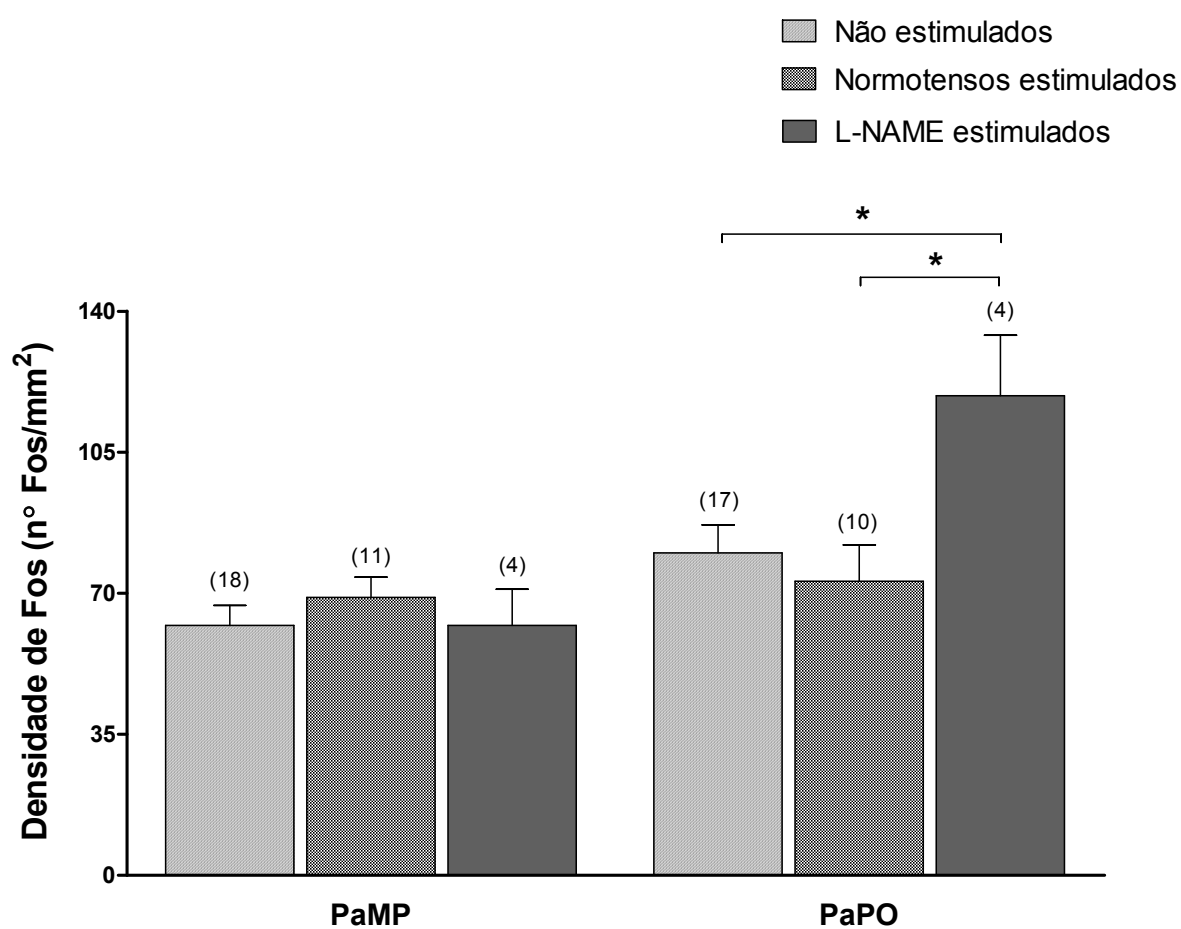


Figura 24. Densidade da proteína c-Fos nos neurônios do PVN parvocelular medial (PaMP) e parvocelular posterior (PaPO) dos animais não estimulados (controle, D-NAME e L-NAME), normotensos estimulados (controle e D-NAME) e estimulados L-NAME. Entre parênteses o número de animais (n). * $P \leq 0,05$.

Tabela 8. Densidade de c-Fos (Nº Fos/mm²) nos neurônios do PVN parvocelular medial (PaMP) e parvocelular posterior (PaPO) de ratos não estimulados (controle, D-NAME e hipertensos L-NAME), normotensos estimulados (controle e D-NAME) e L-NAME estimulados.

	<u>PaMP</u>	<u>PaPO</u>
Não estimulados	62±5 (n=18)	80±7 (n=17)
Normotensos estimulados	69±5 (n=11)	73±9 (n=10)
L-NAME estimulados	62±9 (n=4)	119±15*† (n=4)

P ≤ 0,05 em relação aos animais não estimulados (*) e normotensos estimulados (†).

4.4.2. Expressão da proteína c-Fos nos neurônios magnocelulares do PVN

A figura 25 mostra a coloração de Nissl de cortes representativos da porção magnocelular do PVN de um rato controle não submetido à estimulação elétrica do NDA. A coloração de Nissl juntamente com o atlas de Paxinos e Watson (2008) foi utilizada para delimitar a área de interesse (linha pontilhada) para a mensuração da densidade de proteína c-Fos.

As figuras 26, 27 e 28 ilustram respectivamente a expressão da proteína c-Fos no PVN magnocelular anterior (PaMA), medial (PaMM) e lateral (PaLM) de ratos controles, D-NAME e hipertensos L-NAME submetidos, ou não, à estimulação do NDA. Observa-se um aumento na densidade de c-Fos nas regiões PaMA e PaMM após a ativação do barorreflexo nos três grupos experimentais em relação aos ratos não estimulados (Figuras 29 e 30).

A tabela 9 sumariza os valores mensurados da densidade de proteína c-Fos obtidos nas diferentes subdivisões do PVN magnocelular nos animais controle, D-NAME e hipertensos L-NAME submetidos, ou não, à estimulação elétrica do NDA.

4.4.3. Agrupamento dos dados de expressão de c-Fos nos neurônios do PVN magnocelular de animais submetidos, ou não, à estimulação elétrica do NDA

A figura 31 mostra o aumento na expressão de c-Fos no PVN magnocelular anterior (PaMA) e medial (PaMM) nos animais estimulados (normotensos e L-NAME), comparados com os animais não estimulados (controle, D-NAME e L-NAME).

A tabela 10 sumariza as densidades de Fos após o agrupamento de dados, no PVN magnocelular dos grupos não estimulados (controle, D-NAME e L-NAME), normotensos estimulados (controle e D-NAME) e estimulados L-NAME.

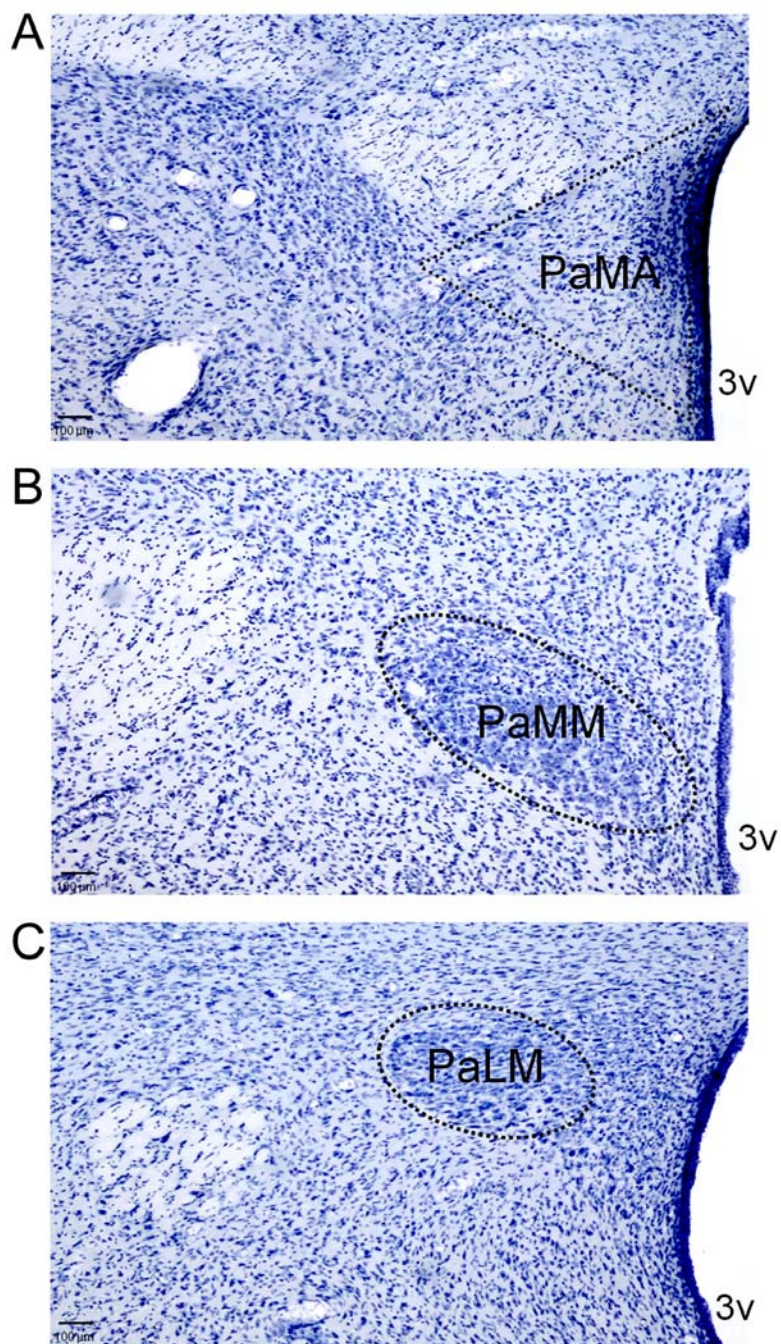


Figura 25. Coloração de Nissl de cortes representativos da porção magnocelular do PVN de um rato controle sem estimulação elétrica do NDA. A: PVN magnocelular anterior (PaMA), B: PVN magnocelular medial (PaMM) e C: PVN magnocelular lateral (PaLM). A linha pontilhada delimita esquematicamente a área estudada. 3v = terceiro ventrículo.

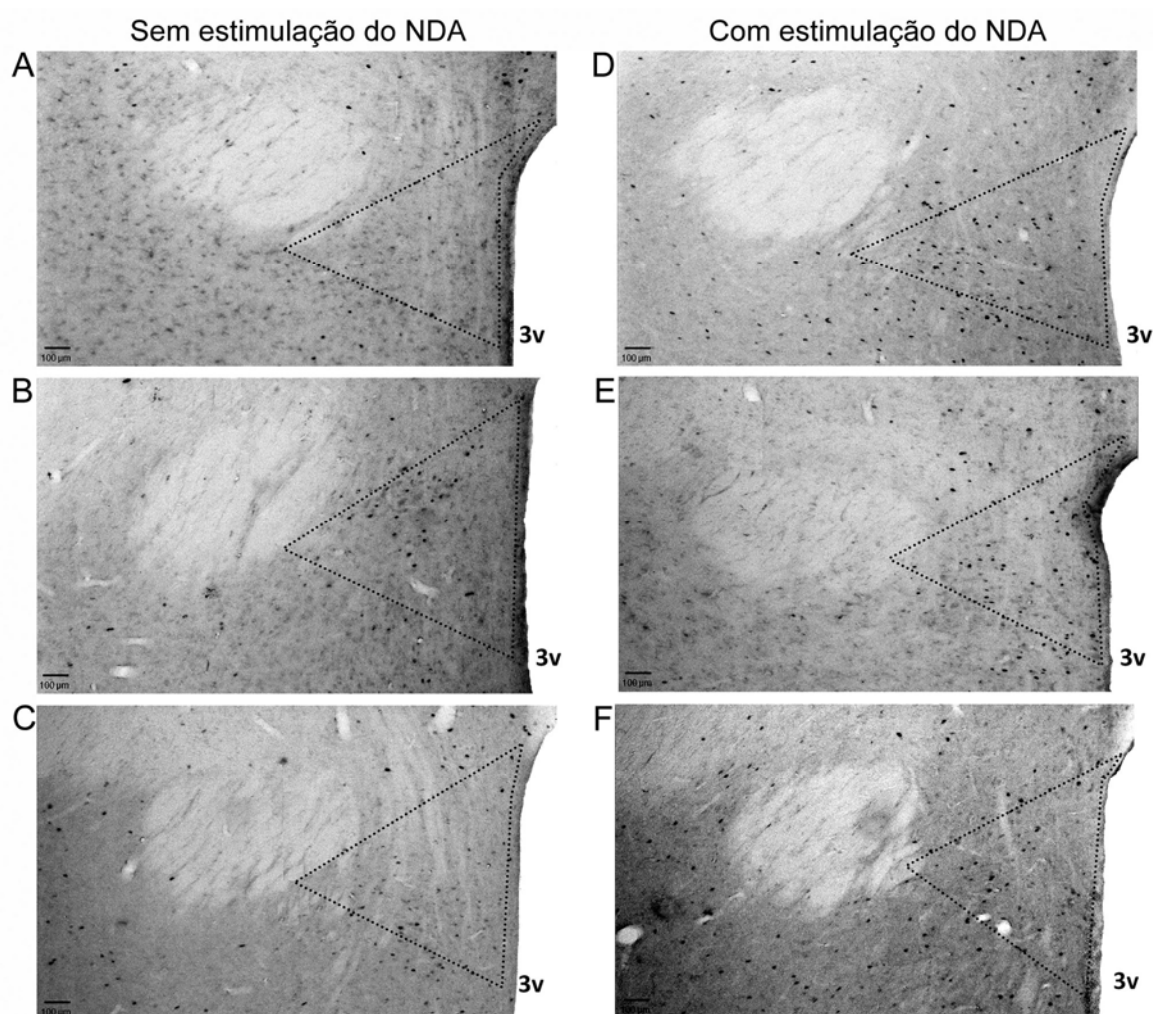


Figura 26. Expressão da proteína c-Fos nos neurônios do PVN magnocelular anterior (PaMA) de ratos controle (A e D), D-NAME (B e E) e hipertensos L-NAME (C e F). Os painéis à esquerda representam os animais sem estimulação do NDA (A, B e C), enquanto à direita representam os animais com estimulação elétrica do NDA (D, E e F). A linha pontilhada delimita esquematicamente a área estudada. 3v = terceiro ventrículo.

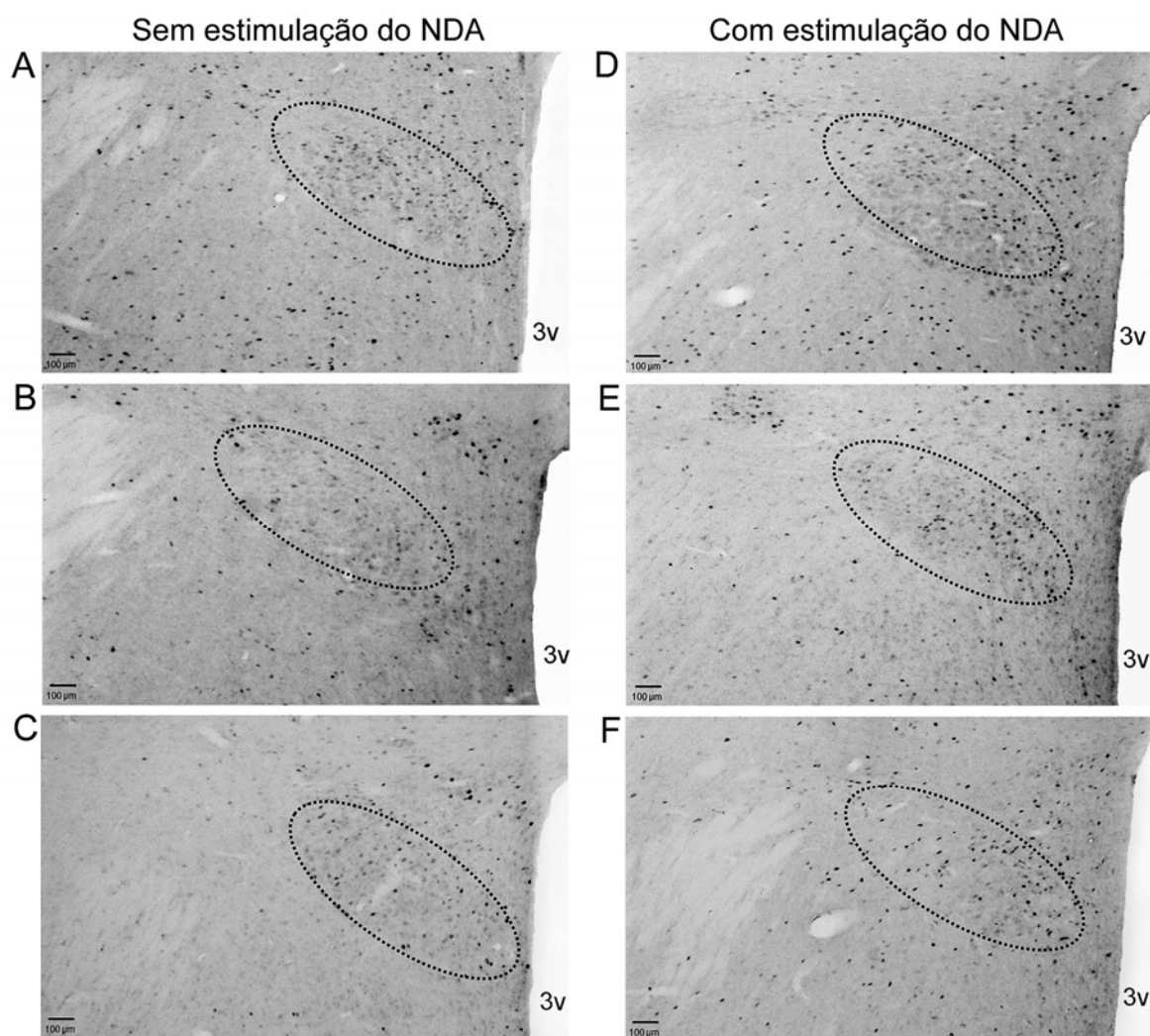


Figura 27. Expressão da proteína c-Fos nos neurônios do PVN magnocelular medial (PaMM) de ratos controle (A e D), D-NAME (B e E) e hipertensos L-NAME (C e F). Os painéis à esquerda representam os animais sem estimulação do NDA (A, B e C), enquanto à direita representam os animais com estimulação elétrica do NDA (D, E e F). A linha pontilhada delimita esquematicamente a área estudada. 3v = terceiro ventrículo.

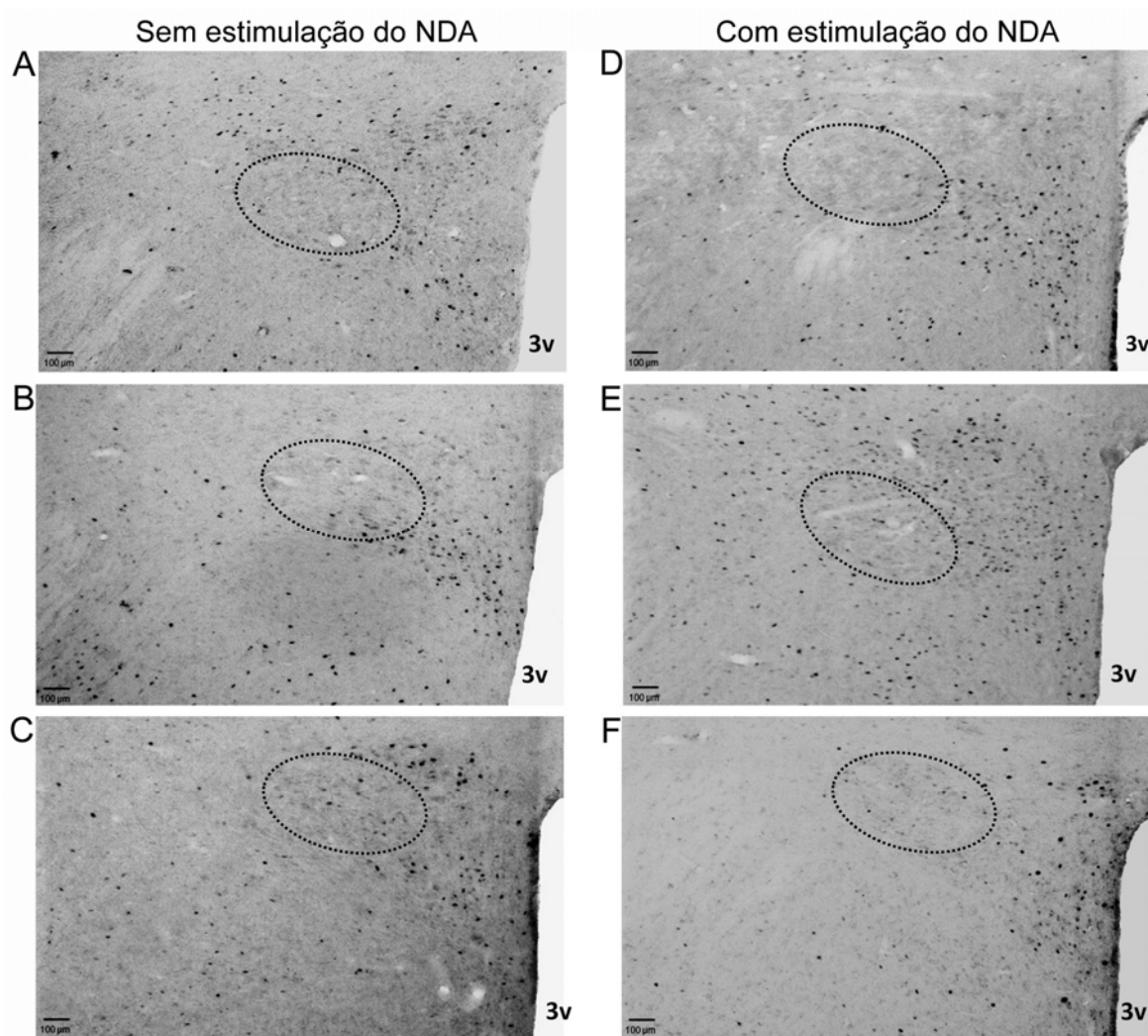


Figura 28. Expressão da proteína c-Fos nos neurônios do PVN magnocelular lateral (PaLM) de ratos controle (A e D), D-NAME (B e E) e hipertensos L-NAME (C e F). Os painéis à esquerda representam os animais sem estimulação do NDA (A, B e C), enquanto à direita representam os animais com estimulação elétrica do NDA (D, E e F). A linha pontilhada delimita esquematicamente a área estudada. 3v = terceiro ventrículo.

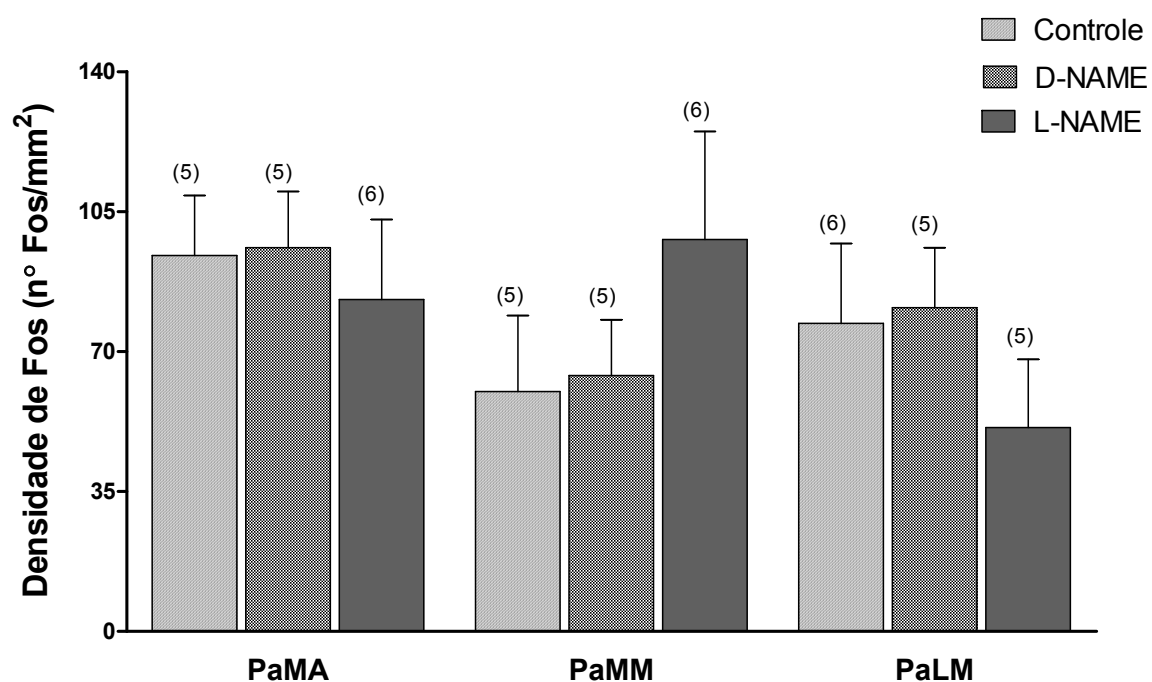


Figura 29. Densidade da proteína c-Fos nos neurônios do PVN magnocelular dos animais não submetidos ao protocolo de estimulação elétrica do NDA. PVN magnocelular anterior (PaMA), magnocelular medial (PaMM) e magnocelular lateral (PaLM). Entre parênteses o número de animais (n).

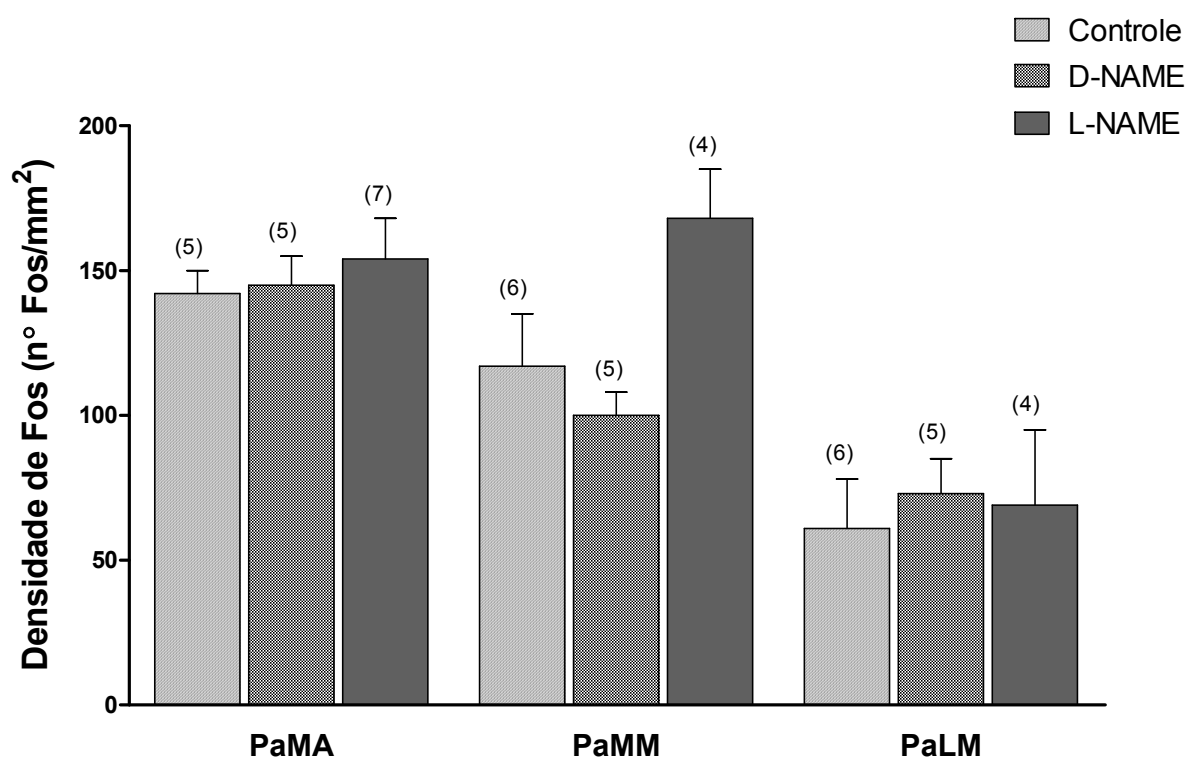


Figura 30. Densidade da proteína c-Fos nos neurônios do PVN magnocelular dos animais submetidos ao protocolo de estimulação elétrica do NDA. PVN magnocelular anterior (PaMA), magnocelular medial (PaMM) e magnocelular lateral (PaLM). Entre parênteses o número de animais (n).

Tabela 9. Densidade de c-Fos (Nº Fos/mm²) nos neurônios do PVN magnocelular anterior (PaMA), magnocelular medial (PaMM) e magnocelular lateral (PaLM) de animais normotensos controles, normotensos D-NAME e hipertensos L-NAME submetidos, ou não, à estimulação elétrica do NDA.

	<u>PaMA</u>			<u>PaMM</u>			<u>PaLM</u>		
	Controle	D-NAME	L-NAME	Controle	D-NAME	L-NAME	Controle	D-NAME	L-NAME
Não estimulado	94±15 (n=5)	96±14 (n=5)	83±20 (n=6)	60±19 (n=5)	64±14 (n=5)	98±27 (n=6)	77±20 (n=6)	81±15 (n=5)	51±17 (n=5)
Estimulado	142±8* (n=5)	145±10* (n=5)	154±14* (n=7)	117±18* (n=6)	100±8* (n=5)	168±17* (n=4)	61±17 (n=6)	73±12 (n=5)	69±26 (n=4)

*P ≤ 0,05 em relação aos animais não estimulados.

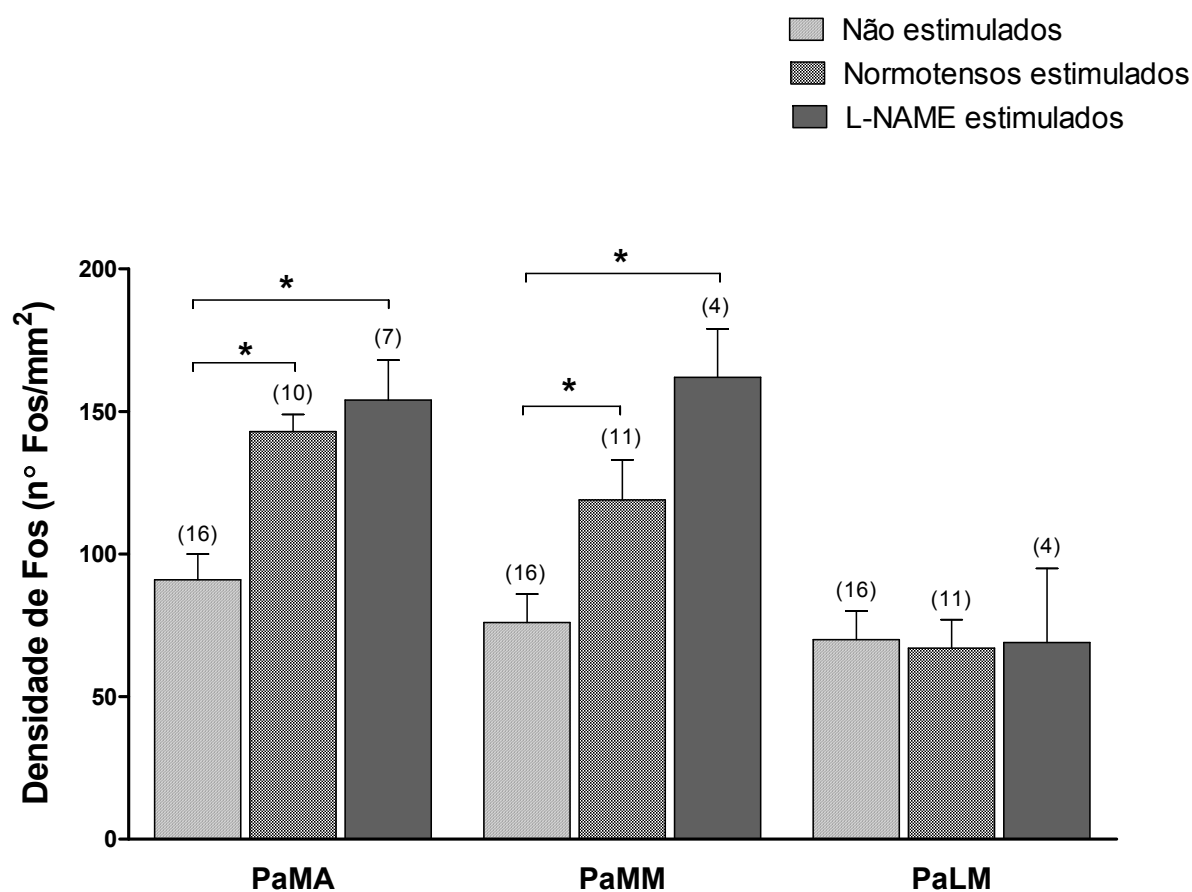
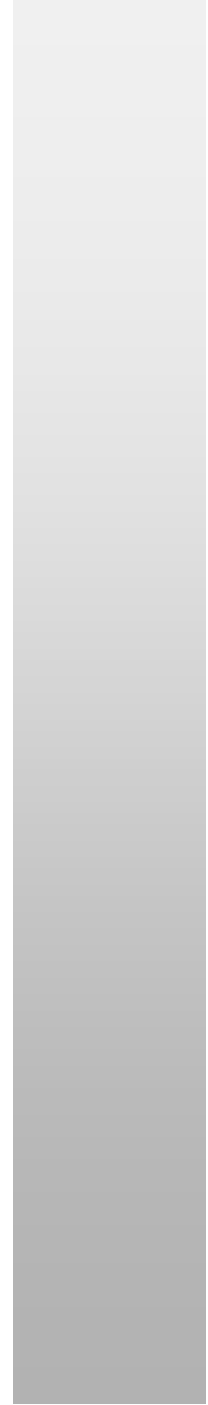


Figura 31. Densidade da proteína c-Fos nos neurônios do PVN magnocelular anterior (PaMA), medial (PaMM) e lateral (PaLM) dos animais não estimulados (controle, D-NAME e L-NAME), normotensos estimulados (controle e D-NAME) e estimulados L-NAME. Entre parênteses o número de animais (n). * $P \leq 0,05$.

Tabela 10. Densidade de c-Fos (Nº Fos/mm²) nos neurônios do PVN magnocelular anterior (PaMA), magnocelular medial (PaMM) e magnocelular lateral (PaLM) de ratos não estimulados (controle, D-NAME e hipertensos L-NAME), normotensos estimulados (controle e D-NAME) e L-NAME estimulados.

	<u>PaMA</u>	<u>PaMM</u>	<u>PaLM</u>
Não estimulados	91±9 (n=16)	76±10 (n=16)	70±10 (n=16)
Normotensos estimulados	143±6* (n=10)	119±14* (n=11)	67±10 (n=11)
L-NAME estimulados	154±14* (n=7)	162±17* (n=4)	69±26 (n=4)

*P ≤ 0,05 em relação aos animais não estimulados.



Discussão

Os resultados obtidos no presente estudo mostraram: 1) o tratamento com o inibidor não seletivo da NOS, L-NAME, induziu hipertensão arterial e taquicardia; 2) o protocolo de estimulação elétrica do NDA de ratos acordados normotensos (controle e tratados com o isômero inativo D-NAME) e hipertensos L-NAME induziu quedas semelhantes da PA e FC ao longo dos 20 minutos de estimulação; 3) a estimulação do NDA de ratos normotensos (controles e D-NAME) e hipertensos L-NAME aumentou a expressão da proteína c-Fos nas regiões intermediária (NTSi) e comissural caudal (NTSc) do NTS, e esse aumento foi mais expressivo nos ratos hipertensos L-NAME; 4) a estimulação do NDA de ratos normotensos (controles e D-NAME) e hipertensos L-NAME aumentou a expressão da proteína c-Fos no CVLM; 5) a estimulação do NDA de ratos normotensos (controles e D-NAME) e hipertensos L-NAME aumentou a expressão da proteína c-Fos nas porções anterior (PaMA) e medial (PaMM) do PVN magnocelular dos animais normotensos e hipertensos L-NAME; 6) a estimulação do NDA aumentou a expressão da proteína c-Fos na porção posterior (PaPO) do PVN parvocelular somente nos ratos hipertensos L-NAME.

5.1. Caracterização do modelo de hipertensão arterial induzida pelo L-NAME

O NO possui um importante papel na regulação da PA, atuando tanto periféricamente no endotélio vascular, como centralmente modulando a atividade do sistema autonômico simpático (Moncada, 1997). A produção de NO pode ser inibida competitivamente pela ação de análogos da L-arginina, tais como o L-NAME (N^{ω} -nitro-L-arginine methyl ester) ou L-NMMA (N^{ω} -monomethyl-L-arginine), causando hipertensão arterial (Ribeiro e cols., 1992; Ward e Angus, 1993).

No presente estudo, a administração do inibidor não seletivo da NOS, L-NAME, dissolvido na água de beber durante 14 dias, induziu hipertensão arterial e taquicardia. Há na literatura vários estudos onde o efeito hipertensor do L-NAME foi observado após diversos períodos de tempo: 2 meses (Baylis e cols., 1997), 7 dias (Gardiner e cols., 1992), e até mesmo com 1 dia de tratamento (Persson e cols., 1992). As causas do aumento da PA ainda não são totalmente esclarecidas, embora este aumento da PA seja atribuído a diversos fatores como bloqueio da síntese de NO pelo endotélio vascular, disfunção do sistema renina-angiotensina, mecanismos volume-dependentes, e participação do sistema nervoso autonômico simpático, uma vez que o L-NAME atravessa a barreira hematoencefálica (Iadecola e cols., 1994; Moncada, 1997). O efeito taquicárdico obtido no presente estudo, após o tratamento com L-NAME, foi similar ao obtido por Salgado e cols. (2008), também com 14 dias de tratamento, Bergamaschi e cols. (1999) e Souza e cols. (2001), ambos após sete dias de tratamento. Entretanto, outros estudos observaram bradicardia após a administração oral do L-NAME (Scrogin e cols., 1994; 1998), ou até mesmo, inalteração da FC após o tratamento com L-NAME durante 14 dias (Santos, 2009). Essas discrepâncias podem estar relacionadas com a duração do tratamento (dias, semanas ou meses), à dose (maior ou menor que 70 mg/kg), ao ainda, à espécie estudada (rato, cão ou coelho).

5.2. Eficácia da ativação do barorreflexo pela estimulação elétrica do NDA

No presente estudo utilizou-se a técnica de estimulação elétrica do NDA no rato acordado para ativar as vias neurais do mecanismo barorreflexo, a fim de se examinar, sem o efeito indesejável da anestesia, a distribuição da proteína c-Fos, caracterizando essas vias em animais normotensos (controle e D-NAME) e no

modelo de hipertensão arterial induzida pelo L-NAME. A estimulação elétrica se mostrou eficaz em ativar o barorreflexo, e foram observadas quedas semelhantes da PAM e FC nos animais normotensos (controle e D-NAME) e hipertensos L-NAME. Esses achados estão de acordo com estudos clássicos que mostraram que a ativação barorreflexa produz inibição das descargas simpáticas, aumento da atividade parassimpática, e subsequente queda da PA e FC (Abboud e cols. 1976; Kirchheim, 1976; Krieger e cols. 1982). Estudos do nosso laboratório, realizados em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e, também, no modelo de hipertensão arterial induzida por L-NAME, mostraram maiores quedas de PAM e FC nos animais hipertensos (SHR e L-NAME), em relação aos animais normotensos, quando submetidos à estimulação elétrica do NDA (Salgado e cols., 2007; 2008). Nesses estudos, a estimulação elétrica do NDA foi feita com várias frequências de estimulação, e com tempo de passagem de corrente pelo estimulador de 20 segundos, o que justifica as maiores quedas da PAM e FC nos animais hipertensos quando comparados às quedas observadas no presente estudo (Salgado e cols., 2008). Vale lembrar que no presente estudo a estimulação do NDA foi intermitente, ou seja, o estimulador permaneceu ligado durante 5 segundos, seguido de 10 segundos onde o estimulador permaneceu desligado. A estimulação elétrica intermitente foi utilizada para não lesar o NDA, uma vez que a estimulação foi prolongada, durante 20 minutos, a fim de induzir a expressão da proteína c-Fos. Nos trabalhos realizados em nosso laboratório, embora fossem utilizadas diversas frequências de estimulação, a duração das mesmas foi de 20 segundos (Salgado e cols., 2007; 2008). Como será discutido adiante, o protocolo de estimulação elétrica intermitente, durante 20 minutos, foi eficaz em induzir a expressão de proteína c-Fos em diversas áreas do SNC.

5.3. Expressão da proteína c-Fos decorrente da estimulação elétrica do NDA

A detecção da proteína c-Fos é uma importante ferramenta utilizada para o mapeamento da atividade neuronal (Dragunow e cols., 1989; Morgan e Curran, 1989, 1991, 1995; Chan e cols., 1998). No presente estudo foi utilizada a análise da expressão da proteína c-Fos como indicador indireto da atividade neuronal nos sítios neurais responsáveis pela modulação do reflexo barorreceptor (NTS, VLM e PVN), em animais normotensos (controle e D-NAME) e no modelo de hipertensão arterial induzida pelo L-NAME.

5.3.1. Importância do uso de animais não anestesiados

No presente estudo observou-se que a anestesia e os procedimentos cirúrgicos de cateterização e implantação do eletrodo bipolar de estimulação no NDA não causaram expressão significativa da proteína c-Fos nas diferentes regiões do NTS, VLM e PVN. Observou-se, ainda, que o aumento na densidade de c-Fos nessas regiões foi devido, exclusivamente, à estimulação elétrica do NDA. Os experimentos foram realizados aos pares, onde um animal teve estimulado eletricamente o barorreflexo, e outro não recebeu a estimulação do NDA. Dessa forma garantiu-se que os animais fossem expostos às mesmas condições experimentais, diferindo, apenas, quanto à estimulação elétrica do NDA.

Vários trabalhos procuraram demonstrar o aumento nos níveis de c-Fos frente aos mais variados estímulos, incluindo o estresse de imobilização, estresse térmico, inflamação, hemorragia, variações da pressão osmótica, estimulação elétrica do nervo do seio carotídeo, ou do NDA (Hunt e cols., 1987; Ceccatelli e cols., 1989; Erickson e Millhorn, 1991). Entretanto, esses estudos foram

realizados em animais anestesiados. Há na literatura forte evidência de que a presença de anestésicos e/ou o emprego de drogas vasoativas influenciam de maneira substancial a expressão da proteína c-Fos. Em nosso estudo, os animais permaneceram acordados durante a realização dos protocolos experimentais, sendo que o anestésico tiopental sódico (i.p) foi administrado no dia anterior ao experimento, durante os procedimentos cirúrgicos.

Takayama e cols. (1994) compararam a capacidade de vários anestésicos em expressar a proteína c-Fos, e analisou essa expressão em diferentes áreas do tronco encefálico, hipotálamo e telencéfalo. Dentre os anestésicos estudados a uretana induziu o maior número de neurônios a expressar c-Fos, em todos os segmentos analisados, enquanto que a combinação fentanil/midazolam induziu um menor número de neurônios a expressar c-Fos. Ao se analisar os efeitos de anestésicos como a uretana, o hidrato de cloral e a combinação quetamina/xilazina, Rocha e Herbert (1997) mostraram uma menor capacidade da mistura quetamina/xilazina em expressar a proteína c-Fos indicando ser este o melhor anestésico nesse tipo de estudo. Além do anestésico, as drogas utilizadas para desencadear o barorreflexo como a fenilefrina e o nitroprussiato de sódio podem induzir modificações na resposta barorreflexa, seja atuando em seus componentes periféricos (terminações barorreceptoras) ou centrais, por meio da interação com outras vias neuronais (Dampney e cols., 1995).

Assim, no presente estudo, a expressão da proteína c-Fos obtida se deve, exclusivamente, à estimulação elétrica do NDA, uma vez que durante a realização dos protocolos experimentais os ratos normotensos (controle e D-NAME) e hipertensos L-NAME permaneceram acordados, livres do efeito indesejado da anestesia.

5.3.2. Critério para o agrupamento dos resultados

Como apenas o tratamento com L-NAME, sem a estimulação do NDA, não provocou aumento da expressão da proteína c-Fos em nenhuma das regiões estudadas, os resultados obtidos com os animais não estimulados (controle, D-NAME e L-NAME) foram agrupados e comparados com os animais normotensos estimulados (controle e D-NAME) e hipertensos L-NAME estimulados. Isso por quê pretendeu-se comparar o efeito da estimulação elétrica, independente dos níveis basais de PA, os quais, como demonstrado, não afetaram a referida expressão. Dessa forma, após o agrupamento, foram obtidos resultados em que os diferentes níveis de PA dos animais não foram considerados, mostrando de forma mais clara o efeito da estimulação elétrica do NDA sobre a expressão da proteína c-Fos nos animais normotensos (controle e D-NAME) e hipertensos L-NAME.

5.3.3. Expressão de c-Fos nos neurônios do NTS

Inúmeros trabalhos demonstraram que a primeira sinapse do barorreflexo ocorre no NTS (Doba e Reis, 1973; Palkovits e Zarborszky, 1977), principalmente em sua porção medial e comissural caudal (Spyer, 1990). Chan e cols. (2000) confirmaram a correta localização das aferências barorreceptoras no NTS ao realizar a desnervação sino-aórtica (remoção dos nervos de Hering e depressor aórtico), evidenciando uma queda de 90% na expressão da proteína c-FOS no NTSi e NTSc após estimular o barorreflexo com fenilefrina (i.v) em ratos não anestesiados.

No presente estudo, a estimulação elétrica do NDA levou ao aumento na expressão da proteína c-Fos no NTSi e NTSc nos animais controles, D-NAME e

hipertensos L-NAME. A estimulação do NDA não aumentou a densidade de c-Fos no NTSr de ratos normotensos (controle e D-NAME) bem como nos hipertensos L-NAME, fato este já esperado uma vez que a porção rostral do NTS relaciona-se com o sistema gastrointestinal, integrando principalmente o controle da ingestão alimentar (Zittel e cols., 1999). Durante uma refeição, a estimulação orofaríngea e esofágica, além da distensão gástrica causada pela alimentação, ativa os neurônios do NTS (Fraser e cols., 1995). O aumento na expressão de c-Fos na porção intermediária (NTSi) e comissural caudal do NTS (NTSc) corrobora os resultados obtidos por McKittrick e cols. (1992), os quais encontraram um aumento da expressão de c-Fos em diversas regiões bulbares (NTS, CVLM, NA e formação reticular), no PVN, SON, OVLT e amígdala, após estimular eletricamente o NDA de ratos normotensos anestesiados (25-40Hz, 0,5ms de duração de pulso, 10-150 μ A). Vale ressaltar que esta estimulação também foi do tipo intermitente (11s de estimulador ligado com intervalos de 6s de estimulador desligado, em um período de 1 hora). Em outro estudo, Erickson e Milhorn (1991) compararam a expressão da proteína c-Fos entre ratos anestesiados submetidos à estimulação elétrica do nervo do seio carotídeo (estimulo barorreceptor) e ratos acordados submetido à hipóxia (estimulo quimiorreceptor). Estes autores observaram um aumento significativo na expressão de c-Fos nos animais estimulados, sob anestesia, em todas as regiões analisadas, ou seja, NTS, VLM, AP e núcleo pálido da rafe. Foi observado, ainda, que o aumento da expressão da proteína c-Fos foi maior nos animais anestesiados, o que mostrou a influência do anestésico utilizado (combinação de cloralose/uretana) em expressar c-Fos (Erickson e Milhorn, 1991).

No presente estudo, entre os animais com estimulação do NDA, os hipertensos L-NAME foram os que o apresentaram maior aumento na densidade da proteína c-Fos. Pelo fato do L-NAME ser um bloqueador inespecífico da NOS, a maior ativação neuronal no NTS dos ratos hipertensos pode ser explicada pela ação excitatória do NO sobre interneurônios GABAérgicos bulbares, aumentando a ação desses sobre os neurônios que medeiam a atividade barorreflexa no NTS. O NO seria sintetizado a partir da interação da angiotensina II com seu receptor AT1 presente no endotélio vascular bulbar, o qual ativaria a eNOS ali presente (Kasparov e Paton, 1999; Paton e Kasparov, 2001; Paton e cols., 2001). Por outro lado, Chan e cols. (2003) obtiveram, em ratos anestesiados, uma queda na expressão de c-Fos no NTS, com estimulação barorreflexa pelo aumento da PA, mantida por 30 minutos, com fenilefrina (i.v), após a microinjeção bilateral de 7-nitroindazol (7-NI), um inibidor específico da NOS neural (nNOS); ou, ainda, na presença do inibidor da guanilato ciclase solúvel (GCs), o que mostrou que a expressão de c-Fos no NTS possui uma regulação via GMPc e proteínas de ligação do DNA ao AMPc (*CREB*). Em outro estudo, Cheng-Dean e cols. (1996) observaram melhora na sensibilidade barorreflexa de ratos normotensos anestesiados ao inibir a expressão do gene c-fos no NTSc. De acordo com os autores, a expressão do gene c-fos representaria o primeiro passo, dentre uma série de eventos intracelulares, que poderiam induzir à síntese de neurotransmissores e/ou neuropeptídeos capazes de atenuar a sensibilidade barorreflexa a longo prazo (Cheng-Dean e cols., 1996). Assim, no presente estudo, o aumento na densidade da proteína c-Fos no NTS dos animais hipertensos L-NAME sugere uma menor inibição, mediada pelo NO, dos interneurônios GABAérgicos bulbares que agem sobre os neurônios que medeiam a atividade barorreflexa no NTS.

5.3.4. Expressão de c-Fos nos neurônios do VLM

Sabe-se que a região rostral do VLM (RVLM) atua como área pressora responsável pelo aumento da pressão arterial (Sun e cols., 1988). Por outro lado, está bem estabelecido que a região caudal ventrolateral do bulbo (CVLM) corresponde a uma área depressora atuando, diretamente, sobre a região RVLM por meio de neurônios inibitórios GABAérgicos, resultando na resposta hipotensora do barorreflexo (Abboud e cols., 1976).

A estimulação elétrica do NDA aumentou, de forma semelhante, a expressão da proteína c-Fos no CVLM dos ratos normotensos (controle e D-NAME) e hipertensos L-NAME. Esse fato está de acordo com o esperado uma vez que a ativação do barorreflexo promove a inibição da via simpática, por meio da ativação das projeções do NTS para o CVLM e deste para o RVLM. Quando ativados os neurônios do CVLM exercem uma ação inibitória sobre os neurônios do RVLM, responsáveis pela atividade simpática eferente, diminuindo a frequência de despolarização desses neurônios, resultando em vasodilatação periférica, redução da frequência cardíaca, força de contração e conseqüente hipotensão (Dampney, 1994).

No RVLM a estimulação elétrica do NDA não alterou a densidade da proteína c-Fos nos ratos normotensos (controle e D-NAME) e hipertensos L-NAME, fato este inesperado porque durante a queda da pressão arterial provocada pela estimulação do NDA os neurônios do RVLM estariam inibidos, diminuindo a ativação neuronal local. Por outro lado, como a estimulação elétrica usada foi do tipo intermitente (5s de estimulador ligado com intervalos de 10s de estimulador desligado, por um período de 20 minutos), a fase em que o estimulador permaneceu desligado levou à desinibição dos neurônios do RVLM,

pelo CVLM, aumentando a atividade desses neurônios. Por meio de técnicas de eletrofisiologia, *in vitro*, Sun e cols. (1988) mostraram a capacidade dos neurônios do RVLM em se despolarizarem espontaneamente. Entretanto, Lipski e cols. (1996) demonstraram que a maioria desses neurônios sintetizava adrenalina, e que os mesmos não apresentavam características de marca-passo. Assim, persiste a dúvida se os neurônios do RVLM apresentam característica de marca-passo ou, integram uma rede neuronal reverberativa responsável pela excitação dos mesmos. Dessa forma, com os neurônios do RVLM ora inibidos (estimulador ligado), ora ativados (estimulador desligado), a densidade de proteína c-Fos permaneceu inalterada. Esse dado alinha-se ao observado por McKittrick e cols. (1992) os quais não observaram alterações na expressão da proteína c-Fos no RVLM de ratos anestesiados submetidos à estimulação elétrica intermitente do NDA. Dampney e cols. (2002), utilizando coelhos não anestesiados, também mostraram uma baixa expressão de c-Fos no RVLM, ao realizar um estímulo pressor com a infusão intravenosa de fenilefrina, comparando-a ao estímulo hipotensor causado pela infusão de nitroprussiato de sódio. Além disso, a hipotensão foi capaz de ativar neurônios catecolaminérgicos da ponte e do bulbo, além de neurônios sintetizadores de vasopressina no hipotálamo (Dampney e cols., 2002). Dessa forma, no presente estudo, o protocolo de estimulação elétrica intermitente do NDA, o qual mimetiza um aumento da pressão arterial, foi eficaz em aumentar a densidade da proteína c-Fos no CVLM dos animais normotensos (controle e D-NAME) e hipertensos L-NAME, mas não no RVLM; resultado semelhante ao de Dampney e cols. (2002) e Polson e cols. (1995), obtidos após o aumento da PA com fenilefrina.

5.3.5. Expressão de *c-Fos* nos neurônios do PVN

O núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) possui uma complexa citoarquitetura e é subdividido em diferentes regiões, incluindo neurônios neuroendócrinos magnocelulares e parvocelulares, e neurônios pré-autonômicos parvocelulares (Swanson e Sawchenko, 1980). Os neurônios magnocelulares são responsáveis pela síntese de ocitocina (OT) e vasopressina (ADH), e se projetam para a hipófise posterior onde se relacionam com o controle das funções reprodutivas e com o equilíbrio hidro-eletrolítico do organismo (Luiten e cols., 1985). Os neurônios neuroendócrinos parvocelulares se projetam para a eminência mediana onde participam na regulação da liberação de peptídeos hipotalâmicos (Swanson e Sawchenko, 1983). Finalmente, os neurônios pré-autonômicos parvocelulares estão relacionados com o controle autonômico por meio de projeções descendentes para o bulbo e para a medula espinhal (Armstrong e cols., 1980; Hosoya e cols., 1991). Dentre os sítios envolvidos no controle autonômico, o PVN está interconectado, reciprocamente, ao NTS, VLM (CVLM e RVLM), NA, substância cinzenta periaquedutal, núcleo parabraquial e núcleo motor dorsal do vago (Swanson e Sawchenko, 1980; 1983; Badoer, 2001). Dessa forma, o PVN ocupa uma posição central na modulação autonômica, endócrino, e, também, na regulação do sistema cardiovascular (Palkovits, 1999).

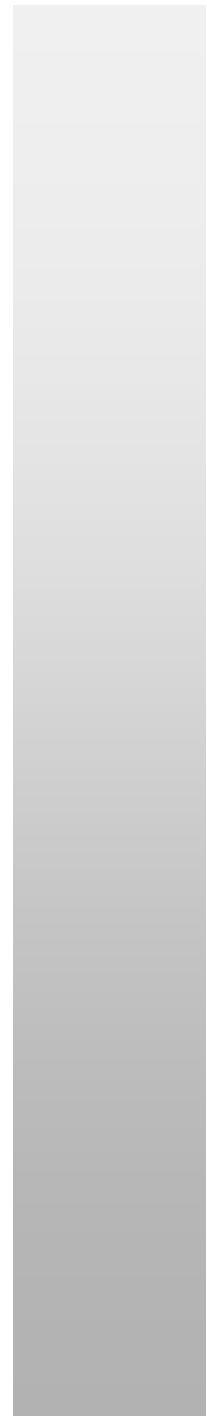
No presente estudo, a estimulação elétrica do NDA aumentou, significativamente, a densidade da proteína *c-Fos* nas regiões magnocelulares anterior (PaMA) e medial (PaMM) do PVN, responsáveis pela síntese de OT e ADH. Este aumento foi semelhante nos animais normotensos (controle e D-NAME) e hipertensos L-NAME estimulados. Esse dado se assemelha ao de McKittrick e cols. (1992), os quais também observaram aumento na expressão da

proteína c-Fos, em todo PVN de ratos submetidos à estimulação elétrica intermitente do NDA, sob anestesia. A ativação dos neurônios no NTSi e NTSc, durante a estimulação elétrica do NDA (estímulo pressor), pode ter levado ao aumento da atividade dos neurônios magnocelulares do PVN, uma vez que essas regiões estão interconectadas (Swanson e Sawchenko, 1980; 1983; Palkovits, 1999; Badoer, 2001), aumentando a densidade da proteína c-Fos nas regiões magnocelulares do PVN responsáveis pela síntese de OT e ADH.

Por outro lado, a análise dos neurônios parvocelulares do PVN após a estimulação do NDA não mostrou aumento na densidade da proteína c-Fos em nenhuma de suas subdivisões: parvocelular medial (PaMP) e parvocelular posterior (PaPO). Os resultados obtidos no presente estudos estão de acordo com aqueles obtidos por Polson e cols. (2006), os quais não observaram aumento na expressão de c-Fos no PVN parvocelular após aplicar um estímulo pressor com infusão de fenilefrina em coelhos acordados. No rato, estudos realizados por meio do registro da atividade do nervo simpático renal e expressão da proteína c-Fos, utilizada como índice de ativação neuronal no PVN, mostraram que os neurônios pré-autonômicos parvocelulares, que se projetam para a CIL e/ou RVLM, foram ativados pela queda no volume sangüíneo (Lovick e cols., 1993). Assim, sugeriu-se que esses neurônios estariam envolvidos com a regulação do tônus simpático frente a alterações da volemia e da osmolaridade plasmática (Haselton e cols., 1994; Badoer, 2001). Entretanto, o presente estudo mostrou um aumento na expressão da proteína c-Fos no PVN parvocelular posterior (PaPO) nos ratos hipertensos L-NAME estimulados. No PVN, inúmeros estudos apontam para um papel simpato-inibitório do NO, o qual causaria queda da PA e da atividade do nervo simpático renal (Horn e cols., 1994; Patel e cols., 2001). Zhang

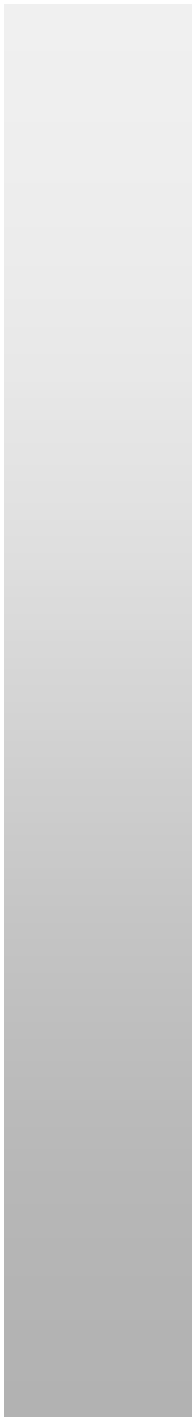
e cols. (1997) mostraram que a microinjeção dos inibidores não seletivos da NOS, L-NAME e L-NMMA no PVN, aumentaram a PA, FC e a atividade do nervo simpático renal em ratos anestesiados, evidenciando a capacidade do NO em regular a atividade simpática mediada por neurônios localizados no PVN. O presente estudo mostrou uma maior ativação dos neurônios parvocelulares no PVN de ratos hipertensos L-NAME após a estimulação do NDA, o que sugere uma maior participação desses neurônios na modulação da atividade barorreflexa no modelo de hipertensão arterial induzida pelo L-NAME.

Em síntese, a estimulação elétrica do NDA aumentou a densidade da proteína c-Fos no NTSi e NTSc dos animais normotensos (controle e D-NAME) e hipertensos L-NAME. Esse aumento foi maior nos ratos hipertensos L-NAME, o que sugere uma maior desinibição dos neurônios barorreceptores neste modelo de hipertensão arterial. O protocolo de estimulação elétrica intermitente do NDA foi eficaz em aumentar a densidade da proteína c-Fos no CVLM, mas não no RVLM, dos animais normotensos (controle e D-NAME) e hipertensos L-NAME. No PVN magnocelular, responsável pela síntese de OT e ADH, a estimulação do NDA induziu aumento da expressão da proteína c-Fos nos animais normotensos (controle e D-NAME) e hipertensos L-NAME. A estimulação elétrica do NDA aumentou a densidade da proteína c-Fos na porção parvocelular posterior (PaPO) do PVN, somente dos ratos hipertensos L-NAME, o que sugere uma maior participação do PVN na modulação autonômica simpática nesse modelo de hipertensão arterial.



Conclusões

1. 14 dias de tratamento com o inibidor não seletivo da NOS, L-NAME, induziu hipertensão arterial e taquicardia;
2. A estimulação elétrica do NDA em ratos acordados foi eficaz em ativar o barorreflexo nos normotensos (controle e D-NAME) e hipertensos L-NAME, como demonstrado pelas quedas de PAM e FC;
3. A ativação barorreflexa aumentou a densidade da proteína c-Fos nos neurônios do NTSi e NTSc dos animais normotensos (controle e D-NAME) e hipertensos L-NAME. Esse aumento foi maior nos ratos hipertensos L-NAME, o que sugere uma maior desinibição dos neurônios barorreceptores neste modelo de hipertensão arterial;
4. O protocolo de estimulação elétrica intermitente do NDA foi eficaz em aumentar a densidade da proteína c-Fos nos neurônios do CVLM, mas não no RVLM, dos ratos normotensos (controle e D-NAME) e hipertensos L-NAME;
5. A estimulação elétrica do NDA aumentou a expressão da proteína c-Fos nos neurônios magnocelulares do PVN relacionados com a síntese de OT e ADH. Nos neurônios parvocelulares do PVN a ativação do barorreflexo, pela estimulação do NDA, aumentou a expressão da proteína c-Fos, somente, nos ratos hipertensos L-NAME. Isto sugere uma maior participação do PVN na modulação autonômica simpática nesse modelo de hipertensão arterial.



Referências Bibliográficas

Abboud FM, Heistad DD, Mark AL, Schmid PG. Reflex control of the peripheral circulation. **Prog Cardiovasc Dis** 18: 371-403, 1976.

Abboud FM, Thames MD. Interaction of cardiovascular reflexes in circulatory control. In: **Handbook of Physiology**, Section 2. The Cardiovascular System. Vol III. Peripheral Circulation and Organ Blood Flow (Ed. J. T. Shepherd & F. M. Abboud), 1983.

Armstrong WE, Warach S, Hatton GI, McNeill TH. Subnuclei in the rat hypothalamic paraventricular nucleus: a cytoarchitectural, horseradish peroxidase and immunocytochemical analysis. **Neurosci** 5: 1931-1958, 1980.

Augustyniak RA, Victor RG, Morgan DA, Zhang W. L-NAME- and ADMA-induced sympathetic neural activation in conscious rats. **Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physio** 290: 726-732, 2006.

Badoer E, Merolli J. Neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus that project to the rostral ventrolateral medulla are activated by haemorrhage. **Brain Research** 791: 317-320, 1998.

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

Baylis C, Braith R, Santmyre BR, Engels K. Renal nerves do not mediate vasoconstrictor responses to acute nitric oxide synthesis inhibition in conscious rats. **J Am Soc Nephrol** 8: 887-892, 1997.

Belder AJ, Radomski MW, Why HJ, Richardson PJ, Bucknall CA, Salas E, Martin JF, Moncada S. Nitric oxide synthase activities in human myocardium. **Lancet** 341: 84-85, 1993.

Bergamaschi CT, Campos RR, Lopes OU. Rostral ventrolateral medulla: A source of sympathetic activation in rats subjected to long-term treatment with L-NAME. **Hypertension** 34: 744-747, 1999.

Bredt DS, Hwang PM, Snyder SH. Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. **Nature** 347: 768-770, 1990.

Brown A. Receptors under pressure: An update on baroreceptors. **Circ Res** 46: 1-10, 1980.

Carlsten A, Folkow B, Grimby G, Hamberger CA, Thulesius O. Cardiovascular effects of direct stimulation of the carotid sinus nerve in man. **Acta Physiol Scand** 44: 138-145, 1958.

Carvalho TH, Lopes OU, Tolentino-Silva FR. Baroreflex responses in neuronal nitric oxide synthase knockout mice (nNOS). **Auton Neurosci** 126-127:163-8, 2006.

Ceccatelli S, Vilar MJ, Goldstein J, Hokfelt T. Expression of c-Fos immunoreactivity in transmitter-characterized neurons after stress. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 86: 9569-9573, 1989.

Chalmers JP. Brain amines and models of experimental hypertension. **Circulation Research** 36: 469-480, 1975.

Chan SHH, Chang KF, Ou CC, Chan JYH. Nitric oxide regulates c-fos expression in nucleus tractus solitarii induced by baroreceptor activation via cGMP dependent protein kinase and cAMP response element-binding protein phosphorylation. **Mol Pharmacol** 65: 319-325, 2003.

Chan RKW, Sawchenko PE. Organization and transmitter specificity of medullary neurons activated by sustained hypertension: implications for understanding baroreceptor reflex circuitry. **Journal of Neuroscience** 18: 371-387, 1998.

Chan RKW, Jarvina EV, Sawchenko PE. Effects of selective sinoaortic denervations on phenylephrine-induced activational responses in the nucleus of the solitary tract. **Neuroscience** 101: 165-178, 2000.

Chapleau MW, Hajduczuk G, Abboud FM. Mechanisms of resetting of arterial baroreceptors: An overview. **Am J Med Sci** 295: 327-334, 1988.

Chapleau MW, Hajduczuk G, Abboud FM. Peripheral and central mechanisms of baroreflex resetting. **Clin Exp Pharmacol Physiol** 15: 31-43, 1989.

Chapleau MW, Hajduczuk G, Abboud FM. Paracrine modulation of baroreceptor activity by vascular endothelium. **NIPS** 6: 210-214, 1991.

Chapleau MW. Are arterial pressure and deformation the sole determinants of baroreceptor activity? Importance of humoral and endothelial modulation in normal and disease states. **Hypertension** 19: 278-280, 1992.

Chapleau MW, Cunningham JT, Sullivan MJ, Wachtel RE, Abboud FM. Structural versus functional modulation of the arterial baroreflex. **Hypertension** 26: 341-347, 1995.

Cheng-Dean Shih, Samuel HH Chan, Julie YH Chan. Participation of Fos protein at the nucleus tractus solitarius in inhibitory modulation of baroreceptor reflex response in the rat. **Brain Research** 738: 39-47, 1996.

Choate JK, Paterson DJ. Nitric oxide inhibits the positive chronotropic and inotropic responses to sympathetic nerve stimulation in the isolated guinea-pig atria. **J Auton Nerv Syst** 75 (2-3):100-8, 1999.

Ciriello J. Brainstem projections of aortic baroreceptor afferents fibers in the rat. **Neurosci Lett** 36: 37-42, 1983.

Curran T, Morgan JI. Superintroduction of c-Fos by nerve growth factor in the presence of peripherally active benzodiazepines. **Science** 229: 1265-1268, 1985.

Dampney RAL. Functional organization of pathways regulating cardiovascular system. **Physiol Rev** 74: 323-364, 1994.

Dampney RAL, Li YW, Hirooka Y, Potts PD, Polson JW. Use of c-Fos functional mapping to identify the central baroreceptor reflex pathway: advantages and limitations. **Clin and Exper. Hypertension** 17 (1&2): 197-208, 1995.

Dampney RAL, Polson JW, Potts PD, Hirooka Y, Horiuchi J. Funcional organization of brain pathways subserving the baroreceptor reflex: studies in conscious animals using immediate early gene expression. **Cellular and Molecular Neurobiology** 23: 597-616, 2002.

Daubert DL, Brooks VL. Nitric oxide impairs baroreflex gain during acute psychological stress. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol** 292: R955-R961, 2006.

De Paula PM, Castania JA, Bonagamba LGH, Salgado HC, Machado BH. Hemodynamic responses to electrical stimulation of the aortic depressor nerve in awake rats. **AM J Physiol Reg Integr Comp Physiol** 227: R31-R38, 1999.

De Oliveira RW, Del Bel EA, Guimarães FS. Behavioral and c-fos expression changes induced by nitric oxide donors microinjected into the dorsal periaqueductal gray. **Brain Research Bulletin** 51: 457-464, 2000.

Dias AC, Vitela M, Colombari E, Mifflin SW. Nitric Oxide modulation of glutamatergic, baroreflex and cardiopulmonary transmission in the nucleus of the solitary tract. **Am J Physiol Heart Circ Physiol** 288(1): 256-262, 2005.

Doba N, Reis DJ. Acute fulminating neurogenic hypertension produced by brainstem lesions in the rat. **Circ Res** 32 (5): 584-593, 1973.

Douglas WW, Ritchie JM, Schaumann W. Depressor reflexes from medullated and non-medullated fibres in the rabbits aortic nerve. **J Physiol** 132: 187-198, 1956.

Dragunow M, Faull R. The use of c-Fos as a metabolic marker in neuronal pathway tracing. **J. Neurosci. Methods** 29: 261-265, 1989.

Erickson JT, Millhorn DE. Fos-like protein is induced in neurons of the medulla oblongata after stimulation of the carotid sinus nerve in awake and anesthetized rats. **Brain Res** 567: 11-24, 1991.

Fan W, Andresen MC. Differential frequency-dependent reflex integration of myelinated and nonmyelinated rat aortic baroreceptors. **AM J Physiol Heart Circ Physiol** 275: H632-H640, 1998.

Fazan JrR, Ballejo G, Salgado MCO, Moraes MFD, Salgado HC. Heart rate variability and baroreceptor function in chronic diabetic rats. **Hypertension** 30: 632-635, 1997.

- Filippone JD, Bisognano JD. Baroreflex stimulation in the treatment of hypertension. **Curr Opin Nephrol Hypertens** 16: 403-408, 2007.
- Fraser KA, Raizada E, Davison JS. Oral-pharyngeal-esophageal and gastric cues contribute to meal-induced c-fos expression. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol** 268: R223-R230, 1995.
- Fujisawa Y, Mori N, Yube K, Miyanaka H, Miyatake A, Abe Y. Role of nitric oxide in regulation of renal sympathetic nerve activity during hemorrhage in conscious rats. **Am J Physiol** 277: H8-14, 1999.
- Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature** 288: 373-376, 1980.
- Gardiner SM, Kemp PA, Bennett T, Palmer RMJ, Moncada S. Nitric oxide synthase inhibitors cause sustained, but reversible, hypertension and hindquarters vasoconstriction in Brattleboro rats. **Eur J Pharmacol** 213: 449-451, 1992.
- Goelet P, Castellucci VF, Schacher S, Kandel ER. The long-term memory - a molecular framework. **Nature** 322: 418-422, 1986.
- Griffith ER, Schwartz SI. Reverse of renal hypertension by electrical stimulation of the carotid sinus nerve. **Surgery** 56: 232-239, 1964.
- Haselton JR, Goering J, Patel KP. Parvocellular neurons of the paraventricular nucleus are involved in the reduction in renal nerve discharge during isotonic volume expansion. **J Auton Nerv Syst** 50: 1-11, 1994.
- Heaton DA, Golding S, Bradley CP, Dawson TA, Cai S, Channon Km, Paterson DJ. Targeted nNOS gene transfer into the cardiac vagus rapidly increases parasympathetic function in the pig. **J Mol Cell Cardiol** 39: 159-64, 2005.
- Horn T, Smith PM, McLaughlin BE, Bause L, Marks GS, Pittman QJ, Ferguson AV. Nitric oxide actions in paraventricular nucleus: cardiovascular and neurochemical implications. **Am J Physiol** 266: R306-313, 1994.

Hosoya Y, Sugiura Y, Okado N, Loewy AD, Kohno K. Descending input from the hypothalamic paraventricular nucleus to sympathetic preganglionic neurons in the rat. **Exp Brain Res** 85: 10-20, 1991.

Hunt SP, Pini A, Evan G. Induction of c-Fos-like protein in spinal cord neurons following sensory stimulation. **Nature** 328: 632-634, 1987.

Iadecola C, Xu X, Zhang F, Hu JFE. Prolonged inhibition of brain nitric oxide synthase by short term systemic administration of nitro-L-arginine methyl ester. **Neurochem Res** 19: 501-505, 1994.

Illig KA, Levy M, Sanchez L, Trachiotis GD, Shanley C, Irwin E, Pertile T, Kieval R, Cody R. An implantable carotid sinus stimulator for drug-resistant hypertension: Surgical technique and short-term outcome from the multicenter phase II Rheos feasibility trial. **J Vasc Surg** 44:1213-1218, 2006.

Jimbo M, Suzuki H, Ichikawa M, Kumagai K, Nishizawa M, Saruta T. Role of nitric oxide in regulation of baroreceptor reflex. **J Autonomic Nervous System** 50: 209-219, 1994.

Kasparov S, Paton JFR. Differential effects of angiotensin II in the nucleus tractus solitarius – II. Plausible neuronal mechanisms. **J Physiol** 521: 227–238, 1999.

Kirchheim HR. Systemic arterial baroreceptor reflexes. **Physiol Rev** 56: 100-176, 1976.

Krieger EM, Marseillan RF. Aortic depressor fibers in the rat: an electrophysiological study. **Am J Physiol** 205: 771-774, 1963.

Krieger EM. Time course of baroreceptor resetting in acute hypertension. **Am J Physiol** 26: 486-490, 1970.

Krieger EM, Salgado HC, Michelini LC. Resetting of the baroreceptors. In: **Cardiovascular Physiology IV, International Review of Physiology 26**, edited by

Guyton A. C. and Hall J. E. Baltimore, MD: University Park Press; p. 119-146, 1982.

Lipski J, Kanjhan R, Kruszeska B, Rong W. Properties of presympathetic neurones in the rostral ventrolateral medulla in the rat: an intracellular study "in vivo". **J Physiol** 490 (Pt3): 729-744, 1996.

Lin LH, Talman WT. Vesicular glutamate transporters and neuronal nitric oxide synthase colocalize in aortic depressor afferent neurons. **J Chem Neuroanat** 32: 54-64, 2006.

Lovick TA, Malpas S, Mahony MT. Renal vasodilatation in response to acute volume load is attenuated following lesions of parvocellular neurones in the paraventricular nucleus in rats. **J Auton Nerv Syst** 43: 247-255, 1993.

Luiten PGM, ter Horst GJ, Karst H, Steffens AB. The course of paraventricular hypothalamic efferentes to autonomic structures in medulla and spinal cord. **Brain Res** 329: 374-378, 1985.

Machado BH, Castania JA, Bonagamba LGH, Salgado HC. Neurotransmission of autonomic components of aortic baroreceptor afferents in the NTS of awake rats. **AM J Physiol Heart Circ Physiol** 279: H67-H75, 2000.

Matsuda T, Bates JN, Lewis SJ, Abboud FM, Chapleau MW. Modulation of baroreceptor activity by nitric oxide and S-nitrosocysteine. **Circ Res** 76(3):426-33, 1995.

Matsumura K.; Abe I.; Tsuchihashi T.; Fujishima M. Central nitric attenuates the barorreceptor reflex in conscious rabbits. **AM J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol** 274: 1142-1149, 1998.

Mayorov DN. Selective sensitization by nitric oxide of sympathetic baroreflex in rostral ventrolateral medulla of conscious rabbits. **Hypertension** 45(5):901-6, 2005.

Mayorov DN. Nitric oxide synthase inhibition in rostral ventrolateral medulla attenuates pressor response to psychological stress in rabbits. **Neuroscience Letters** 424: 89-93, 2007.

McKittrick DJ, Krukoff TL, Calaresu FR. Expression of c-Fos protein in rat brain after electrical stimulation of the aortic depressor nerve. **Brain Research** 599: 215-222, 1992.

Meyrelles SS, Sharma RV, Mao Hz, Abboud FM, Chapleau MW. Modulation of baroreceptor activity by gene transfer of nitric oxide synthase to carotid sinus adventitia. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol** 284(5):R1190-8, 2003.

Minami N, Imai Y, Hashimoto J, Abe K. The role of nitric oxide in the baroreceptor-cardiac reflex in conscious Wistar rats. **Am J Physiol** 269:H851-5, 1995.

Miura M, Takayama K, Okada J. Neuronal expression of Fos protein in the rat brain after baroreceptor stimulation. **Journal of the Autonomic Nervous System** 50: 31-43, 1994.

Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacol Rev** 43: 109-142, 1991.

Moncada S. Nitric oxide. **Journal of Hypertension** 12 (suppl 10): S35-S39, 1994.

Moncada S. Nitric oxide in the vasculature: physiology and pathophysiology. **Ann New York Acad Sci** 811: 60-69, 1997.

Montarolo PG, Goelet P, Castellucci VF, Morgan J, Kandel ER, Schacher S. A critical period for macromolecular synthesis in long-term heterosynaptic facilitation in Aplysia. **Science** 234: 1249-1254, 1986.

Morgan JI, Curran T. Stimulus-transcription coupling in neurons: role of cellular immediate-early gene. **Trends Neurosci** 12: 459-462, 1989.

Morgan JI, Curran T. Stimulus-transcription coupling in nervous system: involvement of the inducible proto-oncogenes fos and jun. **Annual Review of Neuroscience** 14: 421-451, 1991.

Morgan JI, Curran T. Fos: An Immediated-early transcription factor in neurons. **Journal of Neurobiology** 26: 403-412, 1995.

Palkovits M, Zaborszky L. Neuroanatomy of central cardiovascular control. Nucleus tractus solitarii: afferent and efferent neuronal connections in relation to the baroreceptor reflex arc. **Prog Brain Res** 9: 34-47, 1977.

Palkovits M. Interconnections between the neuroendocrine hypothalamus and the central autonomic system. **Front Neuroendocrinol** 20: 270-295, 1999.

Palmer RMJ, Moncada S. A novel citrulline-forming enzyme implicated in the formation of nitric oxide by vascular endothelial cells. **Biochem Biophys Res Commun** 158: 348-352, 1989.

Paton JFR, Kasparov S. Baroreceptor reflex attenuation by angiotensin II and nitric oxide are both mediated by soluble guanylyl cyclase in the nucleus tractus solitarii. **J Physiol** 533: 87, 2001.

Patel KP, Li Yi-Fan, Hirooka Y. Role of nitric oxide in central sympathetic outflow. **Exp Biol Med** 226 (9): 814-824, 2001.

Paton JFR, Kasparov S, Paterson DJ. Nitric oxide and autonomic control of heart rate: a question of specificity. **Trends in Neurosci** 25: 626-631, 2002.

Paxinos G, Watson C. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. 5th ed. **Academic Press**, San Diego, 2004.

Persson PB, Baumann JE, Ehmke H, Nafz B, Wittmann U, Kirchheim HR. Phasic and 24-h blood pressure control by endothelium derived relaxing factor in conscious dogs. **Am J Physiol** 262: H1395-H1400, 1992.

Pollock JS, Förstermann U, Mitchell JA, Warner TD, Schmidt HHHW, Nakane M, Murad F. Purification and characterization of particulate endothelium-derived relaxing factor synthase from cultured and native bovine aortic endothelial cells. **Proc Natl Acad Sci USA** 88: 10480-10484, 1991.

Polson JW, Potts PD, Li YW, Dampney RAL. Fos expression in neurons projecting to the pressor region in the rostral ventrolateral medulla after sustained hypertension in conscious rabbits. **Neuroscience** 67: 107-123, 1995.

Prast H, Philippu A. Nitric oxide as modulator of neuronal function. **Progress in Neurobiology** 64: 51-68, 2001.

Resstel LBM, Corrêa FMA. Medial prefrontal cortex NMDA receptors and nitric oxide modulate the parasympathetic component of the baroreflex. **Eur J Neurosci** 23: 481-488, 2006.

Ribeiro MO, Antunes E, de Nucci G, Lovisolo SM, Zatz R. Chronic inhibition of nitric oxide synthesis. A new model of arterial hypertension. **Hypertension** 20: 298-303, 1992.

Rocha MJA, Herbert H. Effects of anesthetics on Fos protein expression in autonomic brain nuclei related to cardiovascular regulation. **Neuropharmacology** 36: 1779-1781, 1997.

Ruggeri P, Battaglia A, Ermirio R, Grossini E, Molinari C, Mary DA, Vacca G. Role of nitric oxide in the control of the heart rate within the nucleus ambiguus of rats. **Neuroreport** 11(3):481-5, 2000.

Sakai K, Hirooka Y, Matsuo I, Eshima K, Shigematsu H, Shimokawa H, Takeshita A. Overexpression of endothelial nitric oxide synthase in the nucleus tractus solitarius causes hypotension and bradycardia *in vivo*. **Hypertension** 36: 1023-1028, 2000.

Salgado HC, Fazan JrR, Salgado MCO. Bases fisiológicas da Regulação da Pressão Arterial. In: **Monitorização Ambulatorial da Pressão Arterial**, Mion Jr. D.; Nobre F.; Oigman W. Atheneu, São Paulo, p. 1-17, 1995.

Salgado MCO, Justo SV, Joaquim LF, Fazan R, Salgado HC. Role of nitric oxide and prostanoids in attenuation of rapid baroreceptor resetting. **Am J Physiol Heart Circ Physiol** 290(3):H1059-63, 2006.

Salgado HC, Barale Ar, Castania JA, Machado BH, Chapleau MW, Fazan Jr R. Baroreflex responses to electrical stimulation of aortic depressor nerve in conscious SHR. **Am J Physiol Heart Circ Physiol** 292: H593-H600, 2007.

Salgado HC, Durand MT, Salgado MCO, Castania JA. Hemodynamic responses to electrical stimulation of the aortic depressor nerve in conscious L-NAME hypertensive rats. **The FASEB Journal** Program/Abstract # 953.7, 2008.

Samuel HH Chan, Kui-Fen Chang, Chen-Chun Ou, Julie YH Chan. Nitric oxide regulates c-Fos expression in nucleus tractus solitarius induced by baroreceptor activation via cGMP-dependent protein kinase and cAMP response element-binding protein phosphorylation. **Mol Pharmacol** 65: 319-325, 2004.

Sander M, Hansen PG, Victor RG. Sympathetically mediated hypertension caused by chronic inhibition of nitric oxide. **Hypertension** 26: 691-695, 1995.

Santos, FM. Controle barorreflexo da função autonômica na hipertensão arterial induzida por L-NAME. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas: Fisiologia) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

Sapru HN, Krieger AJ. Carotid and aortic chemoreceptor function in the rat. **J Appl Physiol** 42: 344-348, 1977.

Sapru HN, Gonzalez E, Krieger AJ. Aortic nerve stimulation in the rat: cardiovascular and respiratory responses. **Brain Res Bull** 6: 393-398, 1981.

Schmidli J, Savolainen H, Eckstein F, Irwin E, Peters TK, Martin R, Kieval, Cody R, Carrel T. Acute device-based blood pressure reduction: electrical activation of the carotid baroreflex in patients undergoing elective carotid surgery. **Vascular** 15: 63-69, 2007.

Schwartz SI, Griffith LSC. Reduction of hypertension by electrical stimulation of the carotid sinus nerve. In *Baroreceptor and Hypertension*. Edited by P Kezdi. Oxford, UK, **Pergamon Press** 409-424, 1967.

Schmidt HHHW, Pollock JS, Nakana M, Gorsky LD, Förstermann U, Murad F. Purification of a soluble isoform of guanylyl cyclase-activating-factor synthase. **Proc Natl Acad Sci USA** 88: 365-369, 1991.

Scroggin KE, Veelen R, Luft FC. Sympathetic baroreceptor responses after chronic NG-nitro-L-arginine methyl ester treatment in conscious rats. **Hypertension** 23: 982-986, 1994.

Scroggin KE, Hatton DC, Chi Y, Luft FC. Chronic nitric oxide inhibition with L-NAME: effects on autonomic control of the cardiovascular system. **Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol** 274: R367-R374, 1998.

Sears CE, Ashley EA, Casadei B. Nitric oxide control of cardiac function: is neuronal nitric oxide synthase a key component? **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci** 359 (1446): 1021-44, 2004.

Sener A, Smith FG. Nitric oxide modulates arterial baroreflex control of heart rate in conscious lambs in an age-dependent manner. **Am J Physiol Heart Circ Physiol** 280(5):H2255-63, 2001.

Sheng M, Greenberg ME. The regulation and function of c-Fos and other immediate early genes in the nervous system. **Neuron** 4: 477-485, 1990.

Soato GG, Krieger EM. Heart rate after acute hypertension in the rat. **Am J Physiol** 227: 1389-1393, 1974.

Souza HCD, Ballejo G, Salgado MCO, Silva VJD, Salgado HC. Cardiac sympathetic overactivity and decreased baroreflex sensitivity in L-NAME hypertensive rats. **Am J Physiol Heart Circ Physiol** 280: H844-H850, 2001.

Spyer KM. The central nervous organization of reflex circulatory control. **Central Regulation of Autonomic Functions**, edited by Arthur C. Loewy and KM Spyer, New York Oxford, 1990.

Stornetta RL, Guyenet PG, McCarty RC. Autonomic nervous system control of heart rate during baroreceptor activation in conscious and anesthetized rats. **Journal of the Autonomic nervous System** 20: 121-127, 1987.

Stuehr DJ, Cho HJ, Kwon NS, Weise MF, Nathan CF. Purification and characterization of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase: an FAD- and FMN-containing flavoprotein. **Proc Natl Acad Sci USA** 88: 7773-7777, 1991.

Sun MK, Young BS, Hackett JT, Guyenet PG. Reticulospinal pacemaker neurons of the rat rostral ventrolateral medulla with putative sympathoexcitatory function: an intracellular study in vitro. **Brain Research** 442: 229-239, 1988.

Sved AF, Gordon FJ. Aminoacids as central neurotransmitters in the baroreceptor reflex pathway. **News Physiol Sci** 9: 243-246, 1994.

Swanson LW, Sawchenko PE. Paraventricular nucleus: a site for the integration of neuroendocrine and autonomic mechanisms. **Neuroendocrinology** 31: 410-417, 1980.

Swanson LW, Sawchenko PE. Hypothalamic integration: organization of the paraventricular and supraoptic nuclei. **Ann Rev Neurosci** 6: 269-324, 1983.

Takayama K, Suzuki T, Miura M. The comparison of effects of various anesthetics on expression of Fos protein in the rat brain. **Neuroscience Letters** 176: 59-62, 1994.

Talman W, Dragon DN. Transmission of arterial baroreflex signals depends on neuronal nitric oxide synthase. **Hypertension** 43: 820-824, 2004.

Tordoir JHMS, Scheffers I, Schmidli J, Savolainen H, Liebeskind U, Hansky B, Herold U, Irwin E, Kroon AA, de Leeuw P, Peters TK, Kieval R, Cody R. An Implantable Carotid Sinus Baroreflex Activating System: Surgical Technique and Short-Term Outcome from a Multi-Center Feasibility Trial for the Treatment of Resistant Hypertension. **Eur J Vasc Endovasc Surg** 33: 414-421, 2007.

Vallance P, Collier J, Moncada S. Effects of endothelium-derived nitric oxide on peripheral arterial tone in man. **Lancet** 28: 997-1000, 1989.

Vasquez EC, Cunha RS, Cabral AM. Baroreceptor reflex function in rats submitted to chronic inhibition of nitric oxide synthesis. **Braz J Med Biol Res** 27: 767-774, 1994.

Waki H, Kasparov S, Wong LF, Murphy D, Shimizu T, Paton JF. Chronic inhibition of endothelial nitric oxide synthase activity in nucleus tractus solitarii enhances baroreceptor reflex in conscious rats. **J Physiol** 546: 233-42, 2003.

Wang DS, Xie HH, Shen FM, Cai GJ, Su DF. Blood pressure variability, cardiac baroreflex and organ damage in experimentally hypertensive rats. **Clin Exp Pharmacol Physiol** 31: 212-218, 2005.

Wang Y, Mardsen PA. Nitric oxide synthases: Biochemical and molecular regulation. ***Curr Opinion Nephrol Hypert*** 4: 12-22, 1995.

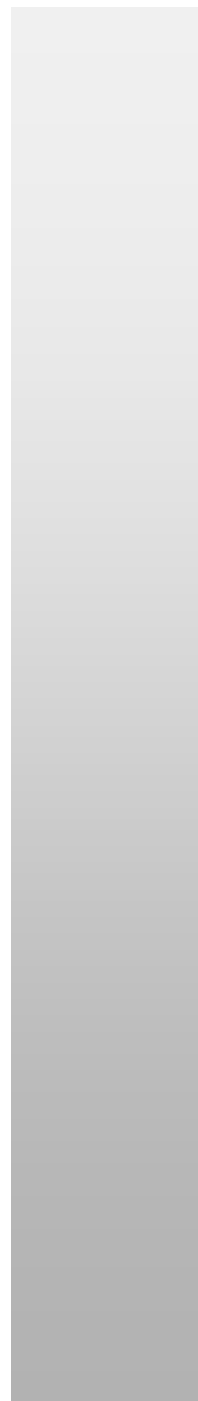
Ward JE, Angus JA. Acute and chronic inhibition of nitric oxide synthase in conscious rabbits: role of nitric oxide in the control of vasculature tone. ***J Cardiovasc Pharmacol*** 21: 804-814, 1993.

Warner HR. The frequency-dependent nature of blood pressure by the carotid sinus studied with an electric analog. ***Circ Res*** 6: 35-40, 1958.

Zanzinger J. Role of nitric oxide in the neural control of cardiovascular function. ***Cardiovas Res*** 43: 639-649, 1999.

Zhang K, Mayhan WG, Patel KP. Nitric oxide within the paraventricular nucleus mediates changes in renal sympathetic nerve activity. ***Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp Physiol*** 273: R864-R872, 1997.

Zittel TT, Glatzle J, Kreis ME, Starlinger M, Eichner M, Raybould HE, Becker HD, Jehle EC. C-fos protein expression in the nucleus of the solitary tract correlates with cholecystokinin dose injected and food intake in rats. ***Brain Research*** 846: 1-11, 1999.



Apêndice

Tabela 1. Valores individuais de pressão arterial sistólica (PAS, mmHg) e frequência cardíaca (FC, bpm) medida na cauda de ratos controles, tratados somente com água de beber.

Rato	<u>1° dia água</u>		<u>13° dia água</u>	
	PAS	FC	PAS	FC
1	118	356	121	340
2	120	365	123	339
3	117	350	119	356
4	116	361	122	344
5	122	382	122	345
6	118	352	118	352
7	118	362	116	349
8	117	355	123	344
9	116	341	118	357
10	114	344	116	355
11	122	357	125	355
12	122	355	123	363
13	118	347	119	361
Média ± EPM	118 ± 3	356 ± 3	120 ± 2	351 ± 2

Tabela 2. Valores basais individuais de pressão arterial média (PAM, mmHg) e frequência cardíaca (FC, bpm) de ratos normotensos controle.

	<u>PAM</u>	<u>FC</u>
Rato		
1	103	358
2	104	360
3	110	360
4	93	317
5	105	398
6	101	376
7	95	344
8	106	347
9	103	335
10	87	347
11	96	347
12	96	319
13	106	408
Média ± EPM	100 ± 2	355 ± 7

Tabela 3. Valores individuais de pressão arterial sistólica (PAS, mmHg) e frequência cardíaca (FC, bpm) medida na cauda de ratos, antes e após o tratamento com D-NAME.

Rato	<u>1° dia D-NAME</u>		<u>13° dia D-NAME</u>	
	PAS	FC	PAS	FC
1	110	348	119	345
2	119	351	126	352
3	117	349	123	349
4	122	357	129	344
5	123	355	126	357
6	118	347	120	355
7	125	340	131	363
8	111	339	124	361
9	116	356	125	350
10	112	344	122	352
Média ± EPM	117 ± 2	349 ± 2	125 ± 1	353 ± 2

Tabela 4. Valores basais individuais de pressão arterial média (PAM, mmHg) e frequência cardíaca (FC, bpm) de ratos normotensos D-NAME.

	<u>PAM</u>	<u>FC</u>
Rato		
1	104	379
2	108	408
3	110	356
4	110	361
5	108	398
6	105	386
7	107	353
8	109	344
9	111	345
10	106	337
Média ± EPM	108 ± 1	366 ± 8

Tabela 5. Valores individuais de pressão arterial sistólica (PAS, mmHg) e frequência cardíaca (FC, bpm) medida na cauda de ratos, antes e após o tratamento com L-NAME.

Rato	<u>1° dia L-NAME</u>		<u>13° dia L-NAME</u>	
	PAS	FC	PAS	FC
1	120	355	179	415
2	121	366	160	381
3	117	350	192	410
4	116	415	187	380
5	125	382	171	333
6	118	411	186	427
7	120	362	170	392
8	117	355	198	444
9	116	341	176	435
10	114	344	184	395
11	125	390	186	411
12	127	357	172	392
13	116	343	191	430
Média ± EPM	119 ± 1	367 ± 7	181 ± 3	403 ± 8

Tabela 6. Valores basais individuais de pressão arterial média (PAM, mmHg) e frequência cardíaca (FC, bpm) de ratos hipertensos L-NAME.

Rato	<u>PAM</u>	<u>FC</u>
1	169	420
2	142	399
3	190	403
4	174	376
5	151	334
6	150	431
7	156	389
8	178	443
9	166	431
10	157	396
11	166	405
12	162	387
13	160	433
Média ± EPM	163 ± 4	404 ± 8

Tabela 7. Respostas individuais das quedas da pressão arterial média (Δ PAM, mmHg) a cada intervalo de 2 minutos de estimulação elétrica do NDA ao longo de 20 minutos.

Período EE (min)		0-2	2-4	4-6	6-8	8-10	10-12	12-14	14-16	16-18	18-20
<u>Controle</u>	Rato										
	1	-21	-22	-22	-30	-22	-29	-27	-29	-29	-17
	2	-17	-25	-13	-18	-12	-30	-18	-17	-24	-16
	3	-24	-26	-17	-16	-30	-18	-17	-20	-20	-30
	4	-37	-43	-36	-38	-37	-33	-33	-48	-34	-31
	5	-42	-35	-23	-30	-39	-45	-27	-41	-42	-35
	6	-35	-21	-16	-18	-16	-13	-20	-22	-35	-22
	$\bar{X} \pm \text{EPM}$	-29 ± 4	-28 ± 3	-21 ± 3	-25 ± 4	-26 ± 4	-28 ± 5	-24 ± 2	-29 ± 5	-30 ± 3	-25 ± 3
<u>D-NAME</u>	Rato										
	1	-42	-27	-31	-27	-30	-30	-20	-29	-29	-29
	2	-26	-18	-16	-22	-17	-15	-15	-30	-19	-32
	3	-32	-17	-17	-18	-16	-19	-17	-21	-16	-18
	4	-15	-33	-39	-39	-39	-38	-34	-33	-36	-31
	5	-44	-27	-29	-28	-31	-29	-25	-42	-32	-44
	$\bar{X} \pm \text{EPM}$	-32 ± 5	-24 ± 3	-26 ± 4	-27 ± 3	-27 ± 4	-26 ± 4	-22 ± 3	-31 ± 3	-26 ± 4	-31 ± 4
<u>L-NAME</u>	Rato										
	1	-62	-47	-52	-42	-42	-49	-46	-38	-41	-42
	2	-31	-28	-26	-27	-26	-34	-34	-38	-22	-21
	3	-41	-41	-31	-36	-32	-30	-28	-38	-34	-41
	4	-21	-22	-23	-25	-15	-21	-22	-22	-29	-26
	5	-51	-34	-34	-42	-44	-44	-43	-37	-46	-43
	6	-30	-29	-33	-37	-50	-37	-35	-28	-27	-26
	7	-26	-30	-42	-32	-39	-28	-21	-29	-23	-24
	$\bar{X} \pm \text{EPM}$	-37 ± 5	-33 ± 3	-34 ± 4	-34 ± 2	-34 ± 4	-35 ± 4	-32 ± 4	-33 ± 2	-32 ± 3	-32 ± 4

Tabela 8. Respostas individuais das quedas de frequência cardíaca (ΔFC , bpm) a cada intervalo de 2 minutos de estimulação elétrica do NDA ao longo de 20 minutos.

Período EE (min)		0-2	2-4	4-6	6-8	8-10	10-12	12-14	14-16	16-18	18-20
<u>Controle</u>	Rato										
	1	-172	-223	-220	-217	-170	-209	-246	-236	-145	-173
	2	-66	-110	-107	-32	-100	-124	-116	-59	-177	-103
	3	-193	-89	-90	-38	-66	-65	-77	-55	-98	-77
	4	-233	-135	-224	-218	-195	-181	-173	-185	-177	-173
	5	-194	-217	-208	-218	-202	-216	-211	-210	-202	-214
	6	-196	-180	-200	-142	-189	-188	-154	-197	-149	-143
$\bar{X} \pm EPM$		-175 $\pm$ 23	-159 $\pm$ 23	-174 $\pm$ 24	-144 $\pm$ 36	-153 $\pm$ 23	-163 $\pm$ 24	-162 $\pm$ 25	-157 $\pm$ 32	-158 $\pm$ 36	-147 $\pm$ 20
<u>D-NAME</u>	Rato										
	1	-218	-220	-221	-225	-170	-172	-172	-169	-172	-172
	2	-109	-109	-107	-111	-79	-84	-66	-76	-64	-68
	3	-90	-92	-91	-95	-193	-190	-193	-189	-195	-193
	4	-226	-224	-221	-224	-228	-233	-231	-233	-232	-227
	5	-206	-208	-209	-203	-190	-191	-196	-194	-200	-202
$\bar{X} \pm EPM$		-170 $\pm$ 29	-171 $\pm$ 25	-170 $\pm$ 26	-172 $\pm$ 26	-172 $\pm$ 25	-174 $\pm$ 25	-172 $\pm$ 24	-172 $\pm$ 26	-173 $\pm$ 24	-172 $\pm$ 25
<u>L-NAME</u>	Rato										
	1	-58	-85	-53	-44	-29	-54	-58	-40	-47	-52
	2	-197	-199	-89	-175	-252	-186	-196	-204	-197	-252
	3	-141	-88	-115	-136	-104	-88	-81	-78	-73	-97
	4	-102	-90	-122	-131	-161	-148	-112	-72	-65	-92
	5	-110	-128	-83	-101	-87	-154	-130	-100	-147	-87
	6	-84	-133	-165	-177	-111	-176	-169	-162	-97	-89
	7	-121	-97	-139	-184	-183	-171	-141	-75	-74	-169
$\bar{X} \pm EPM$		-116 $\pm$ 17	-117 $\pm$ 15	-109 $\pm$ 14	-135 $\pm$ 19	-132 $\pm$ 27	-139 $\pm$ 19	-127 $\pm$ 18	-104 $\pm$ 22	-100 $\pm$ 20	-120 $\pm$ 26

Tabela 9. Valores individuais de c-Fos, área (mm²) e densidade de c-Fos (Nº Fos/mm²) nos neurônios do núcleo do trato solitário rostral (NTSr), intermediário (NTSi) e caudal (NTSc) de ratos controle, D-NAME e hipertensos L-NAME não submetidos à estimulação elétrica do NDA.

Grupo	Rato	<u>NTSr</u>			<u>NTSi</u>			<u>NTSc</u>		
		Nº Fos	Área	dens	Nº Fos	Área	dens	Nº Fos	Área	dens
<u>Controle</u>	1	6	0,39	15	11	0,30	37	5	0,34	15
	2	18	0,35	51	12	0,36	33	12	0,30	40
	3	11	0,40	28	9	0,38	24	8	0,34	24
	4	19	0,42	45	8	0,43	19	8	0,41	20
	5	9	0,36	25	9	0,37	24	12	0,41	29
	6	16	0,42	38	9	0,43	21	5	0,33	15
	7	18	0,47	38	16	0,50	32	16	0,39	41
$\bar{X} \pm \text{EPM}$		14 ± 2	0,40 ± 0	34 ± 5	11 ± 1	0,40 ± 0	27 ± 3	9 ± 2	0,36 ± 0	26 ± 4
<u>D-NAME</u>	1	16	0,44	36	5	0,41	12	11	0,36	31
	2	17	0,36	47	7	0,39	18	6	0,30	20
	3	9	0,48	19	9	0,40	23	8	0,34	24
	4	10	0,47	21	8	0,43	19	8	0,38	21
	5	15	0,39	38	11	0,37	30	12	0,41	29
$\bar{X} \pm \text{EPM}$		13 ± 1	0,43 ± 0	32 ± 5	8 ± 1	0,40 ± 0	20 ± 2	9 ± 2	0,36 ± 0	25 ± 2
<u>L-NAME</u>	1	5	0,45	11	19	0,46	41	11	0,42	26
	2	16	0,46	35	6	0,51	12	4	0,46	9
	3	18	0,38	47	7	0,42	17	6	0,44	14
	4	5	0,35	14	9	0,47	19	10	0,45	22
	5	10	0,50	20	23	0,41	56	21	0,52	40
	6	13	0,36	36	11	0,47	23	8	0,39	21
$\bar{X} \pm \text{EPM}$		11 ± 2	0,42 ± 0	37 ± 6	13 ± 3	0,46 ± 0	28 ± 7	10 ± 2	0,45 ± 0	22 ± 4

Tabela 10. Valores individuais de c-Fos, área (mm²) e densidade de c-Fos (Nº Fos/mm²) nos neurônios do núcleo do trato solitário rostral (NTSr), intermediário (NTSi) e caudal (NTSc) de ratos controle, D-NAME e hipertensos L-NAME submetidos ao protocolo de estimulação elétrica do NDA.

Grupo	Rato	<u>NTSr</u>			<u>NTSi</u>			<u>NTSc</u>		
		Nº Fos	Área	dens	Nº Fos	Área	dens	Nº Fos	Área	dens
<u>Controle</u>	1	9	0,44	20	18	0,41	44	26	0,47	55
	2	5	0,38	13	15	0,33	45	4	0,45	9
	3	20	0,55	36	28	0,59	47	22	0,42	52
	4	7	0,46	15	19	0,50	38	16	0,44	36
	5	6	0,39	15	28	0,47	60	26	0,45	58
	6	15	0,42	36	12	0,50	24	24	0,46	52
<u>$\bar{X} \pm \text{EPM}$</u>		<u>10 ± 2</u>	<u>$0,44 \pm 0$</u>	<u>23 ± 4</u>	<u>20 ± 3</u>	<u>$0,47 \pm 0$</u>	<u>43 ± 5</u>	<u>20 ± 3</u>	<u>$0,45 \pm 0$</u>	<u>44 ± 8</u>
<u>D-NAME</u>	1	13	0,45	29	15	0,39	38	20	0,47	43
	2	16	0,35	46	31	0,51	61	18	0,44	41
	3	20	0,45	44	29	0,59	49	21	0,46	46
	4	14	0,41	34	18	0,50	36	19	0,44	43
	5	11	0,39	28	25	0,47	53	20	0,45	44
<u>$\bar{X} \pm \text{EPM}$</u>		<u>15 ± 2</u>	<u>$0,41 \pm 0$</u>	<u>36 ± 4</u>	<u>24 ± 3</u>	<u>$0,49 \pm 0$</u>	<u>47 ± 5</u>	<u>20 ± 1</u>	<u>$0,45 \pm 0$</u>	<u>43 ± 1</u>
<u>L-NAME</u>	1	46	0,48	96	50	0,51	98	59	0,41	144
	2	35	0,39	90	48	0,44	109	35	0,40	88
	3	27	0,43	63	47	0,37	127	50	0,41	122
	4	13	0,44	30	42	0,43	98	39	0,41	95
	5	34	0,45	76	77	0,58	133	49	0,37	132
	6	20	0,40	50	35	0,32	109	31	0,34	91
	7	24	0,32	75	37	0,44	84	32	0,41	78
<u>$\bar{X} \pm \text{EPM}$</u>		<u>28 ± 4</u>	<u>$0,42 \pm 0$</u>	<u>48 ± 9</u>	<u>48 ± 5</u>	<u>$0,44 \pm 0$</u>	<u>108 ± 6</u>	<u>42 ± 4</u>	<u>$0,39 \pm 0$</u>	<u>107 ± 10</u>

Tabela 11. Valores individuais de c-Fos, área (mm²) e densidade de c-Fos (Nº Fos/mm²) nos neurônios do CVLM de ratos controle, D-NAME e hipertensos L-NAME submetidos, ou não, à estimulação elétrica do NDA.

<u>Sem EE do NDA</u>					<u>Com EE do NDA</u>		
Grupo	Rato	Nº Fos	Área	dens	Nº Fos	Área	dens
<u>Controle</u>	1	8	0,25	32	10	0,18	56
	2	6	0,23	26	10	0,20	50
	3	10	0,22	45	10	0,21	48
	4	10	0,21	48	15	0,21	71
	5	7	0,20	35	12	0,17	71
	6	6	0,21	29	13	0,25	52
	7	12	0,27	44	-	-	-
$\bar{X} \pm \text{EPM}$		14 ± 1	$0,23 \pm 0$	37 ± 3	12 ± 1	$0,20 \pm 0$	58 ± 4
<u>D-NAME</u>	1	7	0,17	41	10	0,23	43
	2	10	0,20	50	18	0,23	78
	3	8	0,22	36	10	0,24	42
	4	9	0,21	43	17	0,21	81
	5	11	0,20	55	14	0,17	82
$\bar{X} \pm \text{EPM}$		9 ± 2	$0,19 \pm 0$	46 ± 5	14 ± 4	$0,23 \pm 0$	61 ± 6
<u>L-NAME</u>	1	8	0,20	40	17	0,18	94
	2	6	0,17	35	21	0,18	117
	3	5	0,21	24	15	0,24	63
	4	7	0,22	32	7	0,19	37
	5	21	0,23	91	24	0,23	104
	6	13	0,21	62	11	0,23	48
	7	-	-	-	14	0,23	61
$\bar{X} \pm \text{EPM}$		10 ± 2	$0,21 \pm 0$	47 ± 10	16 ± 2	$0,21 \pm 0$	75 ± 11

Tabela 12. Valores individuais de c-Fos, área (mm²) e densidade de c-Fos (Nº Fos/mm²) nos neurônios do RVLM de ratos controle, D-NAME e hipertensos L-NAME submetidos, ou não, à estimulação elétrica do NDA.

<u>Sem EE do NDA</u>					<u>Com EE do NDA</u>		
Grupo	Rato	Nº Fos	Área	dens	Nº Fos	Área	dens
<u>Controle</u>	1	9	0,38	24	7	0,30	23
	2	8	0,25	32	10	0,34	29
	3	12	0,40	30	10	0,29	34
	4	10	0,31	32	15	0,30	50
	5	9	0,33	27	11	0,30	37
	6	8	0,32	25	11	0,29	38
	7	12	0,32	38	-	-	-
$\bar{X} \pm \text{EPM}$		10 ± 1	0,33 ± 0	30 ± 2	11 ± 1	0,30 ± 0	35 ± 4
<u>D-NAME</u>	1	2	0,31	6	4	0,32	13
	2	15	0,30	50	11	0,35	31
	3	11	0,40	28	9	0,29	31
	4	10	0,31	32	12	0,34	35
	5	9	0,33	27	7	0,36	19
$\bar{X} \pm \text{EPM}$		9 ± 2	0,31 ± 0	28 ± 7	8 ± 4	0,34 ± 0	26 ± 4
<u>L-NAME</u>	1	13	0,36	36	6	0,27	22
	2	13	0,32	41	4	0,37	11
	3	9	0,37	24	12	0,40	30
	4	8	0,32	25	12	0,39	31
	5	13	0,31	42	12	0,29	41
	6	4	0,27	15	13	0,34	38
	7	-	-	-	4	0,33	12
$\bar{X} \pm \text{EPM}$		10 ± 2	0,33 ± 0	30 ± 4	9 ± 2	0,34 ± 0	26 ± 5

Tabela 13. Valores individuais de c-Fos, área (mm²) e densidade de c-Fos (Nº Fos/mm²) nos neurônios do PVN parvocelular medial (PaMP) e posterior (PaPO) de ratos controle, D-NAME e hipertensos L-NAME não submetidos à estimulação elétrica do NDA.

Grupo	Rato	<u>PaMP</u>			<u>PaPO</u>		
		Nº Fos	Área	dens	Nº Fos	Área	dens
<u>Controle</u>	1	12	0,17	71	19	0,16	119
	2	11	0,23	49	18	0,18	100
	3	5	0,12	43	21	0,17	124
	4	17	0,21	81	10	0,15	67
	5	19	0,19	103	10	0,15	67
	6	3	0,09	38	10	0,16	63
	7	10	0,24	43	12	0,18	67
$\bar{X} \pm \text{EPM}$		11 ± 2	0,18 ± 0	61 ± 18	14 ± 2	0,16 ± 0	86 ± 10
<u>D-NAME</u>	1	10	0,20	71	19	0,15	127
	2	12	0,20	49	19	0,20	95
	3	11	0,13	43	21	0,17	124
	4	13	0,16	81	10	0,16	63
	5	17	0,19	103	12	0,15	80
$\bar{X} \pm \text{EPM}$		13 ± 1	0,18 ± 0	69 ± 11	16 ± 2	0,16 ± 0	97 ± 12
<u>L-NAME</u>	1	28	0,40	69	23	0,14	164
	2	23	0,35	64	12	0,18	67
	3	26	0,38	67	15	0,18	83
	4	7	0,16	44	11	0,18	61
	5	18	0,47	37	12	0,20	60
	6	30	0,46	65	-	-	-
$\bar{X} \pm \text{EPM}$		22 ± 3	0,4 ± 0	57 ± 11	15 ± 2	0,18 ± 0	87 ± 20

Tabela 14. Valores individuais de c-Fos, área (mm²) e densidade de c-Fos (Nº Fos/mm²) nos neurônios do PVN parvocelular medial (PaMP) e posterior (PaPO) de ratos controle, D-NAME e hipertensos L-NAME submetidos ao protocolo de estimulação elétrica do NDA.

Grupo	Rato	<u>PaMP</u>			<u>PaPO</u>		
		Nº Fos	Área	dens	Nº Fos	Área	dens
<u>Controle</u>	1	13	0,24	52	19	0,19	100
	2	9	0,18	50	3	0,16	19
	3	18	0,22	82	22	0,23	96
	4	19	0,27	72	7	0,13	54
	5	20	0,23	86	9	0,20	45
	6	17	0,27	62	-	-	-
$\bar{X} \pm \text{EPM}$		16 ± 2	0,23 ± 0	67 ± 12	12 ± 4	0,18 ± 0	63 ± 15
<u>D-NAME</u>	1	15	0,22	68	17	0,20	85
	2	7	0,19	37	6	0,15	40
	3	18	0,19	95	20	0,22	91
	4	21	0,26	81	10	0,15	67
	5	18	0,25	72	8	0,21	38
$\bar{X} \pm \text{EPM}$		16 ± 2	0,22 ± 0	71 ± 9	12 ± 3	0,19 ± 0	64 ± 11
<u>L-NAME</u>	1	29	0,46	62	25	0,16	156
	2	30	0,36	83	21	0,16	131
	3	16	0,42	38	15	0,16	94
	4	24	0,38	63	19	0,20	95
$\bar{X} \pm \text{EPM}$		25 ± 3	0,4 ± 0	62 ± 19	20 ± 2	0,17 ± 0	119 ± 15

Tabela 15. Valores individuais de c-Fos, área (mm²) e densidade de c-Fos (Nº Fos/mm²) nos neurônios do PVN magnocelular anterior (PaMA), medial (PaMM) e lateral (PaLM) de ratos controle, D-NAME e hipertensos L-NAME não submetidos à estimulação elétrica do NDA.

Grupo	Rato	<u>PaMA</u>			<u>PaMM</u>			<u>PaLM</u>		
		Nº Fos	Área	dens	Nº Fos	Área	dens	Nº Fos	Área	dens
<u>Controle</u>	1	15	0,15	100	1	0,10	10	3	0,10	30
	2	14	0,18	78	9	0,11	82	7	0,07	101
	3	20	0,16	125	8	0,07	118	7	0,06	123
	4	22	0,18	122	2	0,08	26	8	0,06	138
	5	8	0,17	47	6	0,09	65	2	0,06	33
	6							2	0,06	34
	$\bar{X} \pm \text{EPM}$	16 ± 2	0,17 ± 0	94 ± 15	5 ± 2	0,09 ± 0	60 ± 19	5 ± 1	0,07 ± 0	77 ± 20
<u>D-NAME</u>	1	18	0,15	120	7	0,11	64	4	0,09	44
	2	12	0,17	71	4	0,10	40	6	0,08	75
	3	20	0,16	125	8	0,07	118	8	0,06	140
	4	21	0,19	111	5	0,09	56	8	0,10	80
	5	9	0,16	56	4	0,09	43	4	0,06	67
	$\bar{X} \pm \text{EPM}$	16 ± 2	0,17 ± 0	96 ± 14	6 ± 2	0,09 ± 0	64 ± 14	6 ± 2	0,07 ± 0	81 ± 15
<u>L-NAME</u>	1	17	0,11	155	8	0,07	114	0	0,05	0
	2	17	0,15	113	3	0,09	33	4	0,06	67
	3	13	0,13	100	25	0,14	179	2	0,07	29
	4	5	0,19	26	1	0,12	8	12	0,12	100
	5	5	0,13	38	23	0,15	153	5	0,08	63
	6	9	0,14	64	15	0,15	100	-	-	-
	$\bar{X} \pm \text{EPM}$	11 ± 2	0,14 ± 0	83 ± 20	13 ± 4	0,12 ± 0	98 ± 27	5 ± 2	0,08 ± 0	51 ± 17

Tabela 16. Valores individuais de c-Fos, área (mm²) e densidade de c-Fos (Nº Fos/mm²) nos neurônios do PVN magnocelular anterior (PaMA), medial (PaMM) e lateral (PaLM) de ratos controle, D-NAME e hipertensos L-NAME submetidos ao protocolo de estimulação elétrica do NDA.

Grupo	Rato	<u>PaMA</u>			<u>PaMM</u>			<u>PaLM</u>		
		Nº Fos	Área	dens	Nº Fos	Área	dens	Nº Fos	Área	dens
<u>Controle</u>	1	34	0,22	155	8	0,10	80	6	0,09	70
	2	20	0,13	154	13	0,09	146	2	0,09	22
	3	19	0,15	127	11	0,10	110	6	0,07	81
	4	25	0,16	156	6	0,10	60	5	0,08	64
	5	20	0,17	118	14	0,08	182	8	0,07	121
	6	-	-	-	16	0,13	123	1	0,10	10
$\bar{X} \pm \text{EPM}$		24 ± 3	0,17 ± 0	142 ± 8	11 ± 2	0,10 ± 0	117 ± 18	5 ± 1	0,08 ± 0	61 ± 17
<u>D-NAME</u>	1	30	0,18	167	10	0,12	83	6	0,07	86
	2	25	0,16	156	9	0,09	101	4	0,09	45
	3	22	0,14	157	13	0,11	118	4	0,09	44
	4	23	0,17	135	8	0,10	80	5	0,06	83
	5	21	0,19	111	15	0,13	115	7	0,07	106
$\bar{X} \pm \text{EPM}$		24 ± 2	0,17 ± 0	145 ± 10	11 ± 1	0,11 ± 0	100 ± 8	5 ± 1	0,07 ± 0	73 ± 12
<u>L-NAME</u>	1	18	0,18	100	19	0,12	158	1	0,09	11
	2	34	0,18	189	26	0,12	217	8	0,07	110
	3	31	0,16	194	16	0,12	133	4	0,10	40
	4	21	0,16	131	28	0,17	165	9	0,08	114
	5	22	0,16	138	-	-	-	-	-	-
	6	24	0,17	141	-	-	-	-	-	-
	7	32	0,17	188	-	-	-	-	-	-
$\bar{X} \pm \text{EPM}$		26 ± 2	0,17 ± 0	154 ± 14	22 ± 3	0,13 ± 0	168 ± 17	6 ± 2	0,08 ± 0	69 ± 26

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](#)