

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

Silvana Lopes da Silva

**Mecanismos envolvidos nas respostas
cardiovasculares à microinjeção de L- Prolina no
terceiro ventrículo de ratos não anestesiados**

Ribeirão Preto – SP

2010

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

SILVANA LOPES DA SILVA

**Mecanismos envolvidos nas respostas
cardiovasculares à microinjeção de L- Prolina no
terceiro ventrículo de ratos não anestesiados**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. Fernando Morgan de Aguiar Corrêa.

Ribeirão Preto – SP

2010

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Silvana Lopes da Silva

Título: Mecanismos envolvidos nas respostas cardiovasculares à microinjeção de L-Prolina no terceiro ventrículo de ratos não anestesiados

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Farmacologia

Aprovado em: 09/08/2010

Banca Examinadora

Prof. Dr. Fernando Morgan de Aguiar Corrêa. Instituição: FMRP-USP.

Julgamento: Aprovado

Assinatura: _____

Prof. Dr. Rúbens Fazan Júnior.

Instituição: FMRP-USP

Julgamento: Aprovado

Assinatura: _____

Prof. Dr. Emerson Lopes Olivares.

Instituição: IB/DCF – UFRRJ

Julgamento: Aprovado

Assinatura: _____

“Nosso corpo pertence Àquele que o fez, e estamos no dever de tornar-nos inteligentes com relação aos melhores meios de preservá-lo da ruína.” Ellen G. White.

“A saúde é um grande tesouro. É a mais valiosa posse concedida aos mortais. Riqueza, honra ou cultura custam muito caro se forem adquiridas a expensas do vigor da saúde. Nenhuma dessas realizações pode trazer felicidade, se não houver saúde.” *Ellen G. White*

DEDICATÓRIA

Dedico,

A Deus, por me conceder o dom da vida, proporcionar que meus objetivos fossem alcançados e de maneira maravilhosa tem me agraciado, colocando pessoas tão especiais em minha vida.

Aos meus pais, Silvio e Célia Lopes da Silva pelo amor, dedicação, doação de suas vidas em meu favor e por incentivarem meus estudos não medindo esforços para que este dia tornasse uma realidade em minha vida.

Aos meus irmãos, Anderson e Emerson por dividirem alegria, emoções, carinhos e sem o apoio de vocês, talvez não ocorresse. Agradeço por estarem sempre torcendo por meu sucesso.

A América Scopinho minha fiel escudeira e tutora, que acompanhou de perto a elaboração desse trabalho. Ela que é minha madrinha intelectual. Agradeço cada idéia, auxílio e também pelos momentos de descontrações em que juntas desfrutamos.

A pessoa que por ultimo entrou em minha vida, meu namorado, Zacarias França Azevedo Júnior. Meu grande amigo e companheiro, que está ao meu lado por vezes me atrapalhando, outras ajudando. Todavia, me apóia e vibra por minhas conquistas.

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Fernando Morgan de Aguiar Côrrea por ter me aceitado como sua aluna, confiado esse trabalho em minhas mãos, pela orientação no desenvolver desse trabalho, por sua conduta profissional e competência, as quais servem de exemplo para a minha formação. A você Prof. Morgan a minha admiração e gratidão.

Aos professores do DCF da UFRRJ: Prof. Dr. Wellington da Silva Côrtes, Prof. Dr. Emerson Lopes Olivares, Prof. Dr. Frederico Vanderlinde e Prof. Dr. Luiz Carlos Reis pelos ensinamentos durante a graduação que muito contribuíram para o meu crescimento profissional. Em especial, ao Prof. Dr. Wellington da Silva Côrtes por ter contribuído muito no início da minha vida científica. A vocês, minha admiração como mestres e pesquisadores.

Aos membros da banca examinadora: Prof. Dr. Emerson Lopes Olivares e Prof. Dr. Rúbens Fazan Júnior por terem dedicado tempo à avaliação desse trabalho e pelas sugestões que enriqueceram ainda mais o seu conteúdo.

Ao Prof. Dr. Hélio Zangrosi Júnior pela acessória e colaboração, visando a melhor realização dessa dissertação.

A Prof.^a Dr.^a Gislaine Garcia Pelosi Gomes pelo auxílio no início da realização desse trabalho e amizade.

Ao Prof. Dr. Leonardo Resstel pela contribuição na minha formação e amizade.

A todos os professores do Departamento de Farmacologia do curso de pós-graduação desta faculdade, por contribuírem para o meu desenvolvimento profissional.

Aos funcionários Sônia Andrade, José Waldik Ramon e Fátima Petean, por toda a competência, disponibilidade e atenção com que atendem as nossas necessidades burocráticas.

A Idália I.B. Aguiar, Ivanilda A. C. Fortunato e Simone S. Guilhaume, por me ensinarem e auxiliarem com suas habilidades técnicas.

Eliana e Maria Inês pelos serviços prestados ao biotério, cuidando dos nossos animais.

A Diva, pelos cuidados com nossas vidrarias, pela alegria que contagia todo o departamento.

Aos meus amigos e companheiros de laboratório: Alessandra Fedoce, América Scopinho, Cristiane Busnardo, Carlos Crestani, Daniel Reis, Denise Fabri, Eduardo Fortaleza, Fernando Alves, Felipe Vilela, Milena Deolindo, Nilson Ferreira, Sara Hott e Theofanes Neto, por me proporcionarem momentos agradáveis e me ajudarem sempre que precisei.

A todos os amigos de pós-graduação da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, pela amizade. Em especial, ao David Malvar, Sabrina Graziani e Glaucia Reis pelo grande apoio prestados a mim no período antecedente ao ingresso a pós-graduação, a vocês meu muito obrigado.

A seção de moradia da USP/Ribeirão Preto, ao trabalho prestado pelas assistentes sociais e ao auxílio moradia.

Aos amigos que conviveram comigo na casa de pós-graduação II da USP/Ribeirão Preto, durante o período de realização desse trabalho: Izabel Eleotério, Leila Márcia, Paula Souza, Juliana Scriptori, Iraci João, Cyntia Rustiguel, Naira Maciel, Leandro Máximo, Leandro Nascimento, Camila Coelho, Flavia Toledo, Jaciana Saraiva, Iracema Araújo, André Mecawi, Elize Cunha, Viviana Henriques, Hildenberg Santiago, Diego Cortés, Ricardo, Gislaine Almeida, Lourdes Garcia, Simone Silva, Luciana, Marco, Thais, Suzana, Nathália e Alexsandra, por terem sido a minha grande família em Ribeirão Preto, aos bons momentos compartilhados através da boa convivência e da amizade.

A todos os meus familiares que sempre me apoiaram e torceram pelo meu sucesso.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro durante a realização deste trabalho.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho

SUMÁRIO

LISTA DE TABELA E FIGURAS.....	
LISTA DE ABREVIACÕES.....	
RESUMO.....	
ABSTRACT.....	
1. INTRODUÇÃO.....	22
2. OBJETIVOS.....	33
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	35
3.1. Animais.....	36
3.2. Técnica de implante de cnula guia	36
3.3. Canulação da artéria e veia femorais.....	38
3.4. Registro de presso arterial e frequência cardcia.....	39
3.5. Microinjeção de drogas no 3 V.....	39
3.6. Drogas utilizadas.....	40
3.7. Determinação anatmica dos stios de injeção de droga.....	41
3.8. Anlise estatstica.....	42
4. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS.....	43
4.1. Efeito da administração de diferentes doses de L- Pro no 3 V de ratos no anestesiados sobre a presso arterial e frequência cardcia (curva dose resposta).....	44
4.2. Efeito do pr-tratamento sistmico com pentolnio sobre a resposta cardiovascular  microinjeção de L- Pro no 3 V de ratos no anestesiados.....	44
4.3. Efeito do pr-tratamento sistmico com dTir(CH ₂) ₅ (Me)AVP sobre a resposta cardiovascular  microinjeção de L- Pro no 3 V de ratos no anestesiados.....	44

5. RESULTADOS.....	46
5.1. Determinação dos sítios de injeção.....	47
5.2. Efeito da administração de diferentes doses de L- pro no 3 V sobre a pressão arterial e frequência cardíaca de ratos não anestesiados (curva dose-resposta).....	48
5.3. Efeito do pré-tratamento com pentolínio sobre as respostas cardiovasculares à microinjeção de L- pro no 3 V de ratos não anestesiados.....	54
5.4. Efeito do pré tratamento com dTyr(CH ₂) ₅ (Me)AVP sobre as respostas cardiovasculares à microinjeção de L- Pro no 3 V de ratos não anestesiados.....	58
6. DISCUSSÃO.....	61
7. CONCLUSÃO.....	68
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70
9. ANEXO.....	76

LISTA DE TABELA E FIGURAS

TABELA 1 – Variações máximas na pressão arterial média (Δ PAM) e frequência cardíaca (Δ FC), em resposta a microinjeção de diferentes concentrações de L-Prolina (L- Pro) no 3 V de ratos não-anestesiados.....50

FIGURA 1 – Representação esquemática da via de biossíntese de L-Pro no cérebro de roedores, proposta por Yoneda e Roberts, 1992.....24

FIGURA 2 – Representação diagramática da organização neuroanatômica do 3 V e áreas circunvizinhas. A – corte frontal do cérebro do rato. B – Corte sagital do cérebro do rato. Paxinos e Watson, 2007.....31

FIGURA 3 – Vista ventral de um cérebro de rato, representativo do grupo, mostrando a distribuição de 0,5 μ L do corante azul de Evan injetado no 3V.....47

FIGURA 4 – Efeito da microinjeção de diferentes doses de L- Prolina (círculos pretos, n= 18 ou líquido cefalorraquidiano artificial (LCA) (círculos brancos, n= 6) no 3 V de ratos não anestesiados, sobre a pressão arterial média (Δ PAM) e a frequência cardíaca (Δ FC). As doses injetadas foram: 0,003; 0,03; 0,1; 0,3; 0,6; 0,9; 1,8 μ mol/0,5 μ L. As curvas dose-respostas foram geradas por análise de regressão não linear sigmoidal e foram significativamente diferentes (Δ PAM, $r^2= 0,93$ e Δ FC, $r^2= 0,91$). Os círculos (brancos e pretos) representam as médias e as barras o EPM.....51

FIGURA 5 – Registros de pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) de um rato representativo do grupo, mostrando o efeito da microinjeção de L- Pro (0,6 μ mol/0,5 μ L) no 3 V.....52

FIGURA 6 – **A)** Variação máxima na pressão arterial média (Δ PAM) e frequência cardíaca (Δ FC) após microinjeção de L- Pro 0,6 μ mol/0,5 μ L (coluna preta) ou de 0,5 μ L de LCA (coluna branca) no 3 V de ratos não anestesiados. As colunas representam as médias e as barras o EPM, n= 6, *p < 0,001, test t Student pareado. **B)** Variação da pressão arterial media (Δ PAM) e frequência cardíaca (Δ FC) ao longo do tempo após microinjeção de L- Pro 0,6 μ mol/0,5 μ L (círculos pretos, n= 6) ou 0,5 μ L de LCA (círculos brancos, n= 6) no 3 V. As injeções de L- Pro foram feitas no tempo 0. Pontos representam as médias e as barras o EPM, *P < 0,05, two-way ANOVA, pós-teste de Bonferroni.....53

FIGURA 7 – Pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) antes (basal, colunas brancas) e após a microinjeção de L- Pro 0,6 μ mol/0,5 μ L, colunas pretas) no 3 V, registradas antes e após o pré-tratamento com o bloqueador ganglionar pentolínio (PE, 5mg/kg i.v), em ratos não anestesiados, n= 8. As colunas representam as médias e as barras o EPM; *#p < 0,001, test t de Student pareado. *p < 0,001 comparando basal vs L- Pro; # p < 0,001 comparando basal antes e após pré-tratamento com pentolínio; ** p < 0,001 comparando L- Pro antes e após pré tratamento com pentolínio e ns: não significativo.....55

FIGURA 8 – A) Variação máxima da pressão arterial média (Δ PAM) e frequência cardíaca (Δ FC) causada pela microinjeção de L-Pro (0,6 μ mol/0,5 μ L) no 3 V, antes (colunas brancas) e após (colunas pretas) o pré-tratamento i.v. com pentolínio (PE, 5 mg/kg), de ratos não anestesiados. As colunas representam as médias \pm EPM; n= 8; *p < 0,001; test t de Student pareado. **B)** Variação da pressão arterial média (Δ PAM) e frequência cardíaca (Δ FC) ao longo do tempo após microinjeção de L-Pro (0,6 μ mol/0,5 μ L) no 3 V, antes (círculos brancos) e após (círculos pretos) o pré-tratamento com pentolínio (PE, 5 mg/kg). As microinjeções foram feitas no tempo 0 (zero). Os pontos representam as médias \pm EPM; *p < 0,05; two-way ANOVA, pós-teste de Bonferroni.....56

FIGURA 9 – Registros de pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM), e frequência cardíaca (FC) de um rato representativo do grupo, mostrando o efeito da microinjeção de L- Pro (0,6 μ mol/0,5 μ L) no 3 V antes e após a injeção i.v de pentolínio (PE, 5 mg/kg).....57

FIGURA 10 – A) Variação máxima da pressão arterial média (Δ PAM) e frequência cardíaca (Δ FC) causada pela microinjeção de L-Pro (0,6 μ mol/0,5 μ L) no 3 V antes (colunas brancas) e após (colunas pretas) o pré tratamento com dTyr(CH₂)₅(Me)AVP (d-Tir, 50 μ g/kg) i.v de ratos não anestesiados. As colunas representam as médias e as barras o EPM, n= 6, *p < 0,01, test t de Student pareado. **B)** Variação da pressão arterial media (Δ PAM) e frequência cardíaca (Δ FC) ao longo do tempo após microinjeção de L-Pro (0,6 μ mol/0,5 μ L) no 3 V, antes (círculos brancos) e após (círculos pretos) o pré-tratamento i.v. com dTyr(CH₂)₅(Me)AVP (d-Tir, 50 μ g/kg). As microinjeções foram feitas no tempo 0 (zero). Os pontos representam as médias e as barras o EPM; *p < 0,05; two-way ANOVA, pós-teste de Bonferroni.....59

FIGURA 11 – Registros de pressão arterial púlsatil (PAP), pressão arterial média (PAM), e frequência cardíaca (FC) de um rato representativo do grupo, mostrando o efeito da microinjeção de L- Pro (0,6 μ mol/0,5 μ L) no 3 V antes e após a injeção i.v de dTyr(CH₂)₅(Me)AVP (d-Tir, 50 μ g/kg).....60

LISTA DE ABREVIACOES

AMPA – ácido alfa-amino-3-hidroxi-metil-4-isoxazolepropionico

APC – área pressora caudal

AP-7 – 2-amino-7-phosphonoheptanoic acid

AP-5 – D-(-)-2-amino-5-phosphonopentanoic acid

BVL – bulbo ventrolateral

BVLc – bulbo ventrolateral caudal

BVLr – bulbo ventrolateral rostral

CNQX – 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione

CPP – (+) -3-3(2-carboxypiperazin-4yl)-propyl-1-phosphonic acid

CGS 19755 – cis-4-(phosphonomethyl) piperidine-2-carboxylic acid

EPM – erro padrão da média

FC – frequência cardíaca

GABA – ácido gama-aminobutírico

HA-966 – 1-hidroxi-3-amino-pyrrolidone-2

[H³]Pro – Prolina tritiada

LCA – líquido cefalorraquidiano artificial

L-Glu – L-Glutamato

L-Pro – L-Prolina

MK-801 – 11-dihidro-5H-dibenzo[a,d]cyclohepten-5,10-imine

NMDA – N-metil-D-aspartato

NPV – núcleo paraventricular

NSO – núcleo supra-óptico

NTS – núcleo do trato solitário

OAT – Ornitina -Aminotrasferase

PAM – pressão arterial média

PAP – pressão arterial pulsátil

PCR – reação em cadeia da polimerase

P5C – L- Δ -pyrroline-5-carboxylic acid

P5CR – pyrroline-5-carboxylate reductase

SNC – Sistema Nervoso Central

3 V – terceiro ventrículo

4 V – quarto ventrículo

RESUMO

Lopes-Silva, S. Mecanismos envolvidos nas respostas cardiovasculares à microinjeção de L- Prolina no terceiro ventrículo de ratos não anestesiados. 2010. Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

A L- Prolina (L- Pro) é um aminoácido não essencial, endógeno, considerado como possível neurotransmissor ou neuromodulador do SNC. O terceiro ventrículo (3 V) é uma cavidade do cérebro, parte do sistema ventricular cerebral, contigua ao hipotálamo, região na qual foi detectada a existência de sistemas de recaptação e liberação de L- Pro. O objetivo deste estudo foi verificar os efeitos cardiovasculares causados pela microinjeção de L- Pro no 3 V e identificar os possíveis mecanismos periféricos envolvidos nestas respostas. A L- Pro foi injetada em um volume de 0,5 µL no 3 V. A microinjeção de L- Pro no 3 V causou respostas pressora e bradicárdica, dose-dependente, quando aplicada em ratos não anestesiados. As respostas cardiovasculares desencadeadas pela microinjeção de L- Pro no 3 V foram bloqueadas pela pré-tratamento endovenoso com dTyr(CH₂)₅(Me)AVP, um antagonista vasopressinérgico, sugerindo o envolvimento da liberação sistêmica de vasopressina na mediação destas respostas. A resposta pressora à L- Pro no 3 V não foi bloqueada pelo pré-tratamento sistêmico com o bloqueador ganglionar pentolínio, excluindo a possibilidade de uma mediação simpática da resposta pressora. Entretanto, a resposta bradicárdica foi inibida pelo bloqueio ganglionar, sugerindo ser esta uma resposta reflexa, conseqüente ao aumento da pressão arterial. Esta é a primeira evidência de efeitos cardiovasculares da administração de L- Pro em estruturas suprabulbares, bem como dos possíveis mecanismos periféricos envolvidos na sua mediação. Em conclusão, os presentes resultados indicam que a microinjeção de L- Pro no 3 V causa respostas pressora e bradicárdica de maneira dose-dependente, e que esta é mediada por liberação sistêmica de vasopressina.

Palavras chaves: L- Prolina (L- Pro), terceiro ventrículo (3 V), sistema cardiovascular, vasopressina.

ABSTRACT

Lopes-Silva, S. **Mechanisms involved in the cardiovascular response to L-Proline microinjection into the third ventricle of unanesthetized rats.** School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

L-Proline (L-Pro) is an endogenous nonessential amino acid that is considered as a putative neurotransmitter or neuromodulator in the CNS. The third ventricle (3 V) is a cavity of the brain in contact with the hypothalamus, a region in which was detected the existence of L-Pro uptake and release systems. The aim of this study was to investigate the cardiovascular effects caused by the microinjection of L-Pro into the 3 V, and to identify which peripheral mechanisms are involved in the genesis of these effects. L-Pro was injected into the 3 V in a volume of 0.5 μ L. The microinjection of L-Pro into the 3 V caused dose-related pressor and bradycardiac responses in unanesthetized rats. The cardiovascular responses observed after the microinjection of L-Pro into the 3 V were blocked by the intravenous pretreatment with the V1 vasopressin receptor antagonist dTyr(CH₂)₅(Me)AVP (50 μ g/kg), thus suggesting an involvement of systemically released vasopressin in the mediation of these responses. The pressor response to L-Pro was potentiated by the intravenous pretreatment with the ganglion blocker pentolinium (5 mg/Kg), thus excluding a possible mediation by the sympathetic nervous system. The bradycardiac response to the microinjection of L-Pro into the 3 V was abolished by either the pretreatment with the vasopressin antagonist or the ganglion blocker pentolinium, thus suggesting a reflex origin, consequent upon the MAP increase. This is the first evidence on the cardiovascular effects of L-Pro injected into supramedullary structures, as well as on the peripheral mechanisms involved in its mediation. In conclusion, our results indicate that the microinjection of L-Pro into the 3 V evokes dose-related pressor and bradycardiac responses that are mediated by vasopressin release into the systemic circulation.

Keywords: L-Proline (L-Pro), third ventricle (3 V), cardiovascular system, vasopressin.

1. INTRODUÇÃO

A L-Prolina (L-Pro) é um aminoácido não essencial, endógeno. Existem evidências científicas sugerindo que a L-Pro possa ser um neuromodulador ou um neurotransmissor no sistema nervoso central (SNC) de mamíferos (SNYDER *et al.*, 1973; MULDER e SNYDER, 1974; BALCAR *et al.*, 1976; FELIX e KUNZLE, 1976; YONEDA e ROBERTS, 1982; HAUPTMANN *et al.*, 1983; FREMEAU *et al.*, 1992; RENICK *et al.*, 1999).

O principal precursor de L-Pro no cérebro de ratos é a L-ornitina. A L-ornitina através da enzima ornitina-aminotrasferase (OAT) é convertida ao semialdeído-L-glutâmico, que espontaneamente se transforma em ácido L-pirrolina-5-carboxílico (P5C), o qual através da enzima pirrolina-5-carboxilato redutase (P5CR) é convertido em L-Pro (YONEDA e ROBERTS, 1982) (FIGURA 1). Esta via biossintética do SNC pode ser regulada pela própria L-Pro, num mecanismo de retroalimentação negativa, no qual esse aminoácido provavelmente inibe seletivamente a P5CR e, conseqüentemente, causa redução da taxa de conversão de P5C em L-Pro (YONEDA e ROBERTS, 1982) (FIGURA 1).

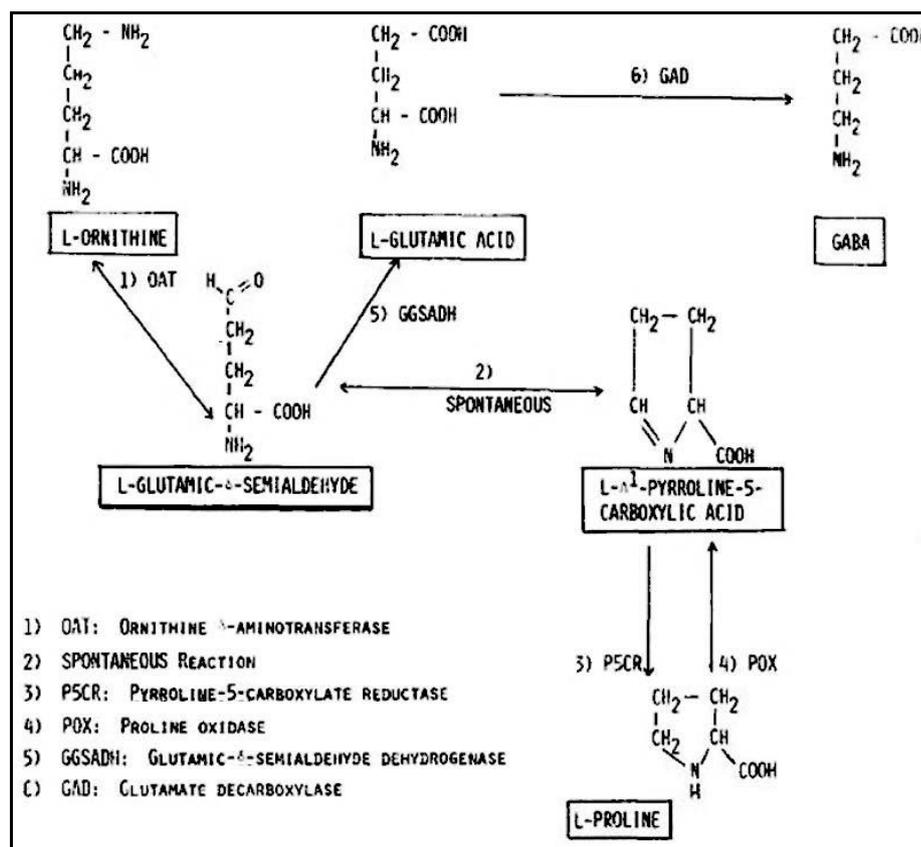


FIGURA 1 – Representação esquemática da via de biossíntese de L-Pro no cérebro de roedores, proposta por Yoneda e Roberts (1992).

Estudos realizados em sinaptossomas e fatias de cérebro de ratos demonstraram a existência de um sistema de captação de L-Pro sódio-dependente, em terminais nervosos de várias regiões do SNC. Esse sistema de captação é de alta afinidade, e transporta o aminoácido L-Pro para dentro de um compartimento intraneuronal (SNYDER *et al.*, 1973; BALCAR *et al.*, 1976; HAUPTMANN *et al.*, 1983) de forma similar ao sistema de captação dos aminoácidos excitatórios, tais como o ácido glutâmico e o ácido aspártico, e de inibitórios, tais como o ácido gama-aminobutírico (GABA) e a glicina (BENNETT *et al.*, 1972; LOGAN e SNYDER, 1972; SNYDER *et al.*, 1973). Além disso, a L-Pro pode ser liberada por despolarização causada por exposição ao íon potássio, de maneira cálcio-dependente (SNYDER *et al.*, 1973; MULDER e SNYDER, 1974; BALCAR *et al.*, 1976; HAUPTMANN *et al.*,

1983), assim como ocorre com os aminoácidos neurotransmissores L-glutamato (L-Glu), L-aspartato, GABA e glicina (SNYDER *et al.*, 1973; MULDER e SNYDER, 1974).

Hauptmann e colaboradores investigaram a captação de L-Pro por sinaptossomas isolados de diferentes regiões do cérebro de rato. Esses autores constataram que a taxa mais elevada de transporte e o maior acúmulo de L-Pro eram observados em sinaptossomas do mesencéfalo, corpo estriado, hipocampo e hipotálamo, e que baixas taxas de transporte e menor acúmulo ocorriam no córtex, tronco cerebral e cerebelo (HAUPTMANN, *et al.*, 1983). Esses resultados sugerem que o sistema de captação de L-Pro, em sinaptossomas, exibe uma distribuição heterogênea no SNC de roedores. Além disso, Fremeau e colaboradores (1992) clonaram o transportador de L-Pro de uma biblioteca de cDNA, identificado por uma estratégia de PCR baseado na homologia com transportadores de GABA e norepinefrina, Na^+ -(e Cl^-) dependente, de alta afinidade, o qual é expresso por muitas sub-populações de vias glutamatérgicas suprabulbares do cérebro de rato, sugerindo um possível papel sináptico para a L-Pro em vias excitatórias no SNC. A proteína transportadora de L-Pro foi localizada em membranas de pequenas vesículas sinápticas de sub-populações de terminais de axônios pré-sinápticos, formando sinapses do tipo excitatória assimétrica com espinhas dendríticas nos núcleos caudado e putâmen, e na região CA1 do hipocampo (RENICK *et al.*, 1999).

Um estudo eletrofisiológico observou que em um potencial fixado em -62 mV, concentrações milimolares de L-Pro causaram uma corrente para dentro do terminal sináptico que foi parcialmente antagonizada pelo AP-5, um antagonista seletivo de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA; por CNQX, antagonista de receptores glutamatérgicos AMPA/cainato e por estriquinina, antagonista de receptores de

glicina. A corrente evocada pela L-Pro foi completamente abolida pela combinação dos três antagonistas (AP-5, CNQX e estriquinina), sugerindo que a L-Pro simultaneamente ativa três classes de receptores nos neurônios do corno dorsal da medula espinal, os receptores ionotrópicos glutamatérgicos NMDA e não-NMDA (AMPA/cainato), e os receptores de glicina sensíveis a estriquinina (HENZI *et al.*, 1992). Além disso, estudos de ligação verificaram que os antagonistas competitivos de receptores NMDA (AP7, CPP e CGS 19755) e o bloqueador do canal do receptor NMDA (MK-801), na concentração de 10^{-4} M inibiram a ligação da [3 H]-L-Pro em membranas sinápticas do córtex e mesencéfalo de rato em similar extensão, indicando que os receptores glutamatérgicos NMDA medeiam os efeitos da L-Pro (AULT *et al.*, 1987; CORDERO *et al.*, 1991; ORTIZ *et al.*, 1997). Por outro lado, elevadas concentrações de L-Pro não inibiram a ligação do [3 H]MK-801 em membranas sinápticas do mesencéfalo e córtex cerebral de ratos, sugerindo que a L-Pro não interage com o canal do receptor NMDA, apesar dos efeitos que o MK-801 tem sobre a ligação da [3 H]-L-Pro (ORTIZ *et al.*, 1997). O agonista parcial do sítio de glicina, HA-966 inibiu aproximadamente 50% da ligação da [3 H]-L-Pro em membranas sinaptossomais do cérebro de rato, revelando outro sítio de interação prolina-glutamato. Reciprocamente, concentrações milimolares de L-Pro inibiram a ligação de [3 H]glicina, sugerindo que a L-Pro possa interagir no sítio modulatório de glicina no receptor NMDA (ORTIZ *et al.*, 1997). Entretanto, existem evidências sugerindo que o sítio da L-Pro não seja o mesmo do L-Glu, uma vez que a ligação específica da L-Pro em membranas sinápticas do hipocampo não foi significativamente deslocada pelos aminoácidos excitatórios L-Glu e L-aspartato (GREENE *et al.*, 1986). Portanto, pode ser possível a existência de um receptor específico de L-Pro que é sensível aos antagonistas de receptores ionotrópicos

glutamatérgicos. Apesar das evidências descritas acima, o exato sítio de ação da L-Pro ainda permanece desconhecido.

Estudos de imunohistoquímica mostraram vários grupos de neurônios fortemente imunorreativos à L-Pro no núcleo arqueado, no núcleo supra-óptico do hipotálamo, na área postrema e no tronco cerebral (TAKEMOTO e SEMBA, 2006), estruturas conhecidas por modularem o sistema cardiovascular de ratos.

O sistema cardiovascular garante uma distribuição adequada do fluxo sanguíneo aos diferentes órgãos e tecidos do corpo, desempenhando importante função na manutenção da homeostase. O controle geral do sistema cardiovascular é organizado de forma hierárquica e, segundo Folkow, pode ser dividido em três níveis: controles locais, exercidos pelas atividades miogênicas do músculo liso vascular e do miocárdio, assim como por substâncias vasoativas liberadas pelo endotélio vascular; controle exercido por estruturas neurais bulbares e controle exercido por centros neurais suprabulbares (FOLKOW, 1987). Além desses fatores envolvidos no controle do sistema cardiovascular podemos destacar também fatores humorais tais como a vasopressina e o sistema renina-angiotensina que promovem o ajuste da pressão arterial em longo prazo, tanto por alterar o balanço hídrico e conseqüentemente o volume sanguíneo, quanto por possuir atividade vasoconstrictora (COWLEY *et al.*, 1983; COWLEY e LIARD, 1988; SZCZEPANSKA-SADOWSKA, 1996).

O SNC tem fundamental importância no controle da pressão arterial, sendo que centros bulbares, tais como o núcleo do trato solitário (NTS), núcleo ambíguo, núcleo dorsal do vago e as regiões rostroventrolateral (BVLr) e caudoventrolateral (BVLc) são responsáveis pela manutenção do tônus pressório geral e pelo controle

instantâneo da pressão arterial e frequência cardíaca (CHALMERS e PILOWSKY, 1991). Os neurônios do BVLr determinam a frequência de despolarização dos neurônios pré-ganglionares simpáticos envolvidos na manutenção do tônus vascular (VERBERNE e OWENS, 1998) e medeiam os componentes simpáticos dos reflexos cardiovasculares (GUYNET, 1990). Por outro lado, a atividade eferente parassimpática tem origem no núcleo dorsal do vago e no núcleo ambíguo, sendo o componente parassimpático dos reflexos cardiovasculares gerado principalmente no núcleo ambíguo. Tais reflexos, os quais incluem o barorreflexo arterial, o quimiorreflexo e o reflexo cardiopulmonar, permitem ajustes instantâneos da pressão arterial em respostas a alterações posturais, respiratórias e de volume sanguíneo respectivamente (GOLDSTEIN, 1991).

Efeitos centrais da L-Pro sobre o sistema cardiovascular foram inicialmente descritos por Takemoto (1990). Este autor observou que injeção de L-Pro, na cisterna magna de ratos não anestesiados, causava aumento da pressão arterial e diminuição da frequência cardíaca (TAKEMOTO, 1990), enquanto o seu isômero óptico, a D-prolina não causou alterações significativas sobre a pressão arterial e a frequência cardíaca, sugerindo uma especificidade óptica à L-Pro sobre os efeitos cardiovasculares causados por sua microinjeção na cisterna magna e no NTS (TAKEMOTO, 1995; 2001). A injeção intracisternal de L-Pro causou aumento da pressão arterial através da vasoconstrição no leito vascular da artéria mesentérica superior e renal, e secundariamente bradicardia via o barorreflexo. Essas respostas desencadeadas pela L-Pro foram abolidas pelo pré-tratamento intravenoso (i.v.) com um antagonista de receptor vasopressinérgico do tipo V1, sugerindo que a liberação de vasopressina sistêmica seria o principal mecanismo periférico envolvido na mediação destas respostas (TAKEMOTO, 1995; 1999). Além disso, o pré-tratamento

com ácido quinurénico (antagonista não seletivo de receptores ionotrópicos glutamatérgicos) na cisterna magna bloqueou a resposta pressora e a resistência vascular da artéria mesentérica superior, sugerindo a participação desses receptores na mediação destas respostas. Em contraste, os efeitos do L-Glu, na dose que causou uma resposta cardiovascular similar a da L-Pro, foram parcialmente ou completamente resistente ao ácido quinurênico. Sugerindo que os receptores envolvidos nestas respostas podem ser, pelo menos parcialmente, diferentes (TAKEMOTO, 1995; 1999).

Em animais anestesiados, a microinjeção de L-Pro no NTS induziu respostas depressoras e bradicárdicas, similares às respostas induzidas pelo L-Glu (TAKEMOTO, 2001), sendo que as respostas à microinjeção de L-Pro foram abolidas pelo pré-tratamento com um antagonista não seletivo de receptores ionotrópicos glutamatérgicos, o ácido quinurénico, enquanto que as respostas à microinjeção de L-Glu foram aumentadas, sugerindo que a L-Pro pode atuar sobre esses receptores e assim regular a função cardiovascular por um mecanismo diferente do L-Glu (TAKEMOTO, 2001).

O bulbo ventrolateral (BLV) é conhecido por ser importante no controle e integração de eferências neurais do sistema vasomotor. O bulbo apresenta três regiões que regulam as respostas cardiovasculares, incluindo a rostral (r), a caudal (c) e a área pressora caudal (APC). O BVLr determina o tônus vascular simpático basal. Além disso, a atividade celular no BVLc e APC pode influenciar a pressão arterial através de projeções eferentes ao BVLr. A microinjeção de L-Glu causou respostas pressoras tanto no BVLr quanto no APC e resposta depressora no BVLc, enquanto que a microinjeção de L-Pro não produziu uma consistente resposta pressora no BVLr e causou respostas depressoras tanto no APC quanto no BVLc

(TAKEMOTO, 2004). Esses resultados mostram que a L-Pro apresenta um padrão de resposta distinto do L-Glu no bulbo ventrolateral. As respostas depressoras da L-Pro no BVLc foram associadas à diminuição da resistência no trem posterior (TAKEMOTO, 2004). Estas respostas foram completamente bloqueadas pelo pré-tratamento com CNQX, antagonista de receptores ionotrópicos do tipo AMPA/cainato, e atenuadas pelo tratamento com MK801, antagonista de receptores ionotrópicos do tipo NMDA (TAKEMOTO, 2005), sugerindo uma possível influência da L-Pro sobre esses receptores. Portanto esses dados sugerem que a L-Pro participa da modulação do sistema cardiovascular em áreas bulbares, tais como no NTS, APC e BVLc, via receptores ionotrópicos aminoácidos excitatórios.

Além dos centros bulbares, estruturas supra-bulbares também estão envolvidas no controle cardiovascular, tais como a substância cinzenta periaquedutal, a amígdala, regiões do córtex cerebral, o hipotálamo lateral, o núcleo paraventricular do hipotálamo, a área septal, e o núcleo leito da estria terminal (GELSEMA e CALARESU, 1987; DAMPNEY, 1994; FERNANDES *et al.*, 2003; SCOPINHO *et al.*, 2006; ALVES *et al.*, 2007; DEOLINDO *et al.*, 2008).

O terceiro ventrículo (3 V) é uma abertura vertical estreita contígua aos ventrículos laterais (FIGURA 2A). As paredes laterais do 3 V são formadas principalmente pelas superfícies mediais dos dois tálamos. A parede lateral inferior e o assoalho do 3 V são formados pelo hipotálamo e subtálamo. A comissura anterior e a lâmina terminal formam o limite rostral do 3 V. O recesso óptico é uma extensão do 3 V entre a lâmina terminal e o quiasma óptico. O quiasma óptico, infundíbulo, túber cinéreo, corpos mamilares e o subtálamo são estruturas encontradas no assoalho do 3 V, da extremidade anterior para a posterior. O 3 V, através dos dois forames interventriculares na extremidade anterior, comunicam-se com os

ventrículos laterais e através da abertura do aqueduto cerebral, na sua extremidade posterior, comunica-se com o 4 V que é uma cavidade limitada ventralmente pela ponte e bulbo e dorsalmente pelo cerebelo (CHUSID, 1985) (FIGURA 2B). Portanto o 3 V é uma cavidade cerebral que está em íntimo contato com estruturas suprabulbares envolvidas no controle cardiovascular.

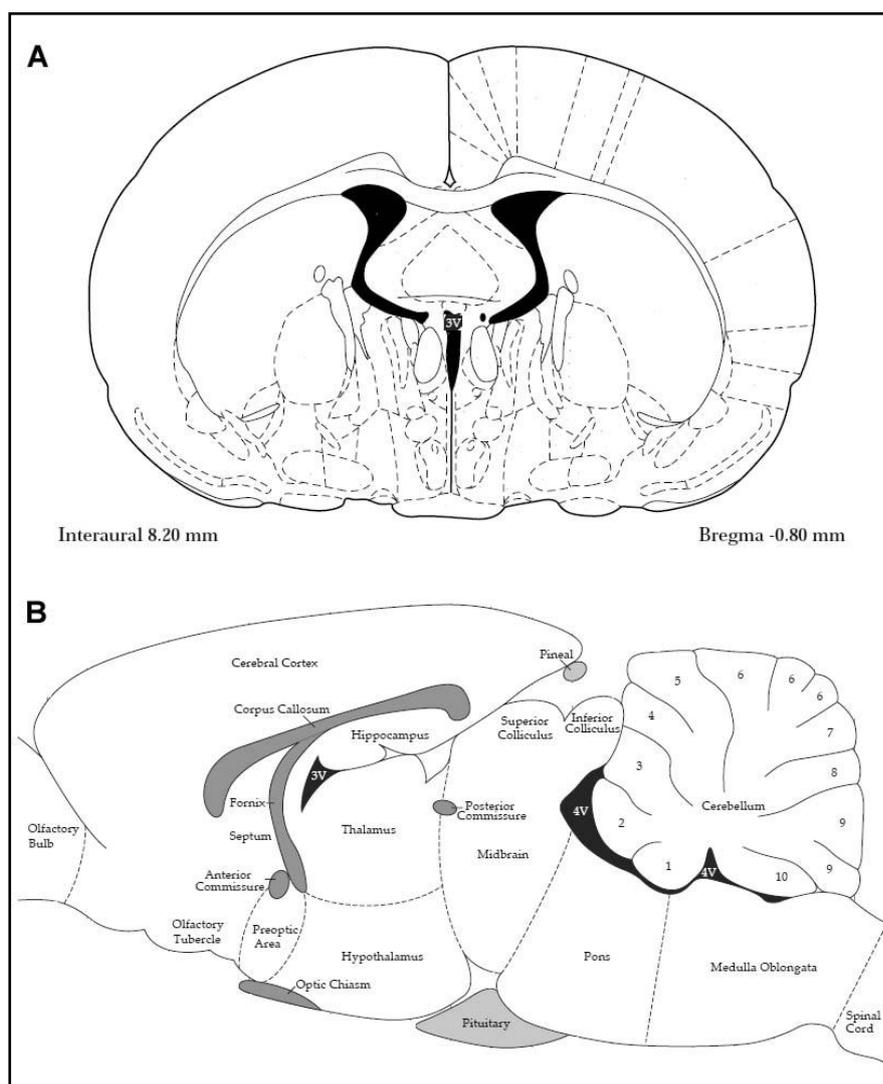


FIGURA 2 – Representação diagramática da organização neuroanatômica do 3 V e áreas circunvizinhas. A – corte frontal do cérebro do rato. B – Corte sagital do cérebro do rato. Paxinos e Watson, 2007.

Apesar das evidências indicando um possível envolvimento da L-Pro no controle central do sistema cardiovascular (TAKEMOTO, 1990; 1995; 1999; 2001; 2004; 2005; TAKEMOTO e SEMBA, 2006), ainda pouco se sabe sobre o papel desse aminoácido em estruturas suprabulbares capazes de modular o sistema cardiovascular. Sendo o 3 V uma cavidade que está em contato com várias estruturas encefálicas, a hipótese do presente trabalho é que a injeção de L-Pro no 3 V causa alterações cardiovasculares em ratos não anestesiados.

2. OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivos:

- Avaliar os efeitos da administração de diferentes doses de L-Pro no terceiro ventrículo de ratos não anestesiados sobre a pressão arterial e frequência cardíaca (construção da curva dose-resposta).

- Avaliar os mecanismos periféricos envolvidos na efetuação das respostas cardiovasculares à estimulação química do terceiro ventrículo com L-Pro.

3. MATERIAL E MÉTODO

3.1 Animais

Para a realização dos experimentos foram utilizados ratos Wistar com peso de 250g a 270g. Os animais foram fornecidos pelo biotério central da USP de Ribeirão Preto. Os mesmos foram mantidos no biotério de criação do Departamento de Farmacologia inicialmente em caixas de polietileno (38cm X 32cm X 17 cm) com cinco animais por caixa e no ultimo dia ficaram em caixas (28cm X 17cm X 13cm) individuais com alimentação de ração e água *ad libitum*. A higienização das caixas foi realizada pelos funcionários do biotério em dias alternados. Os animais foram submetidos à alternância de luz (12h claro/12h escuro).

As condições de manutenção dos animais e os protocolos experimentais do presente trabalho foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da instituição (nº do protocolo: 018/2010), estando o protocolo experimental em acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

3.2 Técnica de implante de cânula-guia no 3 V

Os animais foram anestesiados com tribromo-cloro-etanol (Adrich Chemical Co. Inc.) na dose de 250 mg/kg por via intraperitoneal (i.p.). Foi feita a tricotomia da cabeça do rato e a assepsia do local com álcool 70%. Em seguida, a cabeça do animal foi imobilizada em um estereotáxico (Stoelting, Wood Dale, Illinois, EUA). Antes da cirurgia, foi injetado 0,3 mL de Novocol 100® (cloridrato de lidocaína e de fenilefrina, S.S. White artigos dentário Ltda, Rio de Janeiro, RJ), para a redução do sangramento durante a cirurgia. A calota craniana foi exposta através de uma

incisão na pele, de aproximadamente 1,5 cm, afastando-se todo o periósteo. A assepsia local foi feita com salina e água oxigenada 10%. Todas as coordenadas tiveram como referência parâmetros obtidos a partir do Atlas de Paxinos e Watson (2007), ajustados ao peso corporal do animal (BORGES, 1999). O bregma foi utilizado como ponto de referência para a coordenada ântero-posterior, e a sutura sagital para a coordenada lateral.

Angulação: 24°;

Antero-posterior: + 0,6 mm em relação ao bregma;

Lateral: +3.0 mm a partir do bregma;

Vertical: -7.5 mm em relação a estrutura óssea da calota craniana;

Incisivo: -3.2 mm.

Após o posicionamento da cânula de aço inoxidável, um orifício foi feito no crânio com auxílio da broca odontológica. Por este orifício foi introduzida a cânula guia na região desejada do cérebro. As cânulas utilizadas foram constituídas por segmentos de agulha hipodérmica de 0,6 mm de diâmetro externo (23G), com 15 mm de comprimento, fixado ao crânio com resina acrílica auto polimerizável (Simplex, DFL, Ind. Com., Rio de Janeiro, RJ) e um parafuso de aço, previamente implantado na calota craniana. Um mandril, com 0,2 mm de diâmetro externo foi introduzido na cânula com o objetivo de se evitar uma possível obstrução durante o período de recuperação do rato. Como medida profilática, ao final da cirurgia, os animais receberam 0,2 mL de pentabiótico veterinário (Pentabiotico ®, Fontora-Wyeth, SP, Brasil, 80.000 UI) por via intramuscular, para prevenir infecção e 2,5 mg/kg do antiinflamatório flunixin meglumine (Banamine ®, Schering Plough, Brasil)

subcutaneamente, para analgesia pós-operatória.

3.3 Canulação da artéria femoral e veia femoral

Após o período de recuperação da cirurgia de implantação de cânula-guia no 3 V (48 h), o animal foi novamente anestesiado com tribromo-cloro-etanol (Aldrich Chemical Co. Inc., USA), na dose de 250 mg/kg i.p., para introdução de um cateter na artéria femoral, constituído de um segmento de polietileno PE-10 (4,5 cm) soldado a um outro segmento de polietileno PE-50 (13,5 cm) (Clay Adams, Parsippany, New Jersey, EUA), previamente preenchido com anticoagulante (heparina a 0,25% em salina) e obstruído com um pino de metal. Uma incisão de 1 cm foi feita na fossa ilíaca direita do animal e a artéria femoral direita dissecada. Uma linha de algodão foi utilizada para se isolar a região distal da artéria femoral e uma pinça hemostática foi nela colocada, obstruindo temporariamente o fluxo arterial. Em seguida, um pequeno corte foi feito na artéria femoral e o cateter foi introduzido até a aorta abdominal inferior e cuidadosamente amarrado na artéria. Após esse procedimento, o cateter foi transpassado subcutaneamente, exteriorizado na região dorsal do animal com auxílio de um trocater e fixado à pele por sutura cirúrgica. Como medida profilática o animal recebeu por via subcutânea Banamine® (2,5 mg/kg) como analgésico e antiinflamatório. Quando a administração endovenosa de drogas se fez necessária, um cateter similar foi introduzido na veia femoral, seguindo o mesmo procedimento acima descrito.

O animal foi mantido em caixa individual durante todo o período pós-operatório e de registro da pressão arterial. O registro da pressão arterial foi realizado 24hs após o procedimento cirúrgico para a implantação do cateter na

artéria femoral, permitindo a recuperação dos animais dos efeitos do anestésico.

3.4 Registros da pressão arterial e frequência cardíaca

Os registros dos parâmetros cardiovasculares foram iniciados após um período de adaptação dos animais às condições de som e iluminação do laboratório de 30 min.

Antes do início do registro, 0,1 mL de solução salina com heparina (15 U/mL) foi injetada no interior das cânulas para evitar que as mesmas fossem obstruídas pela formação de coágulos. Posteriormente, a cânula implantada na artéria femoral direita foi conectada a um transdutor de pressão arterial (Hewlett Packard, USA) através de um segmento de polietileno PE-50. O registro da pressão arterial e da frequência cardíaca foi feito acoplando-se o transdutor de pressão a um pré-amplificador (HP7754-A, Hewlett Packard, Palo Alto, Califórnia, EUA) conectado a um sistema de aquisição de dados computadorizado (MP-100, Biopac Systems, Goleta, Califórnia, EUA). A pressão arterial média (PAM) e a frequência cardíaca (FC) foram derivadas dos registros da pressão arterial pulsátil (PAP) e posteriormente analisados utilizando o software AcqKnowledge.

Os experimentos foram realizados com os animais não anestesiados, em caixas individuais e a L- Pro foi administrada aproximadamente 10 minutos após o início do registro, após estabilização da pressão arterial e da frequência cardíaca.

3.5 Administração de drogas

A L-Pro foi dissolvida em líquido cefalorraquidiano artificial (LCA) e foi injetada diretamente no 3 V em volume de 0,5 µL. Para administração das drogas foi utilizada uma seringa de 2 µL (KH7001, Hamilton, USA) conectada a um tubo de polietileno (PE-10) e a uma agulha injetora (30 G), 1 mm mais longa do que a cânula guia fixada ao crânio, previamente preenchidos com água Milliq. A seringa foi manipulada manualmente e somente 1 minuto após a microinjeção, a agulha injetora foi retirada para prevenir refluxo da solução.

O dTyr(CH₂)₅(Me)AVP, bem como o pentolínio foram diluídos em salina (NaCl 0.9%) estéril e injetados na circulação sistêmica por meio da veia femoral previamente canulada.

3.6 Drogas utilizadas

- Aminoácido L- prolina (L- Pro, Sigma, St. Louis, Missouri, EUA);
- dTyr(CH₂)₅(Me)AVP, antagonista dos receptores vasopressinérgicos (dTyr, Península laboratories, King of Prussia, PA, EUA);
- Pentolínio bitartarado, bloqueador ganglionar (PE, Sigma, St. Louis, Missouri, EUA);

Veículos

- Líquido cefalorraquidiano artificial (LCA), composição: NaCl 100 mM; Na₃PO₄ 2 mM; KCl 2,5 mM; MgCl₂ 1 mM; NaHCO₃ 27 mM; CaCl₂ 2,5 mM; pH=7,4);
- Salina (NaCl 0,9%);

Anestésicos

- Tribromo-cloro-etanol (Aldrich Chemical Co. Inc., EUA);
- Uretana (SIGMA, St. Louis, Missouri EUA);

Analgésico

Banamine (Shering –Ploug – S/A; RJ, Brasil);

Antibiótico

- Pentabiótico veterinário (Fontoura-Wyeth, Brasil).

3.7 Determinação anatômica do sítio de injeção.

Ao final de cada experimento, os animais foram anestesiados com uretana na dose de 1,25 g/kg i.p. Foi injetado 0,5 µL do corante Azul de Evan a 1% no local da administração da droga. Em seguida, os ratos foram submetidos à abertura da caixa torácica para exposição do coração e posterior perfusão. Para facilitar a perfusão cerebral, a aorta descendente foi bloqueada com uma pinça hemostática. O átrio direito sofreu uma incisão para escoamento do sangue e do perfusado e uma agulha para perfusão foi introduzida no ventrículo esquerdo. A perfusão foi realizada inicialmente com 20 mL de solução fisiológica de NaCl 0,9%, seguida por 20 mL de solução tamponada de formalina a 10%.

Posteriormente, os cérebros foram retirados da caixa craniana e colocados em solução de formalina a 10% para fixação. No dia seguinte, os cérebros foram seccionados com o auxílio de um criostato (CM-1900, Leica, Wetzlar, Alemanha), frontais de 40 µm de espessura e corados com acetato de cresil violeta 0,5 % (ACROSS ORGANICS, USA) diluído em uma solução de etanol a 20 %. Os cortes

foram analisados utilizando o Atlas de Paxinos & Watson (PAXINOS, 2007) como referência.

3.8 Análise estatística

Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). A análise estatística dos dados foi realizada através do programa PRISM 3.0 (GraphPad, USA). Foram utilizados os seguintes testes:

- Regressão não linear sigmoidal para construção da curva dose-resposta;
- Teste t de Student pareado, bicaudal foi utilizado para comparar os valores de PAM e FC antes e após os tratamentos, assumindo-se $p < 0,05$;
- Análise de Variância (two-way ANOVA) de dois fatores (tratamento e tempo), para comparar os efeitos do tratamento sobre as respostas cardiovasculares à microinjeção de L- Pro no 3 V antes e após os pré-tratamentos. Os pontos de dados foram coletados em intervalos de 1 minuto. Os pontos mostrados durante 5 min antes da microinjeção de L- Pro foram usados como valores de referência controle. Alterações na PAM e FC foram analisadas usando ANOVA de dois fatores (two way ANOVA) com o tratamento como principal fator independente e o tempo como medida repetida. Quando a interação entre os fatores foi observada, os grupos foram comparados em momentos específicos usando o pós-teste de Bonferroni. $P < 0,05$ foi assumido como estatisticamente significativo.

4. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

4.1 Efeito da administração de diferentes doses de L-Pro no 3 V de ratos não anestesiados sobre a pressão arterial e frequência cardíaca (curva dose-resposta).

Este experimento teve por objetivo verificar as alterações cardiovasculares causadas pela microinjeção de diferentes doses de L-Pro no 3 V. Dessa forma, a L-Pro foi injetada no 3 V nas doses (0,003; 0,03; 0,1; 0,3; 0,6; 0,9; 1,8 $\mu\text{mol}/0,5 \mu\text{L}$). As microinjeções de L-Pro foram feitas de maneira randomizada, em que cada animal recebeu de uma a três doses, mantendo-se intervalos mínimos de 20 min entre cada injeção, sendo observada a possível ocorrência de taquifilaxia.

4.2 Efeito do pré-tratamento sistêmico com pentolínio (bloqueador ganglionar) sobre a resposta cardiovascular à microinjeção de L-Pro no 3 V de ratos não anestesiados.

Este experimento teve por objetivo verificar o possível envolvimento do sistema nervoso simpático na mediação das respostas cardiovasculares à microinjeção de L-Pro no 3 V. Os experimentos foram realizados em um único dia, pois não foi observada taquifilaxia com administrações consecutivas de L-Pro no 3 V. Os animais receberam uma microinjeção de L-Pro (0,6 $\mu\text{mol}/0,5 \mu\text{L}$) no 3 V e após 20 min, foi administrado pentolínio (5 mg/kg; dose baseada no trabalho de SCOPINHO *et al.*, 2006) por via intravenosa (i.v.) e 10 min depois foi repetida a administração de L-Pro no 3 V de ratos não anestesiados.

4.3 Efeito do pré-tratamento sistêmico com dTyr(CH₂)₅(Me)AVP (antagonista

dos receptores vasopressinérgicos do tipo V1) sobre a resposta cardiovascular à microinjeção de L-Pro no 3 V de ratos não anestesiados.

Este experimento teve por objetivo estudar o possível envolvimento de mecanismo vasopressinérgico humoral na mediação das respostas pressora e bradicárdica causadas pela microinjeção de L-Pro no 3 V. Os animais receberam uma microinjeção de L-Pro (0,6 $\mu\text{mol}/0,5 \mu\text{L}$) no 3 V. Após 20 min, foi feita administração i.v. de dTyr(CH₂)₅(Me)AVP (50 $\mu\text{g}/\text{kg}$; dose baseada no trabalho de (TAVARES e DE AGUIAR CORREA, 2003) e 10 min depois foi repetida a administração de L-Pro no 3 V.

5. RESULTADOS

5.1 Determinação do sítio de injeção



FIGURA 3 – Vista ventral de um cérebro de rato, representativo do grupo, mostrando a distribuição de 0,5 μ L do corante azul de Evan injetado no 3 V.

5.2 Efeito da microinjeção de L- Pro no 3 V de ratos não anestesiados sobre a pressão arterial e a frequência cardíaca.

A microinjeção de líquido cefalorraquidiano artificial (LCA) 0,5 μ L no 3 V não causou alterações significativas na pressão arterial média (ANTES: PAM= 92,43 \pm 1,78 mmHg; APÓS: PAM= 94,05 \pm 1,40 mmHg, $t = 1,01$, $p > 0,05$, teste t de Student pareado) e frequência cardíaca (ANTES: FC= 345,5 \pm 7,34 bpm; APÓS: FC= 341,6 \pm 8,89 bpm, $n = 6$, $t = 1,55$, $p > 0,05$, teste t de Student pareado).

A microinjeção de diferentes doses de L-Pro (0,003; 0,03; 0,1; 0,3; 0,6; 0,9; 1,8 μ mol/0,5 μ L) no 3 V de ratos normotensos causou respostas pressoras e bradicárdicas de maneira dose-dependente (FIGURA 4 e TABELA 1). A análise de regressão não-linear sigmoidal indicou uma correlação significativa entre a dose e resposta pressora ($R^2 = 0,93$; $p < 0,05$) ou bradicardica ($R^2 = 0,91$; $p < 0,05$). A dose de L-Pro de 0,6 μ mol/0,5 μ L foi utilizada nos experimentos subseqüentes. Não foi observada taquifilaxia após microinjeções seqüências de L- Pro no 3 V.

A FIGURA 5 apresenta um traçado da pressão arterial pulsátil, média e frequência cardíaca de um animal representativo do grupo, que recebeu microinjeção de L- Pro 0,6 μ mol/0,5 μ L.

A microinjeção de L-Pro (0,6 μ mol/0,5 μ L) no 3 V de ratos normotensos (PAM= 99,20 \pm 1,78 mmHg; FC= 348,2 \pm 6,86 bpm, $n = 6$) causou respostas pressoras significativas (Δ PAM= 26,90 \pm 0,97 mmHg, $t = 25,38$, $*p < 0,001$, FIGURA 6A) que foram acompanhadas por redução na frequência cardíaca (Δ FC= -48,31 \pm 3,29 bpm, $t = 10,73$, $*p < 0,001$, FIGURA 6A). Por outro lado, a microinjeção de LCA (0,5 μ L) no 3 V não causou alterações significativas na pressão arterial (Δ PAM= -0,55 \pm 0,67 mmHg) e frequência cardíaca (Δ FC= -1,99 \pm 2,07bpm) (FIGURA 6A).

A análise de two way ANOVA indicou um efeito significativo da L-Pro (0,6 $\mu\text{mol}/0,5 \mu\text{L}$) sobre as respostas pressora e bradicárdica (ΔPAM : $F= 224,5$, $p < 0,001$; ΔFC : $F= 63,77$, $p < 0,01$; FIGURA 6B); um significativo efeito do tempo (ΔPAM : $F= 17,09$, $p < 0,01$; ΔFC : $F= 9,35$, $p < 0,01$; FIGURA 6B) e uma interação tratamento e tempo (ΔPAM : $F= 18,83$, $p < 0,01$; ΔFC : $F= 6,32$, $p < 0,01$) (FIGURA 6B).

TABELA 1 – Variações máximas na pressão arterial média (Δ PAM) e frequência cardíaca (Δ FC), em resposta a microinjeção de diferentes concentrações de L- Pro no 3 V de ratos não-anestesiados.

L- Prolina (μ mol/0,5 μ l)	Δ PAM \pm EPM (mmHg)	Δ FC \pm EPM (bpm)	N (amostra)
LCA	-0,55 \pm 0,67	-1,99 \pm 2,07	6
0,003	5,67 \pm 0,90	11,17 \pm 1,30	3
0,03	10,83 \pm 0,60	-15,60 \pm 2,12	6
0,1	12,17 \pm 0,87	-18,97 \pm 3,14	6
0,3	19,88 \pm 0,89	-31,43 \pm 1,25	6
0,6	26,90 \pm 0,97	-48,31 \pm 3,29	6
0,9	33,80 \pm 1,38	-61,77 \pm 4,57	6
1,8	44,32 \pm 3,09	-61,83 \pm 4,89	6

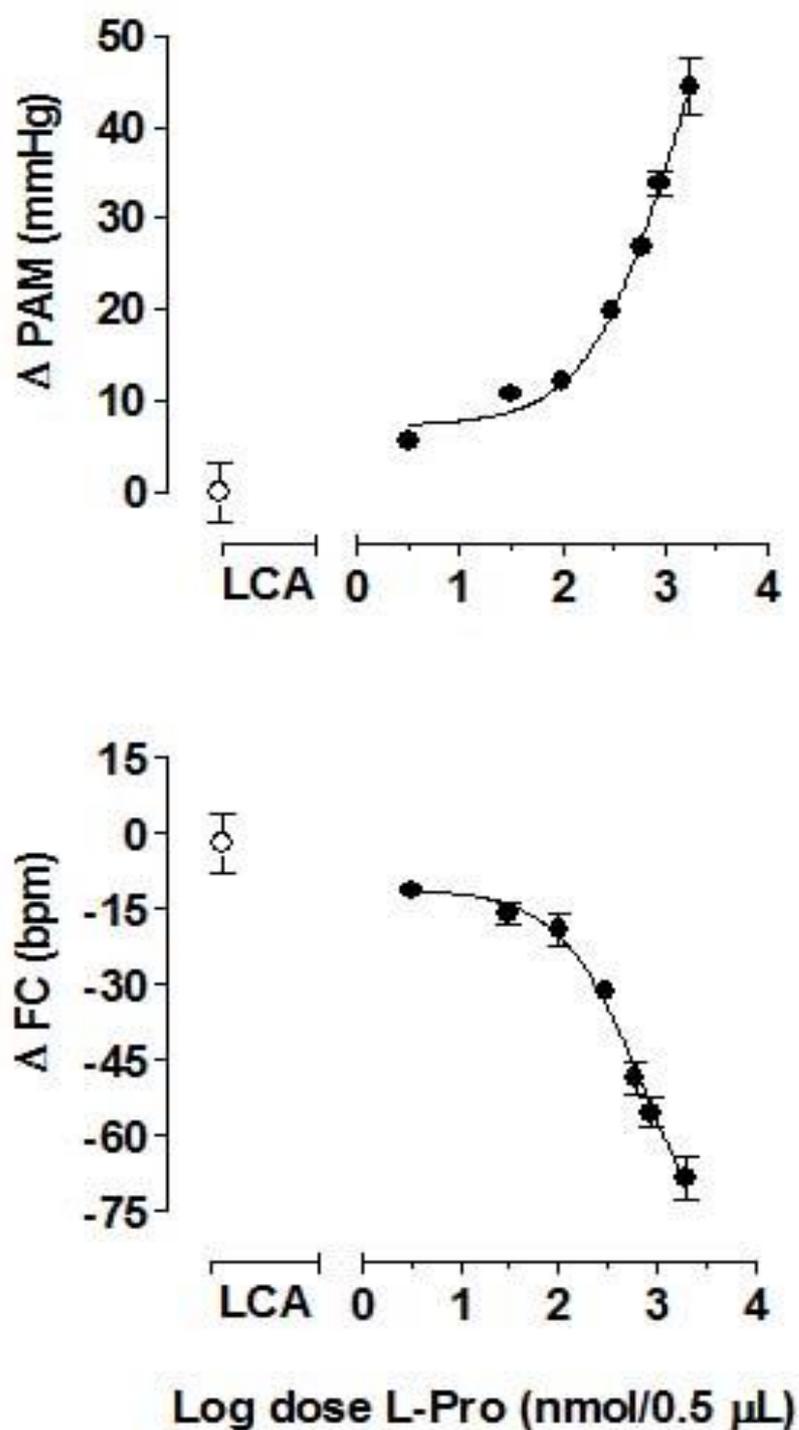


FIGURA 4 – Efeito da microinjeção de diferentes doses de L- Pro (círculos pretos, n= 18) ou líquido cefalorraquidiano artificial (LCA) (círculos brancos, n= 6) no 3 V de ratos não anestesiados, sobre a pressão arterial média (Δ PAM) e a frequência cardíaca (Δ FC). As doses injetadas foram: 3; 30; 100; 300; 600; 900; 1800 nmol/0,5 μ L. As curvas foram geradas por análise de regressão não linear e foram significativamente diferentes (Δ PAM, $r^2= 0,93$ e Δ FC, $r^2= 0.91$). Os círculos representam as médias e as barras o EPM.

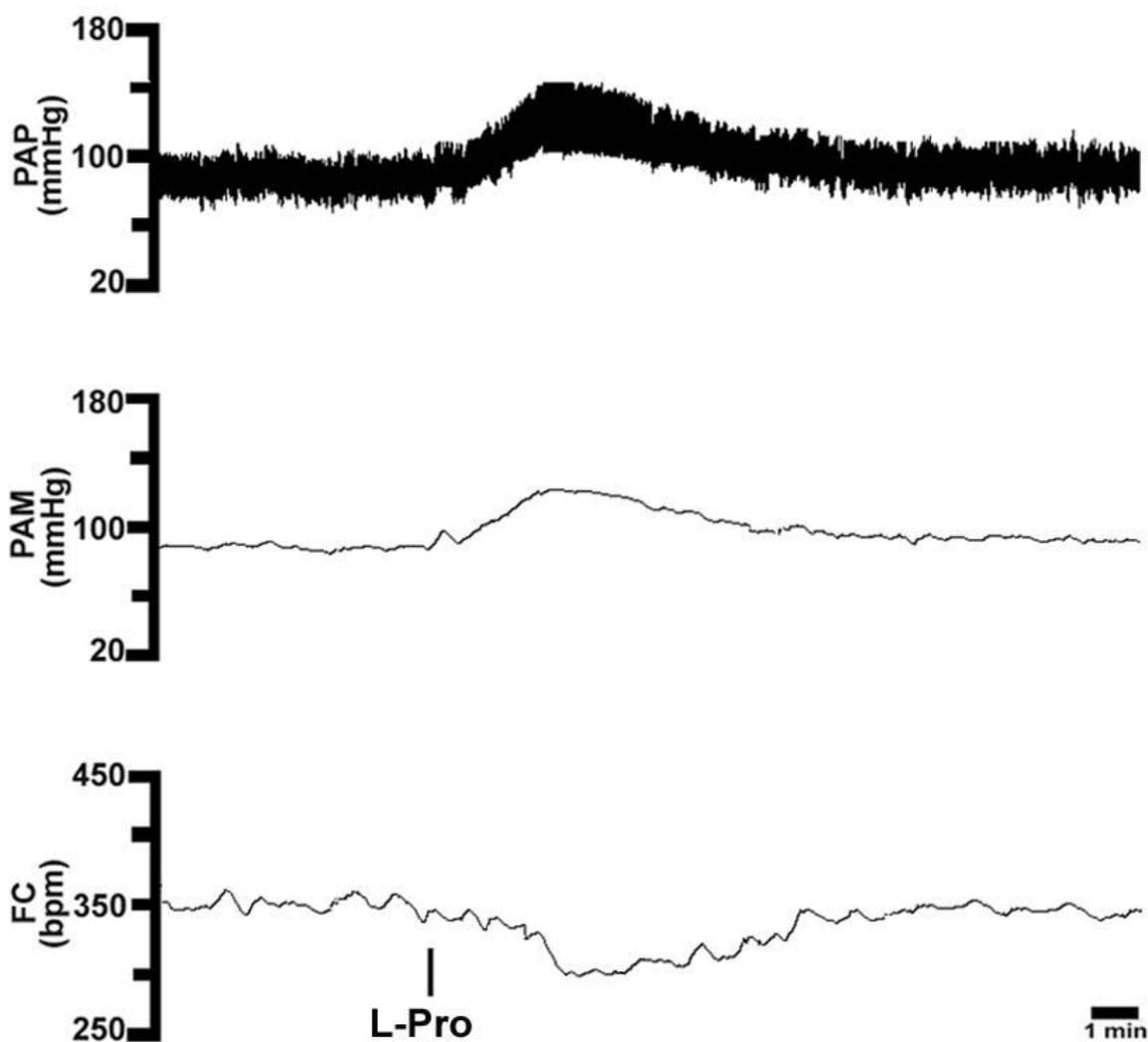


FIGURA 5 – Registros de pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) de um rato representativo do grupo, mostrando o efeito da microinjeção de L-Pro (0,6 μ mol/0,5 μ L) no 3 V.

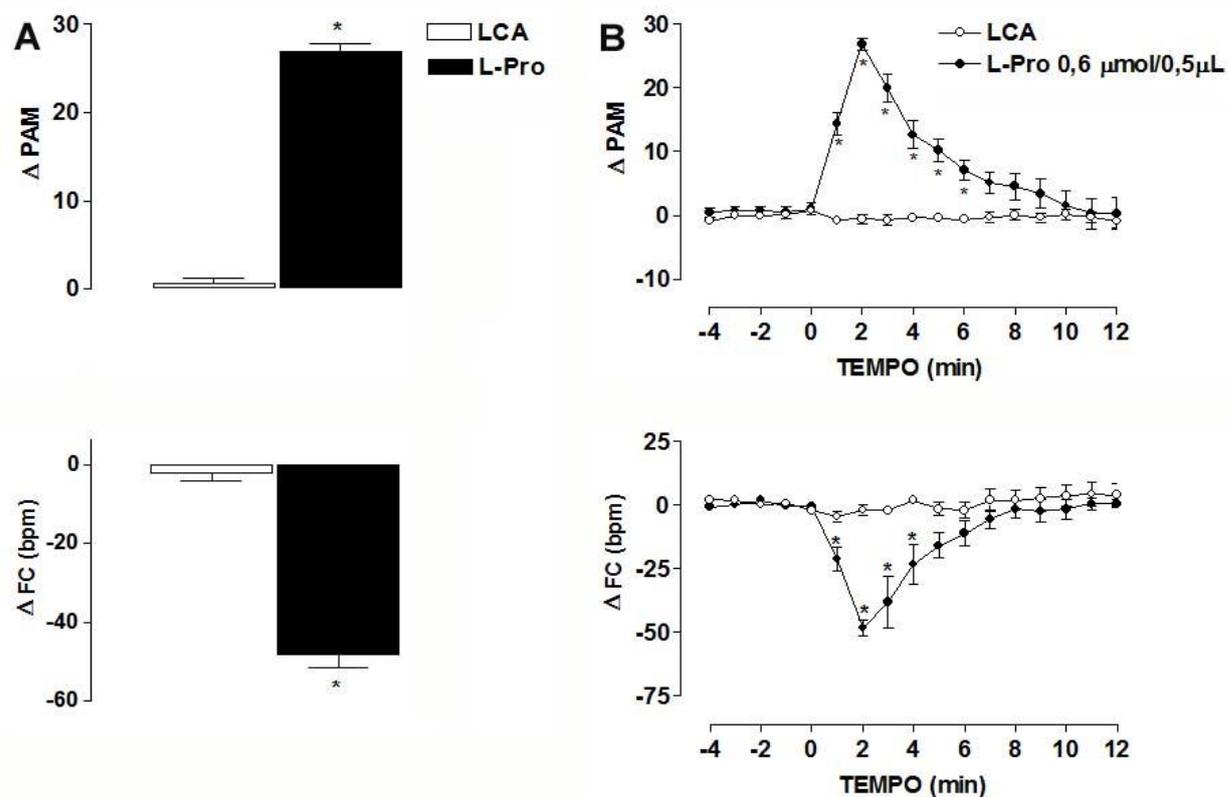


FIGURA 6- A) Variação máxima na pressão arterial média (Δ PAM) e frequência cardíaca (Δ FC) após microinjeção de L-Pro 0,6 μ mol/0,5 μ L (coluna preta) ou de 0,5 μ L de LCA (coluna branca) no 3 V de ratos não anestesiados. As colunas representam as médias e as barras o EPM, n= 6, *p < 0,001, test t Student pareado. **B)** Variação da pressão arterial media (Δ PAM) e frequência cardíaca (Δ FC) ao longo do tempo após microinjeção de L-Pro 0,6 μ mol/0,5 μ L (círculos pretos, n= 6) ou 0,5 μ L de LCA (círculos brancos, n=6) no 3 V. As injeções de L-Pro foram feitas no tempo 0. Pontos representam as médias e as barras o EPM, *P < 0,05, two-way ANOVA, pós-teste de Bonferroni.

5.3 Efeitos do pré-tratamento com pentolínio sobre as respostas cardiovasculares à microinjeção de L-Pro no 3 V de ratos não anestesiados.

O pré-tratamento com o bloqueador ganglionar pentolínio (5 mg/kg) por via intravenosa causou redução na pressão arterial basal (ANTES: PAM= $101,30 \pm 4,31$ mmHg; APÓS: PAM= $71,89 \pm 3,42$ mmHg, $n=8$ $t= 5,34$, $p < 0,001$, teste t de Student pareado) (FIGURA 8), mas não alterou a linha de base da frequência cardíaca (ANTES: FC= $363,70 \pm 3,31$ bpm; APÓS: FC= $368,60 \pm 7,14$ bpm, $n= 8$, $t= 0,54$, $p > 0,05$, teste t de Student pareado) (FIGURA 7).

A injeção i.v de pentolínio aumentou a resposta pressora (ANTES: Δ PAM= $21,57 \pm 2,24$ mmHg; APÓS: Δ PAM= $41,33 \pm 4,5$ mmHg, $n=8$, $t= 3,93$, $p < 0,001$, teste t de Student pareado) e bloqueou a bradicardia (ANTES: Δ FC= $-43,09 \pm 4,33$ bpm; APÓS: Δ FC= $-4,29 \pm 3,37$ bpm, $t= 7,07$, $p < 0,001$, teste t de Student pareado) causadas pela microinjeção de L-Pro no 3 V (FIGURA 8A). Comparando as respostas causadas pela administração de L-Pro no 3 V antes e após a administração de pentolínio i.v., observamos que houve efeito do tratamento (PAM: $F= 165,5$; $p < 0,001$ e FC: $F= 22,65$; $p < 0,001$), efeito do tempo (PAM: $F= 26,14$; $p < 0,001$ e FC: $F= 6,90$; $p < 0,001$) com interação entre esses fatores (PAM: $F= 4,48$; $p < 0,001$ e FC: $F= 4,16$; $p < 0,001$; two-way ANOVA, pós teste de Bonferroni) (FIGURA 8B).

A figura 9 apresenta registros da pressão arterial pulsátil, média e frequência cardíaca de um animal representativo do grupo.

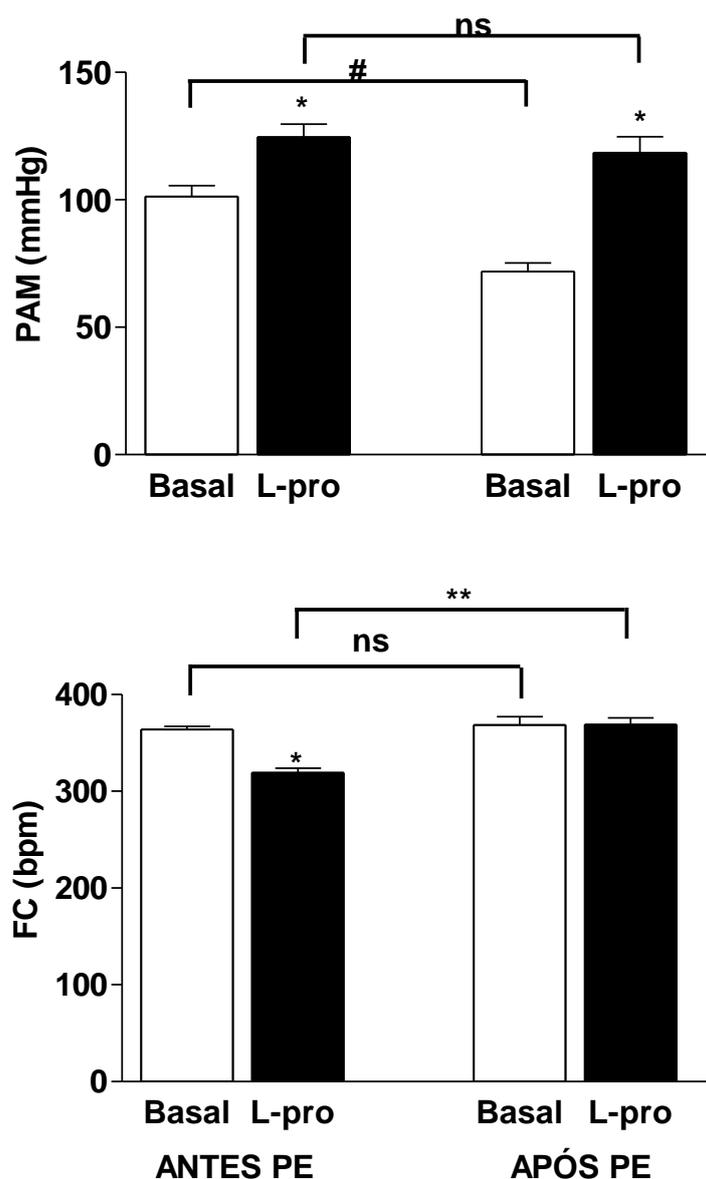


FIGURA 7 – Pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) antes (Basal, colunas brancas) e após (colunas pretas) a microinjeção de L-Pro ($0,6 \mu\text{mol}/0,5 \mu\text{L}$) no 3 V, registradas antes e após o pré-tratamento com o bloqueador ganglionar pentolínio (PE, $5\text{mg}/\text{kg}$ i.v), em ratos não anestesiados, $n= 8$. As colunas representam as médias e as barras o EPM; * $p < 0,001$, test t de Student pareado. * $p < 0,001$ comparando basal vs L- Pro; # $p < 0,001$ comparando basal antes e após pré-tratamento com pentolínio; ** $p < 0,001$ comparando L-Pro antes e após pré tratamento com pentolínio e ns: não significativo.

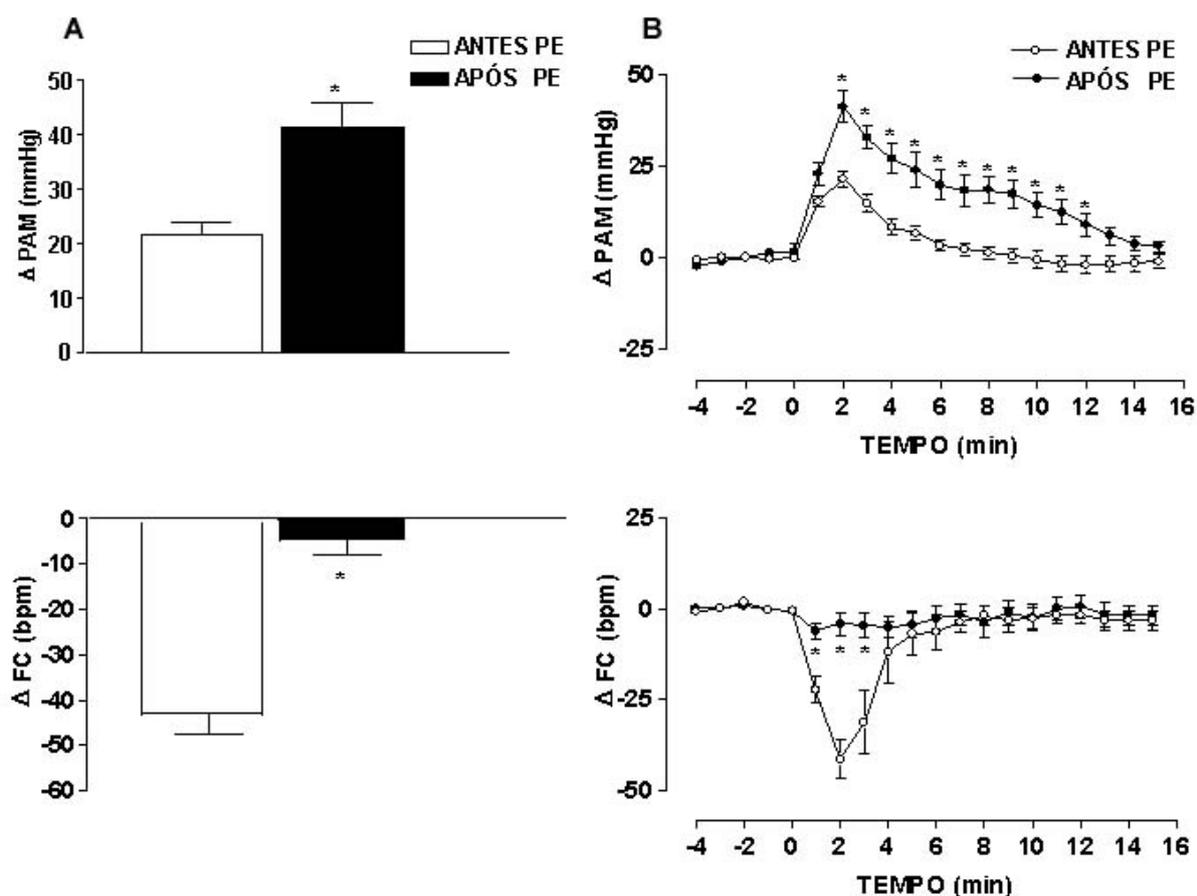


FIGURA 8 – A) Variação máxima da pressão arterial média (Δ PAM) e frequência cardíaca (Δ FC) causada pela microinjeção de L-Pro ($0,6 \mu\text{mol}/0,5 \mu\text{L}$) no 3 V, antes (colunas brancas) e após (colunas pretas) o pré-tratamento i.v. com pentolínio (PE, 5 mg/kg), de ratos não anestesiados. As colunas representam as médias \pm EPM; $n = 8$; $*p < 0,001$; test t de Student pareado. **B)** Variação da pressão arterial média (Δ PAM) e frequência cardíaca (Δ FC) ao longo do tempo após microinjeção de L-Pro ($0,6 \mu\text{mol}/0,5 \mu\text{L}$) no 3 V, antes (círculos brancos) e após (círculos pretos) o pré-tratamento com pentolínio (PE, 5 mg/kg). As microinjeções foram feitas no tempo 0 (zero). Os pontos representam as médias \pm EPM; $*p < 0,05$; two-way ANOVA, pós-teste de Bonferroni.

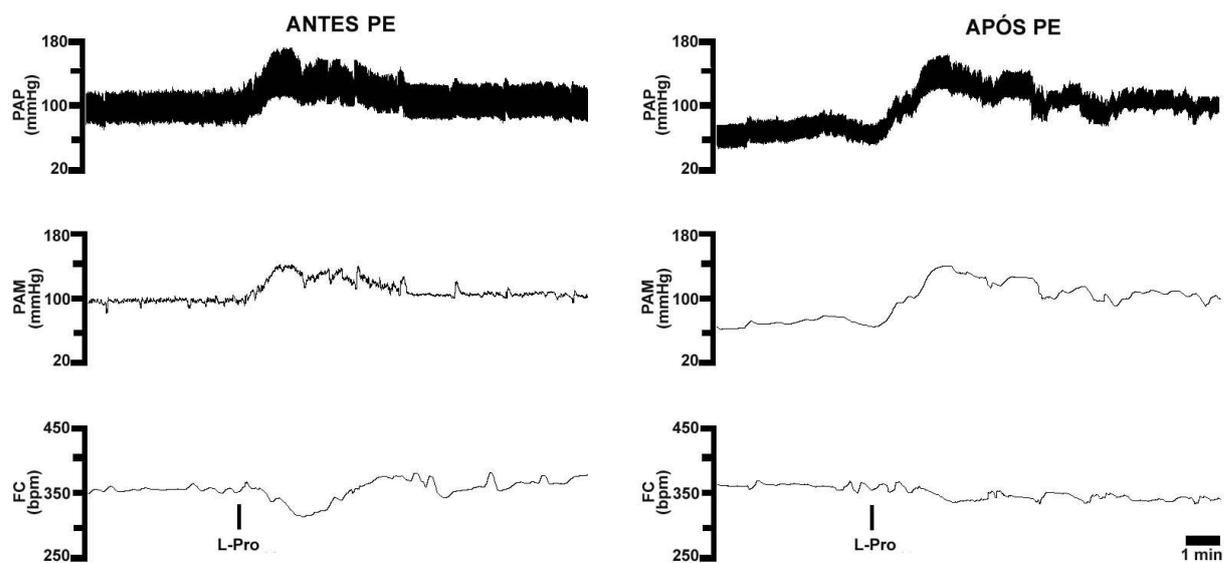


FIGURA 9 – Registros de pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM), e frequência cardíaca (FC) de um rato representativo do grupo, mostrando o efeito da microinjeção de L-Pro (0,6 μ mol/0,5 μ L) no 3 V antes e após a injeção i.v de pentolínio (PE, 5 mg/Kg).

5.4 Efeitos do pré-tratamento i.v. com dTyr(CH₂)₅(Me)AVP sobre a resposta pressora à microinjeção de L-Pro no 3 V de ratos não anestesiados.

A injeção intravenosa de dTyr(CH₂)₅(Me)AVP (50 µg/kg), um antagonista seletivo dos receptores vasopressinérgicos do tipo V1, não causou alterações significativas nos valores basais da pressão arterial (Antes: PAM= 106,50 ± 5,18 mmHg; APÓS: PAM= 103,80 ± 9,19 mmHg, t= 0,69, p > 0,05, teste t de Student pareado) e na frequência cardíaca (Antes: FC= 363,30 ± 3,92 bpm; APÓS: FC= 363,40 ± 12,57 bpm, t= 0,08, p > 0,05, teste t de Student pareado) de ratos não anestesiados. Após o pré-tratamento com dTyr(CH₂)₅(Me)AVP, as respostas cardiovasculares causadas pela microinjeção de L-Pro (0,6 µmol/0,5 µL) no 3 V foram significativamente reduzidas (ΔPAM= 2,02 ± 1,19 mmHg, n= 6, t= 6,4, p < 0,01; ΔFC= 3,81 ± 3,65 bpm, t= 5,9, p < 0,01, teste t de Student pareado) comparadas com aquelas observadas antes do antagonista (ΔPAM= 28,16 ± 3,69 mmHg; ΔFC= -41,78 ± 4,68 bpm; n= 6) conforme representado na FIGURA 10A. Comparando as repostas provocadas pelo tratamento de L-Pro no 3 V antes e após o pré tratamento com dTyr(CH₂)₅(Me)AVP em função do tempo, o two-way ANOVA indicou efeito significativo do tratamento (ΔPAM: F= 42,2; p < 0,001 e ΔFC: F= 108,4; p < 0,001), ao longo do tempo (ΔPAM: F= 11,3; p<0,001 e ΔFC: F= 5,35; p<0,001), e interação entre tratamento e tempo (ΔPAM: F= 7,5; p < 0,001 e ΔFC: F= 6,35; p < 0,001) conforme representado na FIGURA 10B.

A figura 11 apresenta registros da pressão arterial pulsátil, média e frequência cardíaca de um animal representativo do grupo.

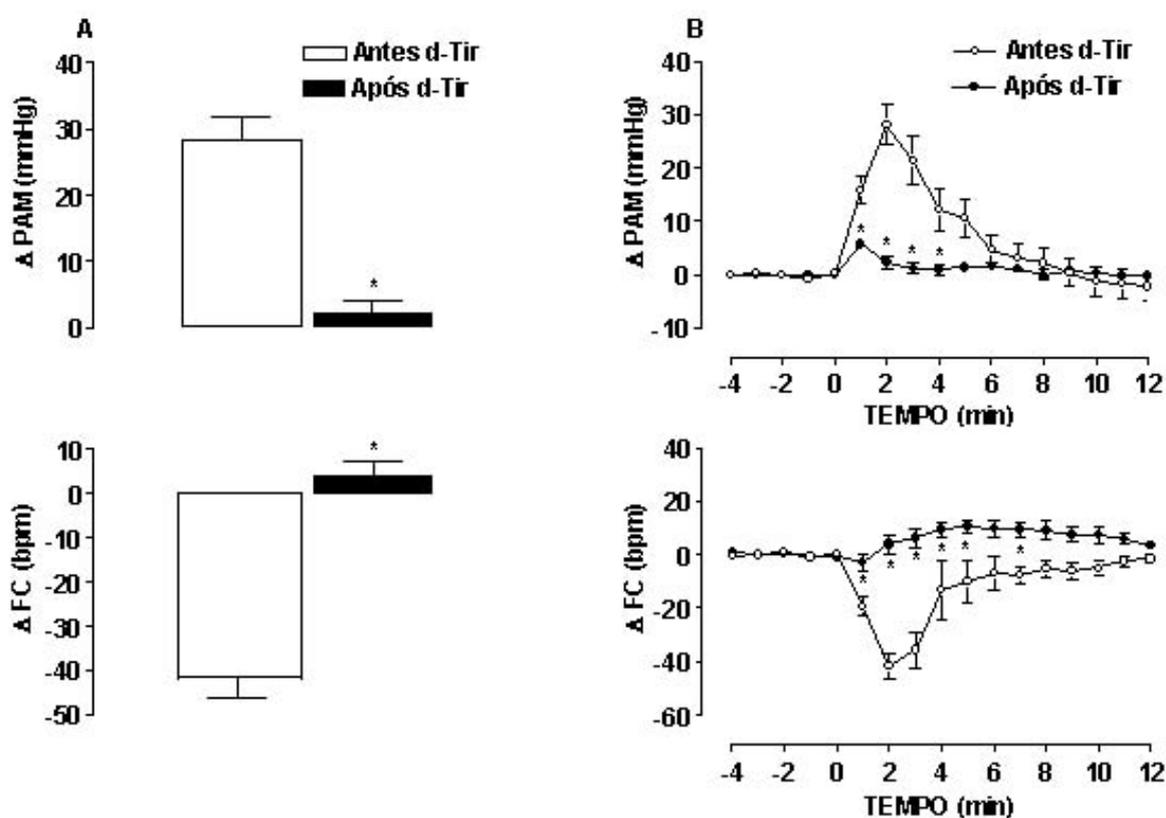


FIGURA 10 – A) Variação máxima da pressão arterial média (Δ PAM) e frequência cardíaca (Δ FC) causada pela microinjeção de L-Pro ($0,6 \mu\text{mol}/0,5 \mu\text{L}$) no 3 V antes (colunas brancas) e após (colunas pretas) o pré tratamento com dTyr(CH₂)₅(Me)AVP (d-Tir, $50 \mu\text{g}/\text{kg}$) i.v de ratos não anestesiados. As colunas representam as médias e as barras o EPM, $n=6$, $*p < 0,01$, test t de Student pareado. **B)** Variação da pressão arterial media (Δ PAM) e frequência cardíaca (Δ FC) ao longo do tempo após microinjeção de L-Pro ($0,6 \mu\text{mol}/0,5 \mu\text{L}$) no 3 V, antes (círculos brancos) e após (círculos pretos) o pré-tratamento i.v. com dTyr(CH₂)₅(Me)AVP (d-Tir, $50 \mu\text{g}/\text{kg}$). As microinjeções foram feitas no tempo 0 (zero). Os pontos representam as médias e as barras o EPM; $*p < 0,05$; two-way ANOVA, pós-teste de Bonferroni.

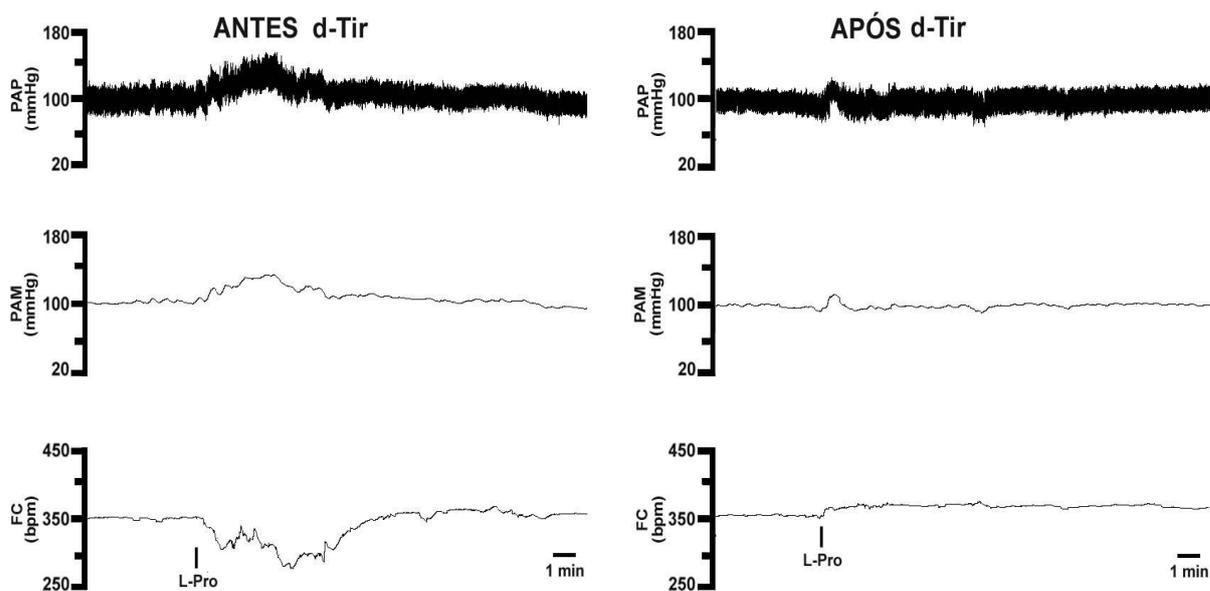


FIGURA 11 – Registros de pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM), e frequência cardíaca (FC) de um rato representativo do grupo, mostrando o efeito da microinjeção de L-Pro ($0,6 \mu\text{mol}/0,5 \mu\text{L}$) no 3 V antes e após a injeção i.v de dTyr(CH₂)₅(Me)AVP (d-Tir, $50 \mu\text{g}/\text{kg}$).

6. *DISCUSSÃO*

Relatamos no presente estudo que a L-Pro, aminoácido candidato a neurotransmissor no SNC, causa respostas cardiovasculares caracterizadas por elevação da pressão arterial e queda da frequência cardíaca, de maneira dose-dependente, quando microinjetada no 3 V de ratos não anestesiados. A microinjeção de LCA (veículo) no 3 V não causou respostas cardiovasculares significantes. Este resultado exclui a possibilidade das respostas cardiovasculares observadas após microinjeção de L-Pro no 3 V serem decorrentes de estimulação mecânica da área.

Trabalhos anteriores mostraram efeitos cardiovasculares causados pela microinjeção de L-Pro em estruturas bulbares (TAKEMOTO, 2001; 2004), porém, ainda não há relatos dos efeitos desencadeados pela L-Pro em estruturas suprabulbares, principalmente aquelas que estão envolvidas na modulação do sistema cardiovascular tais como o hipotálamo. Considerando que os espaços ventriculares constituem um via de administração que permite atingir um extenso número de estruturas suprabulbares, a microinjeção de L-Pro no 3 V de ratos não anestesiados constitui um primeiro passo para evidenciar efeitos cardiovasculares da L-Pro nessas estruturas.

Também estudamos os mecanismos periféricos envolvidos nas respostas cardiovasculares à microinjeção de L-Pro no 3 V. Uma vez que respostas pressoras foram observadas após a microinjeção de L-Pro no 3 V e considerando que o sistema nervoso simpático é a principal via envolvida no controle neural do sistema cardiovascular, torna-se importante verificar o seu possível envolvimento na mediação da resposta pressora à L-Pro. Para verificar esta hipótese, os animais foram tratados intravenosamente com pentolínio, um bloqueador ganglionar, antes da microinjeção de L-Pro no 3 V. O tratamento com pentolínio reduziu significativamente a pressão arterial média basal sem alterar a frequência cardíaca,

confirmando assim o bloqueio simpático. No entanto, a resposta pressora à microinjeção de L- Pro no 3 V foi mantida após o pré-tratamento com pentolínio, sugerindo que o sistema nervoso simpático não está envolvido na mediação dessas respostas.

O aumento significativo da resposta pressora à L- Pro no 3 V após pré tratamento com o pentolínio pode ser explicado, em parte, pela redução nos valores basais de PAM após o bloqueio do sistema nervoso simpático, principal responsável pela manutenção do tônus vascular. Similarmente, respostas pressoras à injeção de L- Pro na cisterna magna (TAKEMOTO, 1995), de L- Glu no núcleo supra-óptico (BUSNARDO *et al.*, 2007) ou de noradrenalina intracerebroventricular (i.c.v.) (CORREA *et al.*, 1985) foram aumentadas em ratos não anestesiados pelo pré-tratamento sistêmico com bloqueador ganglionar. Por outro lado, o fato da resposta bradicárdica à L- Pro no 3 V ter sido abolida pelo bloqueador ganglionar, sugere ser a mesma uma resposta barorreflexa vagal, decorrente do aumento da pressão arterial.

Previamente Takemoto relatou que as respostas cardiovasculares à microinjeção intracisternal de L-Pro em ratos não anestesiados eram mediadas pela liberação aguda de vasopressina na corrente sanguínea (TAKEMOTO, 1995). Então, para determinar se o sistema vasopressinérgico humoral estaria envolvido na mediação periférica da resposta pressora e bradicárdica à microinjeção de L-Pro no 3 V, pré-tratamos os animais com um potente antagonista de receptores vasopressinérgico do tipo V1, o dTyr(CH₂)₅(Me)AVP. As respostas cardiovasculares à microinjeção de L- Pro no 3 V foram bloqueadas pelo pré-tratamento i.v com dTyr(CH₂)₅(Me)AVP, sugerindo que a liberação aguda de vasopressina medeia essas respostas. Este antagonista foi anteriormente usado para evidenciar o

envolvimento da vasopressina nas respostas cardiovasculares às injeções de noradrenalina i.c.v. (CORREA *et al.*, 1985), intraseptal (SCOPINHO *et al.*, 2006), na substância cinzenta periaquedutal (PELOSI e CORREA, 2005) e no núcleo leito da estria terminal (CRESTANI *et al.*, 2007); de acetilcolina intraseptal (PERES-POLON e CORREA, 1994); de glutamato na banda diagonal de broca (TAVARES e DE AGUIAR CORREA, 2003) e no núcleo supra-óptico (BUSNARDO *et al.*, 2007); e carbacol no núcleo leito da estria terminal (ALVES *et al.*, 2007). A dose de dTyr(CH₂)₅(Me)AVP foi utilizada em trabalhos anteriores (TAVARES e DE AGUIAR CORREA, 2003; SCOPINHO *et al.*, 2006; BUSNARDO *et al.*, 2007; CRESTANI *et al.*, 2007) para inibir o componente vasopressinérgico das respostas pressoras a injeções centrais de neurotransmissores em ratos não anestesiados, sendo considerada dose padrão para bloqueio de receptores vasopressinérgicos.

A vasopressina é sintetizada principalmente em neurônios magnocelulares localizados no núcleo paraventricular (NPV) e supraóptico (NSO) do hipotálamo (SWANSON e SAWCHENKO, 1983), sendo liberada para a circulação periférica através da neuro-hipófise (SWAAB *et al.*, 1975). Uma vez liberada, a vasopressina sistêmica é capaz de modular o sistema cardiovascular. Existem receptores do tipo V1 vasopressinérgicos localizados na musculatura lisa vascular (PHILLIPS *et al.*, 1990) que, acoplados a proteína G, estimulam a enzima fosfolipase C levando à formação dos segundos mensageiros, trifosfato de inositol (IP3) e diacilglicerol (BRILEY *et al.*, 1994). Estes mensageiros são capazes de elevar as concentrações intracelulares de cálcio livre, levando à contração da musculatura lisa vascular. Deste modo, a vasopressina sistêmica, ao atuar em receptores V1 vasopressinérgicos, causa contração da musculatura vascular (STEEDMAN, 1966) ocasionando aumento da pressão arterial.

A L-Pro compartilha inúmeras propriedades com reconhecidos aminoácidos neurotransmissores, sugerido iniciar um papel na transmissão sináptica. Foi observado em preparações de fatias e sinaptossomas cerebrais a síntese de L-Pro a partir da L-ornitina (YONEDA e ROBERTS, 1982; MATSUZAWA e OBARA, 1987), o seu acúmulo em várias regiões do SNC a partir do fluido extracelular em um compartimento neuronal por mecanismo de alta afinidade, sódio dependente (SNYDER *et al.*, 1973; BALCAR *et al.*, 1976; HAUPTMANN *et al.*, 1983) e sua liberação cálcio dependente seguida por despolarização induzida por K^+ (BENNETT *et al.*, 1972; NICKOLSON, 1982). Além disso, estudos de hibridização *in situ* revelaram que a L-Pro é seletivamente acumulada por um transportador específico de alta afinidade Na^+/Cl^- -dependente (FREMEAU *et al.*, 1992; SHAFQAT *et al.*, 1995; VELAZ-FAIRCLOTH *et al.*, 1995) que é expresso exclusivamente por subpopulações de vias glutamatérgicas no cérebro de rato, incluindo o hipotálamo, entre outros (NADLER, 1987; FREMEAU *et al.*, 1992; NADLER *et al.*, 1992). Estudo usando imuno-histoquímica com anticorpo específico para L-Pro mostrou a presença de grupos de neurônios no hipotálamo e tronco-cerebral de ratos fortemente imunoreativo à L-Pro (TAKEMOTO e SEMBA, 2006), sugerindo que esse aminoácido possa funcionar como neurotransmissor tradicional nessas áreas, envolvidas no controle do sistema cardiovascular. Estudos mostram que as respostas eletrofisiológicas da L-Pro em culturas de neurônios no corno dorsal são completamente abolidas pela associação dos antagonistas de receptores NMDA (AP5), não-NMDA (CNQX) e de glicina (estriquinina), sugerindo que a L-Pro possa ativar tanto os receptores ionotrópicos glutamatérgicos (NMDA e não-NMDA) quanto inibitórios (glicina) (HENZI, 1992). Gaba, glicina e glutamato reduziram aproximadamente 30% da ligação da L-Pro em membranas sinápticas do cérebro

de ratos (ORTIZ *et al.*, 1997). Além disso, antagonistas de receptores NMDA (AP-7, CPP e CGS 19755), o bloqueador do canal do receptor NMDA (MK-801), e o agonista parcial do sítio de glicina, HA-966 deslocaram a ligação da [H³]Pro em membranas sinápticas do cérebro de ratos (CORDERO *et al.*, 1991; ORTIZ *et al.*, 1997). Porém, a L-Pro não deslocou a ligação do MK-801, bloqueador do canal do receptor NMDA, e deslocou a ligação da glicina, sugerindo que a L-Pro possa interagir no sítio modulatório de glicina no receptor NMDA. Entretanto, existem evidências sugerindo que o sítio da L-Pro não seja o mesmo do L-Glu, uma vez que a ligação específica da L-Pro em membranas sinápticas hipocámpais não foi significativamente deslocada pelos aminoácidos excitatórios L-Glu e L-aspartato (GREENE *et al.*, 1986). Ainda, é possível que o candidato a neurotransmissor, L-Pro, tenha um receptor específico sensível a antagonistas de receptores ionotrópicos glutamatérgicos.

Considerando os resultados relatados e destacando que várias estruturas hipotalâmicas envolvidas na regulação do sistema cardiovascular apresentam um sistema de captação e liberação de L-Pro (CAMARGO *et al.*, 1979; HAUPTMANN *et al.*, 1983; FREMEAU *et al.*, 1992; BUSNARDO *et al.*, 2007), estudos imunohistoquímicos e farmacológicos mostrando que o hipotálamo, entre as áreas envolvidas no controle cardiovascular, contém elevados níveis de receptores ionotrópicos aminoácidos excitatórios (MEEKER *et al.*, 1994; SINGEWALD e PHILIPPU, 1996) e os estudos de ligação mostrando que a L-Pro se liga em receptores ionotrópicos aminoácido excitatório do tipo NMDA e não-NMDA (NISTRÌ e MORELLI, 1978; AULT *et al.*, 1987; CORDERO *et al.*, 1991; HENZI *et al.*, 1992; PACE *et al.*, 1992; ORTIZ *et al.*, 1997), nossos resultados podem sugerir que a L-Pro microinjetada no 3 V ao banhar a parede medial do hipotálamo, está em contato

com o núcleo paraventricular hipotalâmico, podendo estimular diretamente neurônios magnocelulares e parvocelulares daquele núcleo, causando liberação de vasopressina através da neuro-hipófise, que ao atuar em receptores V_1 vasopressinérgicos na musculatura lisa vascular, levaria ao aumento da pressão arterial e à queda da frequência cardíaca. Entretanto, não se exclui a possibilidade de que a L- Pro injetada no 3 V possa atingir o tronco cerebral e estimular sítios na ponte ou bulbo, os quais ativariam uma via neural liberando vasopressina na circulação periférica (TAKEMOTO, 1995).

Esta é a primeira evidência que relata os efeitos cardiovasculares da L-Pro no 3 V, espaço que banha estruturas suprabulbares, bem como os mecanismos envolvidos nesta mediação.

7. CONCLUSÃO

Podemos concluir que o aminoácido endógeno, L-Pro, candidato a neurotransmissor ou neuromodulador, quando microinjetado no 3 V de ratos não anestesiados, causa aumento da pressão arterial e queda da frequência cardíaca de maneira dose-dependente, e que essas respostas são mediadas por liberação sistêmica de vasopressina.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, F. H., C. C. CRESTANI, *et al.* Cardiovascular effects of carbachol microinjected into the bed nucleus of the stria terminalis of the rat brain. Brain Res, v.1143, Apr 27, p.161-8. 2007.

AULT, B., C. M. WANG, *et al.* L-proline depolarizes rat spinal motoneurons by an excitatory amino acid antagonist-sensitive mechanism. Br J Pharmacol, v.92, n.2, Oct, p.319-26. 1987.

BALCAR, V. J., G. A. JOHNSTON, *et al.* Transport of L-proline by rat brain slices. Brain Res, v.102, n.1, Jan 30, p.143-51. 1976.

BENNETT, J. P., JR., W. J. LOGAN, *et al.* Amino acid neurotransmitter candidates: sodium-dependent high-affinity uptake by unique synaptosomal fractions. Science, v.178, n.64, Dec 1, p.997-9. 1972.

BORGES, R. F. B. Ajuste de coordenadas estereotáticas para ratos com pesos variáveis. 1999. Dissertação (Mestrado em Farmacologia). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto. 1999.

BRILEY, E. M., S. J. LOLAIT, *et al.* The cloned vasopressin V1a receptor stimulates phospholipase A2, phospholipase C, and phospholipase D through activation of receptor-operated calcium channels. Neuropeptides, v.27, n.1, Jul, p.63-74. 1994.

BUSNARDO, C., R. F. TAVARES, *et al.* Cardiovascular effects of L-glutamate microinjection in the supraoptic nucleus of unanaesthetized rats. Neuropharmacology, v.52, n.6, May, p.1378-84. 2007.

CAMARGO, L. A., W. A. SAAD, *et al.* Effects of noradrenergic stimulation of the medial and lateral hypothalamus on cardiovascular responses. Pharmacol Res Commun, v.11, n.2, Feb, p.147-56. 1979.

CHALMERS, J. e P. PILOWSKY. Brainstem and bulbospinal neurotransmitter systems in the control of blood pressure. J Hypertens, v.9, n.8, Aug, p.675-94. 1991.

CHUSID, J. G. Neuroanatomia correlativa e neurologia funcional. Editora Guanabara Koogan. 18 edição. p.p 46-47. 1985.

CORDERO, M. L., A. E. NEGRON, *et al.* Inhibition of high-affinity [3H]L-proline binding to rat brain membranes by 2-amino-7-phosphonoheptanoic acid. Eur J Pharmacol, v.208, n.2, Oct 14, p.179-81. 1991.

CORREA, F. M., I. A. MAGRO, *et al.* Mechanism of the CNS-mediated pressor response to intracerebroventricular injection of noradrenaline in unanaesthetized rats. Neuropharmacology, v.24, n.9, Sep, p.831-7. 1985.

COWLEY, A. W., JR. e J. F. LIARD. Vasopressin and arterial pressure regulation. Special lecture. Hypertension, v.11, n.2 Pt 2, Feb, p.125-32. 1988.

COWLEY, A. W., JR., E. Q. QUILLEN, JR., *et al.* Role of vasopressin in cardiovascular regulation. Fed Proc, v.42, n.15, Dec, p.3170-6. 1983.

CRESTANI, C. C., F. H. ALVES, *et al.* Cardiovascular effects of noradrenaline microinjection in the bed nucleus of the stria terminalis of the rat brain. J Neurosci Res, v.85, n.7, May 15, p.1592-9. 2007.

DAMPNEY, R. A. Functional organization of central pathways regulating the cardiovascular system. Physiol Rev, v.74, n.2, Apr, p.323-64. 1994.

DEOLINDO, M., G. G. PELOSI, *et al.* The ventrolateral periaqueductal gray is involved in the cardiovascular response evoked by l-glutamate microinjection into the lateral hypothalamus of anesthetized rats. Neurosci Lett, v.430, n.2, Jan 10, p.124-9. 2008.

FELIX, D. e H. KUNZLE. The role of proline in nervous transmission. Adv Biochem Psychopharmacol, v.15, p.165-73. 1976.

FERNANDES, K. B., G. E. CRIPPA, *et al.* Mechanisms involved in the pressor response to noradrenaline injection into the cingulate cortex of unanesthetized rats. Neuropharmacology, v.44, n.6, May, p.757-63. 2003.

FOLKOW, B. Physiology of behavior and blood pressure regulation in animals. In: Handbook of Hypertension 9, Julius S., Basset D.R., eds. New York, Elsevier. 1987.

FREMEAU, R. T., JR., M. G. CARON, *et al.* Molecular cloning and expression of a high affinity L-proline transporter expressed in putative glutamatergic pathways of rat brain. Neuron, v.8, n.5, May, p.915-26. 1992.

GELSEMA, A. J. e F. R. CALARESU. Chemical microstimulation of the septal area lowers arterial pressure in the rat. Am J Physiol, v.252, n.4 Pt 2, Apr, p.R760-7. 1987.

GOLDSTEIN, D. S. Central catecholamines and the control of sympathetic tone. In 2, Central Neural Mechanisms in Cardiovascular Regulation, v.02. Eds. Kunos G., Ciriello J., Boston,. 1991.

GREENE, W. M., A. WANG, *et al.* Sodium-independent binding of L-[3H]proline to hippocampal synaptic membranes. Eur J Pharmacol, v.130, n.3, Nov 4, p.333-6. 1986.

GUYNET, P. G. Role of ventral medulla oblongata in blood pressure regulation. In: Central Regulation of Autonomic Functions. Eds. LOEWY, A.D., SPYER, K.M. Oxford University Press: New York,. p.p.145-167. 1990.

HAUPTMANN, M., D. F. WILSON, *et al.* High affinity proline uptake in rat brain synaptosomes. FEBS Lett, v.161, n.2, Sep 19, p.301-5. 1983.

HENZI, V., D. B. REICHLING, *et al.* L-proline activates glutamate and glycine receptors in cultured rat dorsal horn neurons. Mol Pharmacol, v.41, n.4, Apr, p.793-801. 1992.

LOGAN, W. J. e S. H. SNYDER. High affinity uptake systems for glycine, glutamic and aspartic acids in synaptosomes of rat central nervous tissues. Brain Res, v.42, n.2, Jul 20, p.413-31. 1972.

MATSUZAWA, T. e Y. OBARA. Amino acid synthesis from ornithine: enzymes and quantitative comparison in brain slices and detached retinas from rats and chicks. Brain Res, v.413, n.2, Jun 16, p.314-9. 1987.

MEEKER, R. B., R. S. GREENWOOD, *et al.* Glutamate receptors in the rat hypothalamus and pituitary. Endocrinology, v.134, n.2, Feb, p.621-9. 1994.

MULDER, A. H. e S. H. SNYDER. Potassium-induced release of amino acids from cerebral cortex and spinal cord slices of the rat. Brain Res, v.76, n.2, Aug 16, p.297-308. 1974.

NADLER, J. V. Sodium-dependent proline uptake in the rat hippocampal formation: association with ipsilateral-commissural projections of CA3 pyramidal cells. J Neurochem, v.49, n.4, Oct, p.1155-60. 1987.

NADLER, J. V., S. D. BRAY, *et al.* Autoradiographic localization of proline uptake in excitatory hippocampal pathways. Hippocampus, v.2, n.3, Jul, p.269-78. 1992.

NICKOLSON, V. J. "On" and "off" responses of K⁺-induced synaptosomal proline release: involvement of the sodium pump. J Neurochem, v.38, n.1, Jan, p.289-92. 1982.

NISTRÌ, A. e P. MORELLI. Effects of proline and other neutral amino acids on ventral root potentials of the frog spinal cord in vitro. Neuropharmacology, v.17, n.1, Jan, p.21-7. 1978.

ORTIZ, J. G., M. L. CORDERO, *et al.* Proline-glutamate interactions in the CNS. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, v.21, n.1, Jan, p.141-52. 1997.

PACE, J. R., B. M. MARTIN, *et al.* High concentrations of neutral amino acids activate NMDA receptor currents in rat hippocampal neurons. Neurosci Lett, v.141, n.1, Jul 6, p.97-100. 1992.

PAXINOS, G., WATSON, C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, Compact 6th Edition. Academic Press, Sydney, . 2007.

PELOSI, G. G. e F. M. CORREA. Cardiovascular effects of noradrenaline microinjected into the dorsal periaqueductal gray area of unanaesthetized rats. Eur J Neurosci, v.22, n.12, Dec, p.3188-94. 2005.

PERES-POLON, V. L. e F. M. CORREA. Pressor effects of acetylcholine injected into the lateral septal area of conscious rats. Neuropharmacology, v.33, n.12, Dec, p.1537-44. 1994.

PHILLIPS, P. A., J. M. ABRAHAMMS, *et al.* Localization of vasopressin binding sites in rat tissues using specific V1 and V2 selective ligands. Endocrinology, v.126, n.3, Mar, p.1478-84. 1990.

RENICK, S. E., D. T. KLEVEN, *et al.* The mammalian brain high-affinity L-proline transporter is enriched preferentially in synaptic vesicles in a subpopulation of excitatory nerve terminals in rat forebrain. J Neurosci, v.19, n.1, Jan 1, p.21-33. 1999.

SCOPINHO, A. A., L. B. RESSTEL, *et al.* Pressor effects of noradrenaline injected into the lateral septal area of unanesthetized rats. Brain Res, v.1122, n.1, Nov 29, p.126-34. 2006.

SHAFQAT, S., M. VELAZ-FAIRCLOTH, *et al.* Human brain-specific L-proline transporter: molecular cloning, functional expression, and chromosomal localization of the gene in human and mouse genomes. Mol Pharmacol, v.48, n.2, Aug, p.219-29. 1995.

SINGEWALD, N. e A. PHILIPPU. Involvement of biogenic amines and amino acids in the central regulation of cardiovascular homeostasis. Trends Pharmacol Sci, v.17, n.10, Oct, p.356-63. 1996.

SNYDER, S. H., A. B. YOUNG, *et al.* Synaptic biochemistry of amino acids. Fed Proc, v.32, n.10, Oct, p.2039-47. 1973.

STEEDMAN, W. M. Micro-electrode studies on mammalian vascular muscle. J Physiol, v.186, n.2, Oct, p.382-400. 1966.

SWAAB, D. F., C. W. POOL, *et al.* Immunofluorescence of vasopressin and oxytocin in the rat hypothalamo-neurohypophyseal system. J Neural Transm, v.36, n.3-4, p.195-215. 1975.

SWANSON, L. W. e P. E. SAWCHENKO. Hypothalamic integration: organization of the paraventricular and supraoptic nuclei. Annu Rev Neurosci, v.6, p.269-324. 1983.

SZCZEPANSKA-SADOWSKA, E. Interaction of vasopressin and angiotensin II in central control of blood pressure and thirst. Regul Pept, v.66, n.1-2, Oct 8, p.65-71. 1996.

TAKEMOTO, Y. Amino acids with central pressor effect in conscious rats. Jpn J Physiol, v.40, n.4, p.561-5. 1990.

_____. Regional hemodynamic changes and vasopressin release induced by intracisternal injection of L-proline in the conscious rat. Jpn J Physiol, v.45, n.5, p.743-58. 1995.

_____. Kynurenic acid inhibits circulatory responses to intracisternally injected L-proline in conscious rats. Neurosci Lett, v.261, n.1-2, Feb 12, p.121-3. 1999.

_____. Depressor and bradycardic actions of L-proline injected into the nucleus tractus solitarii of anesthetized rats. Jpn J Physiol, v.51, n.6, Dec, p.687-92. 2001.

_____. L-proline microinjected into the rat ventrolateral medulla induces a depressor response distinct from L-glutamate. Jpn J Physiol, v.54, n.4, Aug, p.339-45. 2004.

_____. Depressor responses to L-proline microinjected into the rat ventrolateral medulla are mediated by ionotropic excitatory amino acid receptors. Auton Neurosci, v.120, n.1-2, Jun 15, p.108-12. 2005.

TAKEMOTO, Y. e R. SEMBA. Immunohistochemical evidence for the localization of neurons containing the putative transmitter L-proline in rat brain. Brain Res, v.1073-1074, Feb 16, p.311-5. 2006.

TAVARES, R. F. e F. M. DE AGUIAR CORREA. Pressor effects of L-glutamate injected into the diagonal band of Broca of unanesthetized rats. Brain Res, v.959, n.2, Jan 10, p.312-9. 2003.

VELAZ-FAIRCLOTH, M., A. GUADANO-FERRAZ, *et al.* Mammalian brain-specific L-proline transporter. Neuronal localization of mRNA and enrichment of transporter protein in synaptic plasma membranes. J Biol Chem, v.270, n.26, Jun 30, p.15755-61. 1995.

VERBERNE, A. J. e N. C. OWENS. Cortical modulation of the cardiovascular system. Prog Neurobiol, v.54, n.2, Feb, p.149-68. 1998.

YONEDA, Y. e E. ROBERTS. A new synaptosomal biosynthetic pathway of proline from ornithine and its negative feedback inhibition by proline. Brain Res, v.239, n.2, May 13, p.479-88. 1982.

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](#)