

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

**ESTUDO DA NEUROTRANSMISSÃO DO QUIMIORREFLEXO
E DO BARORREFLEXO NA ÁREA A5 DE RATOS
NÃO-ANESTESIADOS**

Guilherme Medeiros dos Santos

Belo Horizonte - MG

2007

Guilherme Medeiros dos Santos

**ESTUDO DA NEUROTRANSMISSÃO DO QUIMIORREFLEXO
E DO BARORREFLEXO NA ÁREA A5 DE RATOS NÃO ANESTESIADOS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia, Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Andréa Siqueira Haibara

043 Santos, Guilherme Medeiros dos.
S237e Estudo da neurotransmissão do quimiorreflexo e do barorreflexo na área
A5 de ratos não-anestesiados [manuscrito] / Guilherme Medeiros dos Santos.
– 2007.

104 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora : Andréa Siqueira Haibara.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais,
Departamento de Fisiologia e Biofísica.

1. Sistema nervoso central – Teses. 2. Sistema cardiovascular – Teses. 3.
Barorreflexo – Teses. 4. Sinapse – Teses. 5. Rato como animal de laboratório -
Teses. I. Haibara, Andréa Siqueira. II. Universidade Federal de Minas Gerais.
Departamento de Fisiologia e Biofísica. III. Título.

CDU: 612.8

Folha de aprovação

Dedico esse trabalho
aos meus pais, Vagner e Tânia,
pelos maiores ensinamentos, amor,
respeito, perseverança e responsabilidade.

AGRADECIMENTOS

O meu mais sinceros agradecimentos:

À minha família, pais Vagner e Tânia, irmãos Leandro e Luiz Henrique pelo amor, carinho, apoio incondicional, vocês são a razão de tudo isso.

A minha amada Fernanda pelo amor, carinho, companheirismo, incentivo e por me fazer ainda mais feliz.

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Andréa Haibara por acreditar, confiar, conselhos e ensinamentos que certamente levarei por toda a vida.

À Gisele Maia, irmãzinha, super paciente e confidente. Aos demais membros da família Haibara: Tatiane Murça, Shirley, Marina, Edson, Marcos Melo.

Aos professores do Laboratório de Hipertensão Dr. Robson Augusto Souza Santos, Dr. Marco Antônio Pelik Fontes, Dr^a. Maria José Campagnole-Santos, e demais professores do Departamento de Fisiologia e Biofísica pelos valorosos ensinamentos.

Aos amigos Rodrigo, Gonzaga, Daniel e Sílvia.

Aos amigos, colegas e funcionários do Laboratório de Hipertensão. Agradecimento especial a Prof^a. Leonor Tapias da Mata Machado pelos primeiros passos na Fisiologia; e Sr. José Roberto por sua alegria, amizade e competência, sempre tornando os dias de trabalho agradáveis e possíveis.

Aos demais amigos do Programa de Pós-Graduação e ICB.

Aos funcionários dessa instituição, em especial ao Sr. Darcy, maior defensor dos alunos da UFMG e funcionário exemplar.

Aos demais familiares, especialmente, minha tia e segunda mãe, Delça (*in memoriam*) por todo o amor e carinho. Sua luz sempre brilhará em meu coração.

À Leila e família, que ainda está crescendo.

À Rosângela e Paulo, Paulinho, Mariana e Amanda e João Carlos, pelos bons momentos e por tão bem me receberem e acolherem.

Aos amigos de todos os momentos Alexandre, André, Natália, Franco, Bruno, Emanuel, Carlo Rachid, Priscila, André Vaz, Gléber, Ana Luiza e Gustavo.

ÍNDICE

1. RESUMO	11
2. ABSTRACT	14
3. INTRODUÇÃO	17
3.1. Barorreceptores arteriais e quimiorreceptores periféricos	18
3.2. Vias neurais do barorreflexo e quimiorreflexo	20
3.3. Área A5	22
3.4. Área A5 e reflexos cardiovasculares	24
4. OBJETIVOS	28
4.1. Objetivo geral	29
4.2. Objetivo específicos	29
5. MATERIAL E MÉTODOS	30
5.1. Animais	31
5.2. Implante de cânulas-guia dirigidas para a área A5	31
5.3. Técnica para microinjeção de drogas na área A5	32
5.4. Canulação da artéria e veia femoral	32
5.5. Registro da pressão arterial e da frequência cardíaca	33
5.6. Estimulação dos quimiorreceptores periféricos	33
5.7. Estimulação dos barorreceptores arteriais	34
5.8. Drogas utilizadas	35
5.9. Histologia	35
5.10. Análise estatística dos resultados	36
5.11. Protocolos experimentais	36
5.11.1. Efeitos cardiovasculares induzidos pela microinjeção bilateral do ácido kinurênico na área A5 sobre as respostas cardiovasculares induzidas pela estimulação do quimiorreflexo	36
5.11.2. Efeitos cardiovasculares induzidos pela microinjeção unilateral do agonista glutamatérgico metabotrópico ACPD na área A5	37
5.11.3. Efeitos cardiovasculares induzidos pela microinjeção bilateral do MCPG na	

área A5 sobre as respostas cardiovasculares induzidas pela estimulação do quimiorreflexo	38
5.11.4. Efeitos cardiovasculares induzidos pela microinjeção bilateral de bicuculina na área A5 sobre as respostas cardiovasculares induzidas pela estimulação do quimiorreflexo	38
5.11.5. Efeitos cardiovasculares induzidos pela microinjeção bilateral de muscimol na área A5 sobre as respostas cardiovasculares induzidas pela estimulação do barorreflexo	39
5.11.6. Efeitos cardiovasculares induzidos pela microinjeção bilateral de muscimol na área A5 sobre as respostas cardiovasculares induzidas pela estimulação do barorreflexo	40
6. RESULTADOS	42
6.1. Efeitos cardiovasculares induzidos pela microinjeção bilateral do ácido kinurênico na área A5 sobre as respostas cardiovasculares induzidas pela estimulação do quimiorreflexo	43
6.2. Efeitos cardiovasculares induzidos pela microinjeção unilateral do agonista glutamatérgico metabotrópico ACPD na área A5	49
6.3. Efeitos cardiovasculares induzidos pela microinjeção bilateral do MCPG na área A5 sobre as respostas cardiovasculares induzidas pela estimulação do quimiorreflexo	55
6.4. Efeitos cardiovasculares induzidos pela microinjeção bilateral de bicuculina na área A5 sobre as respostas cardiovasculares induzidas pela estimulação do quimiorreflexo	59
6.5. Efeitos cardiovasculares induzidos pela microinjeção bilateral de muscimol na área A5 sobre as respostas cardiovasculares induzidas pela estimulação do barorreflexo	63
6.6. Efeitos cardiovasculares induzidos pela microinjeção bilateral de muscimol na área A5 sobre as respostas cardiovasculares induzidas pela estimulação do barorreflexo	70
6.7. Análise histológica	73
7. DISCUSSÃO	75
8. SUMÁRIO E CONCLUSÕES	85
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88

1. RESUMO

O sistema circulatório é essencial para a manutenção da homeostase do organismo. A regulação neural do sistema cardiovascular envolve a ativação de vários grupos de sensores localizados na periferia gerando informações que são enviadas para o sistema nervoso central, e a modulação dessa informação no SNC com conseqüente modulação do sistema nervoso autônomo. Entre os sensores periféricos podemos destacar os barorreceptores arteriais, receptores cardiopulmonares e os quimiorreceptores periféricos.

A área A5 é uma região localizada no tronco encefálico, mais especificamente na ponte, constituída por um grupamento de neurônios noradrenérgicos. Estudos neuroanatômicos identificaram conexões da área A5 com várias áreas envolvidas no controle cardiovascular. Estudo realizado em nosso laboratório demonstrou que a estimulação da área A5 promove resposta pressora e taquicárdica e ainda atribuiu aos neurônios noradrenérgicos dessa área um papel essencial ao componente pressor do quimiorreflexo em ratos não anestesiados. Estudos anteriores demonstraram que alterações dos níveis de pressão arterial modificam a atividade espontânea dos neurônios da área A5, modificações estas dependentes da integridade das vias aferentes barorreceptoras. No entanto o papel da área A5 na integração das respostas barorreflexas em ratos não anestesiado permanece por ser melhor investigado.

Dessa forma procuramos nesse trabalho avaliar a neurotransmissão do componente simpato-excitatório do quimiorreflexo na área A5, bem como avaliar a participação desta área na regulação do componente cardíaco do barorreflexo, em ratos não-anestesiados.

Em nossos resultados observamos que o antagonista glutamatérgico ionotrópico ácido kinurênico, assim como o antagonista glutamatérgico metabotrópico MCPG, não alteraram as respostas cardiovasculares induzidas pela estimulação do

quimiorreflexo. Também observamos que o bloqueio dos receptores gabaérgicos da área A5 não resultou em alteração da pressão arterial basal, bem como não alterou a resposta pressora do quimiorreflexo, sugerindo que a neurotransmissão da resposta simpato-excitatória deste reflexo na área A5 não ocorre por desinibição de seus neurônios. Outro achado do presente estudo indica que a sensibilidade da bradicardia bem como da taquicardia barorreflexa não foram alteradas após a inibição da área A5.

O conjunto destes resultados indica que o neurotransmissor L-glutamato, não está envolvido na integração do componente simpato-excitatório da resposta quimiorreflexa. Em relação ao barorreflexo concluímos que a área A5 não participa de forma importante da modulação do controle barorreflexo da frequência cardíaca.

2. ABSTRACT

The circulatory system is essential for the maintenance of body homeostasis. Neural regulation of the cardiovascular system involves the activation of several groups of peripheral sensors that generates the information to central nervous system, with consequent modulation of the autonomic nervous system. Among the peripheral sensors the arterial baroreceptors, the cardiopulmonary receptors and the peripheral chemoreceptors can be highlighted.

The A5 area is a region localized in the brainstem, more precisely in the pons, and is comprised of noradrenergic neurons. Neuroanatomy studies have identified connections between the A5 area and several areas involved in cardiovascular control. Previous studies conducted in our laboratory demonstrated that stimulation of the A5 area produced large pressor response and tachycardia. Additionally, this study demonstrated the essential role of this area in the chemoreflex pressor component in unanesthetized rats. Other studies have demonstrated that alterations in arterial pressure modified the spontaneous activity of the A5 area neurons, in within modifications depends of baroreceptor afferent input integrity. However, the role of the A5 area in the integration of baroreflex responses in unanesthetized rats still needs to be further investigated.

Moreover, we evaluated the neurotransmission of the chemoreflex sympatho-excitatory component within the A5 area, as well, we evaluated the participation of this area in the cardiac baroreflex regulation, in unanesthetized rats.

In our findings, both the ionotropic glutamatergic antagonist kynurenic acid, as well as the metabotropic glutamatergic antagonist MCPG, did not altered cardiovascular responses induced by chemoreflex stimulation. We also demonstrated that the blockade of gabaergic receptors of the A5 area did not result in alterations in basal arterial pressure. Additionally, this blockade did not alter the chemoreflex pressor response, suggesting that the sympatho-excitatory neurotransmission in the

A5 area does not occur through disinhibition of these neurons. Other findings from the present study indicate that the sensitivity of baroreflex bradycardia as well as the baroreflex tachycardia was not altered after the inhibition of the A5 area.

Together these results indicate that the L-glutamate neurotransmitter was not involved in the integration of the sympatho-excitatory component of the chemoreflex response. Our data also showed that the A5 area does not participate in baroreflex control of heart rate.

3. INTRODUÇÃO

O sistema cardiovascular tem papel fundamental na manutenção da homeostase do organismo, proporcionando uma pressão de perfusão sanguínea adequada para todos os tecidos e órgãos do organismo. Essa função depende da ação integrada de mecanismos de controle local, humoral e neural. A regulação neural do sistema cardiovascular envolve a ativação de vários grupos de sensores localizados na periferia, os quais enviam informações referentes ao nível de pressão arterial, volume sanguíneo circulante e tensão dos gases sanguíneos arteriais para o sistema nervoso central, resultando na modulação da atividade autonômica eferente, do padrão respiratório e da liberação de agentes humorais para produzir respostas fisiológicas apropriadas. Entre os sensores periféricos podemos destacar os barorreceptores arteriais, os receptores cardiopulmonares e os quimiorreceptores periféricos (Spyer, 1990).

3.1 Barorreceptores arteriais e quimiorreceptores periféricos

Os barorreceptores arteriais são terminações nervosas livres, densamente ramificadas, localizadas primordialmente nas paredes do arco aórtico e dos seios carotídeos. As terminações barorreceptoras se distribuem na camada adventícia, próximo à borda médio-adventicial da parede vascular, onde se ancoram fortemente aos demais constituintes do vaso, envoltas por colágeno e elastina. São, conseqüentemente, parte integrante da estrutura vascular (Kirchheim, 1976).

O principal mecanismo de ativação dos barorreceptores é a deformação mecânica das terminações neurais, decorrentes da distensão da parede vascular determinada pela onda de pulso. Desta forma, os barorreceptores constituem-se, em última análise, em mecanorreceptores (Kirchheim, 1976).

A função primordial dos barorreceptores é manter a pressão arterial estável, dentro de uma faixa estreita de variação, esteja o indivíduo em repouso ou em

atividade. Elevações súbitas da pressão arterial aumentam a atividade dos barorreceptores, os quais reflexamente inibem a atividade tônica simpática (Bronk e cols., 1936; Downing e Siegel, 1963) e aumentam a atividade vagal (Katona e cols., 1970), produzindo redução da resistência periférica total, da frequência cardíaca e do débito cardíaco, contribuindo assim para o retorno da pressão arterial aos níveis normais. Dessa forma os barorreceptores são os principais responsáveis pela regulação rápida da pressão arterial momento-a-momento.

Além dos barorreceptores arteriais, os quimiorreceptores periféricos também participam do controle da pressão arterial (Marshall, 1994). Os quimiorreceptores periféricos encontram-se distribuídos em corpúsculos carotídeos e aórticos, localizados bilateralmente na bifurcação da artéria carótida comum (quimiorreceptores carotídeos) ou em pequenos corpúsculos espalhados entre o arco aórtico e a artéria pulmonar (quimiorreceptores aórticos) (Sapru e Krieger, 1977). Entretanto, de acordo com Easton e Howe. (1983) os corpúsculos aórticos estão geralmente ausentes no coelho, rato e camundongo. O corpúsculo carotídeo é irrigado por uma pequena artéria originada da artéria carótida comum, e em conjunto com a drenagem venosa forma um complexo vascular que ocupa aproximadamente um terço do volume do corpúsculo. Dessa forma o corpúsculo carotídeo é irrigado numa proporção 5 a 6 vezes maior que a vascularização do cérebro (González e cols., 1994).

Os corpúsculos carotídeos são formados por dois tipos celulares, as células do tipo I ou células glomais, quimiossensíveis, em maior número, intimamente associadas aos capilares sanguíneos, e envoltas pelas células do tipo II ou células de sustentação (Kock, 1951). As células glomais são altamente especializadas, capazes de detectar alterações da pressão parcial de oxigênio e pressão parcial de dióxido de carbono e concentração de hidrogênio do sangue (Biscoe, 1971).

Heymans e Bouckaert (1930) mostraram, através de experimentos de circulação cruzada, que a perfusão *in situ* do seio carotídeo com sangue de um animal doador submetido à hipoventilação, promovia reflexamente no animal receptor respostas de hiperventilação, sugerindo que a composição química do sangue influenciava reflexamente a atividade dos centros respiratórios. Dessa forma, a ativação dos quimiorreceptores carotídeos resulta em ajustes ventilatórios que se caracterizam por aumento do volume de ar corrente, aumento da frequência respiratória e aumento do volume minuto respiratório, exercendo, portanto, um importante papel no controle reflexo da ventilação (Daly e cols., 1965). Além de promover respostas ventilatórias, a estimulação dos quimiorreceptores periféricos também modifica reflexamente os valores de pressão arterial e frequência cardíaca (Marshall, 1994). Estudos de Bernthal (1951), Franchini e Krieger (1993) e Haibara e cols. (1995) demonstraram que a estimulação dos quimiorreceptores periféricos promove reflexamente, além de taquipnéia, aumento da pressão arterial e bradicardia. Dessa forma, o papel fisiológico dos quimiorreceptores periféricos está relacionado com a promoção de ajustes ventilatórios e cardiovasculares no intuito de proporcionar a manutenção da composição química do sangue em níveis ideais, bem como uma pressão de perfusão sanguínea adequada para todos os tecidos.

3.2 Vias neurais do barorreflexo e quimiorreflexo

Os impulsos gerados nos barorreceptores são conduzidos pelos nervos vago e glossofaríngeo até ao núcleo do trato solitário (NTS) localizado no bulbo, onde estimulam neurônios de segunda ordem que se projetam para neurônios da área bulbar ventrolateral caudal (CVL) (Dampney, 1994; Spyer, 1994). Os neurônios da CVL, por sua vez, inibem os neurônios da área bulbar ventrolateral rostral (RVL), através de sinapse gabaérgica (Li, 1991; Jeske, 1995). O RVL possui um grupo de

neurônios ativos ou ativados tonicamente que desempenham função essencial na geração do tônus simpático vasomotor, contribuindo dessa forma para a manutenção da pressão arterial (Lipski e cols., 2002). Também foi demonstrado em estudos de Stuesse e Fish (1984) que o núcleo ambíguo (NA), uma área que constitui a origem das fibras pré-ganglionares parassimpáticas cardíacas (McAllen e Spyer, 1976; Stuesse 1982), recebe projeções diretas do NTS. Ainda, estudos de Cheng e cols. (2004) demonstraram que a lesão química do NA atenua a bradicardia barorreflexa. Dessa forma a estimulação dos barorreceptores produz redução reflexa da atividade simpática e aumento da atividade parassimpática vagal, através da ativação de projeções do NTS para o CVL, que por sua vez inibe o RVL, bem como do NTS para o NA, resultando em dilatação arteriolar e venosa, redução da contratilidade miocárdica e bradicardia (Aicher e cols., 2000).

Assim como ocorre com a transmissão da informação detectada pelos barorreceptores, os impulsos gerados pelos quimiorreceptores, percorrem os nervos vago e glossofaríngeo em direção ao bulbo, também realizando a sua primeira sinapse no NTS (Mifflin, 1993; Chitravanshi e Sapru, 1995). Dessa forma, o NTS pode ser considerado como a mais importante estação sináptica do tronco cerebral que integra informações aferentes do sistema cardiovascular, produzindo ajustes autonômicos e ventilatórios adequados às diferentes situações fisiológicas (Spyer, 1990). Estudos neuroanatômicos (Ross e cols. 1985; Aicher e cols., 1996) e farmacológicos (Urbanski e Sapru 1988) sugerem a existência de uma via excitatória direta do NTS para a área bulbar ventrolateral rostral (RVL). Dessa forma, é possível sugerir que as vias neurais relacionadas à ativação dos quimiorreceptores periféricos envolvam a ativação de projeções do NTS tanto para o RVL quanto para o NA, determinado aumento do tônus simpático e parassimpático, respectivamente, resultando nas respostas pressora e bradicárdica quimiorreflexas.

Estudos de Sun e Spyer (1991), Koshiya e cols. (1993) e Koshiya e Guyenet (1996) suportam a hipótese levantada anteriormente sugerindo que o RVL participa, ao menos em parte, da resposta simpato-excitatória do quimiorreflexo. Entretanto, estudos de Amaral (1999) e Mauad e Machado (2001), realizados em ratos não anestesiados, mostraram que o bloqueio do RVL com ácido kinurênico ou muscimol, não alterou a resposta pressora à ativação dos quimiorreceptores carotídeos, sugerindo que o RVL, nesta condição experimental, não participa de forma importante da resposta simpato-excitatória do quimiorreflexo. Esses estudos sugerem ainda que o componente pressor da resposta quimiorreflexa seja mediado devido à estimulação de outras áreas do SNC, à partir do NTS, que não exclusivamente o RVL. Esta hipótese é plausível uma vez que o RVL não é a única estrutura com projeções diretas para os neurônios pré-ganglionares simpáticos da coluna intermédio lateral (CIML). Além do RVL, a área bulbar ventromedial rostral, o núcleo caudal da rafe, a área A5 e o núcleo hipotalâmico paraventricular também enviam projeções para a CIML, podendo desempenhar importante papel no controle simpático vasomotor (Strack e cols.; 1989).

3.3 Área A5

Vários estudos demonstram a importância dos neurônios catecolaminérgicos centrais em diferentes circuitos neuronais responsáveis pela manutenção da atividade eferente simpática e dos níveis normais de pressão arterial (Loewy e cols. 1979; Westlund, 1983; Minson, 1990; Guyenet, 1990; Madden e cols. 1999). Entretanto, o papel específico de cada grupo de neurônios catecolaminérgicos na regulação cardiovascular permanece por ser melhor investigado. Entre esses grupos de neurônios, Dahlström e Fuxe (1964) destacam cinco deles, denominados de área A1, área A2, área A5, área A6 e área A7.

A área A5 está localizada na região ventrolateral da ponte, entre o núcleo da oliva superior e fibras do nervo facial (Dahlström e Fuxe, 1964). A maioria dos neurônios da área A5 é constituída por células que contém a enzima dopamina β -hidroxilase, mas não a enzima feniletanolamina-N-metil-transferase (PNMT), caracterizando-se assim como uma área predominantemente de células noradrenérgicas (Swanson e Hartman, 1975).

Estudos neuroanatômicos mostram que a área A5 faz conexões com diferentes regiões do SNC sabidamente envolvidas no controle cardiovascular. A área A5 recebe aferências do núcleo hipotalâmico paraventricular, área hipotalâmica perifornical, núcleo parabraquial, NTS, núcleos da rafe e CVL (Byrum e Guyenet, 1987). A área A5 envia projeções para o NTS, área hipotalâmica lateral, núcleo hipotalâmico paraventricular, substância cinzenta periaquedutal e núcleo central da amígdala (Byrum e Guyenet, 1987). A área A5 também envia densas projeções (cerca de 90% desses neurônios) para a CIML na medula espinhal torácica e lombar (Loewy e cols., 1979; e Westlund e cols., 1983). Essas características anatômicas sugerem que os neurônios da área A5 desempenhem papel importante na regulação de funções autonômicas em geral, e em particular da pressão arterial.

Estudos funcionais em ratos anestesiados mostram a participação da área A5 na modulação cardiovascular. Estudos utilizando estimulação elétrica sugerem que a área A5 tenha papel simpato-excitatório, uma vez que a estimulação desta área promove resposta pressora (Loewy e cols. 1979; Andrade e Aghajanian, 1982; Byrum e cols. 1984; Woodruff e cols. 1986; Huangfu e cols. 1991; Huangfu e cols. 1992). Por outro lado, trabalhos realizados por Neil e cols. (1982); Stanek e cols. (1984); Drye e cols. (1990); Huangfu e cols. (1992) e Dickerson e cols. (1997) utilizando microinjeções de aminoácidos excitatórios diretamente na área A5 sugerem um papel simpato-inibitório dessa área. Embora a microinjeção de L-glutamato ou N-metil-

aspartato na área A5 de ratos anestesiados promova hipotensão, indicando que esta área tenha função predominantemente simpato-inibitória, estudos analisando o registro da atividade eferente simpática em diferentes leitos vasculares confrontam essa hipótese. Nesses estudos, Stanek e cols. (1984) e Huangfu e cols. (1992) mostraram que a estimulação da área A5 com L-glutamato em ratos anestesiados diminuiu a atividade simpática lombar, enquanto a atividade eferente simpática renal e esplâncnica aumentou. Diante dessas evidências é razoável sugerir que seja possível a ativação tanto de uma via simpato-inibitória quanto de uma via simpato-excitatória a partir da área A5, pelo menos no que diz respeito ao efeito da estimulação da área A5 em animais anestesiados.

Um aspecto importante que merece ser enfatizado em relação aos estudos citados acima é o fato de todos terem sido realizados em ratos anestesiados. Diferente do observado anteriormente a microinjeção de L-glutamato na área A5 de ratos não-anestesiados promoveu aumento da pressão arterial e taquicardia de forma dose-dependente (Ramos, 2002). Estes resultados indicam que a área A5, quando estimulada numa condição experimental fisiologicamente mais adequada, evitando-se a possível interferência dos efeitos dos anestésicos no processamento das informações no SNC, apresenta-se preferencialmente como uma área pressora, sugerindo um importante papel desse conjunto de neurônios no controle e/ou modulação da atividade eferente simpática.

3.4 Área A5 e reflexos cardiovasculares

Em relação à participação da área A5 nos reflexos cardiovasculares, estudos imunohistoquímicos de Erickson e Millhorn (1994) e de Hirooka e cols. (1997) demonstraram a expressão da proteína Fos nos neurônios noradrenérgicos da área A5 em animais submetidos à hipóxia, sugerindo que esses neurônios são estimulados

durante a ativação do quimiorreflexo. Estudos eletrofisiológicos de Guyenet e cols. (1993) mostraram ainda que a hipóxia aumenta a frequência de disparos dos neurônios da área A5, acompanhado ainda de aumento da pressão arterial e da atividade do nervo frênico, o que não foi observado em animais quimiodesnervados. Estudos funcionais de Koshiya e Guyenet (1994b) demonstraram que a microinjeção de muscimol na A5 promoveu redução de 68% do aumento da atividade simpática induzida pela estimulação dos quimiorreceptores periféricos. Em outro estudo de Koshiya e Guyenet (1994a), utilizando a neurotoxina 6-hidroxidopamina (6-OHDA) microinjetada na medula espinhal (ao nível de T2) e intracisternalmente, demonstraram que os neurônios A5 desempenham papel facilitatório no quimiorreflexo. Ramos (2002) utilizando muscimol e lidocaína microinjetadas bilateralmente na área A5 de ratos não anestesiados, observou atenuação significativa (82% e 86%, respectivamente) da resposta pressora do quimiorreflexo induzido por cianeto de potássio (KCN). Quando os neurônios noradrenérgicos dessa área foram lesados bilateralmente com 6-OHDA a resposta pressora quimiorreflexa foi praticamente abolida. O conjunto desses estudos sugere que os neurônios noradrenérgicos da área A5 desempenham papel essencial na resposta simpato-excitatória do quimiorreflexo.

Com relação à neurotransmissão das sinapses envolvidas na mediação das informações aferentes dos quimiorreceptores periféricos na área A5, ainda não está esclarecido qual ou quais seriam os neurotransmissores, bem como os subtipos de receptores que participam das mesmas.

Um possível candidato a neurotransmissor da informação quimiorreflexa na área A5 é o aminoácido excitatório L-glutamato. Guyenet e cols. (1993) mostraram que tanto a aplicação iontoforérica de L-glutamato na área A5 quanto a estimulação dos quimiorreceptores por hipóxia promovem aumento da frequência de disparos dos

neurônios dessa região. Em estudos anteriores de nosso laboratório (Ramos, 2002) mostramos ainda que a microinjeção de L-glutamato na área A5 de ratos não anestesiados promove respostas simpato-excitatórias (isto é, aumento da pressão arterial e taquicardia) de forma dose-dependente, sugerindo que a área A5 é parte integrante da resposta pressora do quimiorreflexo. Considerando o conjunto desses trabalhos, o primeiro objetivo deste estudo foi avaliar o papel dos receptores glutamatérgicos da área A5 na neurotransmissão do quimiorreflexo em ratos não anestesiados.

Já é bem estabelecido na literatura que o L-glutamato atua em diferentes tipos de receptores de aminoácidos excitatórios, ou seja, os receptores ionotrópicos, aqueles acoplados diretamente à canais iônicos (receptores NMDA, AMPA e kaínico) (Watkins e cols., 1981 e Davies, 1989), e receptores metabotrópicos, aqueles acoplados à proteína G, dependente, portanto, da ativação intracelular do sistema de segundos mensageiros (Shoepf e cols., 1990). Desta forma, ainda em relação à avaliação da neurotransmissão glutamatérgica, também consideramos em nosso estudo a possibilidade do L-glutamato atuar em diferentes subtipos de receptores de aminoácidos excitatórios (ionotrópicos e metabotrópicos) na mediação do quimiorreflexo na área A5.

Além do L-glutamato, outras substâncias e seus receptores já foram descritos e identificados na área A5. Estudos de Burman e cols. (2003) demonstraram que todos os neurônios da área A5 (>98%) expressam receptores GABA. Estudos fisiológicos e farmacológicos têm demonstrado que os receptores GABA participam da modulação da transmissão sináptica em neurônios catecolaminérgicos (Shefner e Osmanovic, 1991; Ruggeri e cols., 1996; Morrison e cols., 1999). Kwiat e cols. (1993) demonstraram ainda que os neurônios noradrenérgicos da área A5, com projeções para a CIML, recebem densas terminações gabaérgicas, e sugerem que essas

terminações regulam, possivelmente através de mecanismos inibitórios, a atividade dos neurônios da área A5. Entretanto, embora o GABA tenha sido encontrado na área A5, seu papel como neurotransmissor e/ou neuromodulador das aferências cardiovasculares nesta região permanece por ser determinado.

O papel da área A5 na modulação dos reflexos cardiovasculares não se restringe apenas ao quimiorreflexo. Estudos na literatura sugerem que a área A5 também participa da integração do barorreflexo. Estudos de Coote e MacLeod (1974) demonstraram que a integridade das vias eferentes noradrenérgicas para a CIML é necessária para a expressão efetiva do componente simpato-inibitório do barorreflexo. Considerando que os grupos de células noradrenérgicas localizados na ponte são as únicas fontes de terminais noradrenérgicos na medula espinhal, como demonstrado por Westlund (1983), é razoável supor a área A5 participe das respostas reflexas à estimulação dos barorreceptores. Neste sentido, estudos eletrofisiológicos de Andrade e Aghajanian (1982), Guyenet (1984) e Huangfu e cols. (1991) demonstraram que a elevação da pressão arterial promove redução da atividade dos neurônios da área A5, enquanto que a diminuição da pressão arterial aumenta atividade desses neurônios. Guyenet (1984) demonstrou ainda que as alterações dos disparos dos neurônios da área A5 não ocorrem em animais com desnervação dos barorreceptores. Esse conjunto de resultados sugere que os neurônios da área A5 participem da via neural do barorreflexo. Entretanto a participação efetiva da área A5, bem como os neurotransmissores envolvidos na modulação das respostas barorreflexas permanece por ser melhor caracterizado.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral:

O objetivo principal deste estudo foi avaliar a neurotransmissão do componente simpato-excitatório do quimiorreflexo na área A5, bem como avaliar a participação desta área na regulação do componente cardíaco do barorreflexo, em ratos não-anestesiados.

4.2 Objetivos específicos:

- Avaliar o efeito do bloqueio dos receptores de aminoácidos excitatórios ionotrópicos da área A5 sobre as respostas cardiovasculares induzidas pela estimulação do quimiorreflexo.
- Avaliar o efeito do bloqueio dos receptores de aminoácidos excitatórios metabotrópicos da área A5 sobre as respostas cardiovasculares induzidas pela estimulação do quimiorreflexo.
- Avaliar o efeito do bloqueio dos receptores gabaérgicos da área A5 sobre as respostas cardiovasculares induzidas pela estimulação do quimiorreflexo.
- Avaliar o efeito do bloqueio da atividade dos neurônios da área A5 sobre as respostas cardiovasculares induzidas pela estimulação do barorreflexo.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Animais

Neste trabalho foram utilizados ratos Wistar, com peso entre 260 a 300 gramas, fornecidos pelo Centro de Bioterismo (CEBIO) do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. Os animais foram mantidos em ambiente adequado com temperatura e luminosidade controladas, alimentados com ração e água à vontade.

5.2 Implante de cânulas-guia dirigidas para a área A5

Através de um aparelho estereotáxico para animais de pequeno porte (Stoelting Co.) cânulas-guia foram implantadas em direção a região da área A5. As cânulas-guia (15mm) foram confeccionadas à partir de agulhas hipodérmicas de aço inoxidável (25 x 7mm), e fixadas no suporte da torre do aparelho estereotáxico. O animal foi anestesiado com tribromoetanol (250mg/Kg - Aldrich Chemical Company, Inc.), submetido à tricotomia da região dorsal da cabeça, posicionado no aparelho estereotáxico e por meio de duas barras auriculares a cabeça foi colocada em posição fixa. Após a assepsia da pele com solução de álcool iodado, o anestésico local xilocaína contendo vasoconstritor foi injetado subcutaneamente na região do escalpo a ser aberta, a fim de se evitar sangramento. A seguir, foi realizada uma incisão longitudinal na pele e tecido subcutâneo expondo-se a região da calota craniana. A torre do estereotáxico foi colocada em posição vertical (angulação zero) e a cabeça do animal ajustada até que os pontos bregma e lâmbda da calota craniana ficassem nivelados. A partir do bregma foram realizadas as leituras dos parâmetros ântero-posterior, latero-lateral e dorso-ventral. O ponto de introdução das cânulas-guia direcionadas para a área A5, foram determinados à partir das coordenadas estereotáxicas obtidas com o atlas de Paxinos e Watson (1986). As coordenadas estereotáxicas utilizadas neste trabalho foram: ântero-posterior = -9,8mm; latero-lateral = -2,2mm; dorso-ventral = -6,5mm. Determinado o ponto de introdução das

cânulas-guia, foi realizada a trepanação da calota craniana com o auxílio de uma broca odontológica esférica acoplada a um motor de baixa rotação. Por esse orifício foram introduzidas as cânulas, sendo que as extremidades inferiores destas ficaram 3,6mm acima da área A5. As cânulas-guia foram então fixadas ao crânio do animal através de resina acrílica de uso odontológico e de pequenos parafusos de aço inox, colocados na calota craniana previamente às leituras das coordenadas estereotáxicas. Após a completa fixação das cânulas-guia, a torre do estereotáxico foi removida e com o objetivo de se evitar a obstrução das cânulas foi introduzido nas mesmas um mandril de aço inoxidável (15mm). Como medida profilática, após a cirurgia estereotáxica todos os animais receberam 0,2ml de pentabiótico veterinário por via intramuscular. Esses animais foram mantidos em caixas coletivas, em salas com temperatura e luminosidade controladas por um período de 3 a 4 dias.

5.3 Técnica para microinjeção de drogas na área A5

As drogas utilizadas foram dissolvidas em solução salina fisiológica (NaCl 0,9%) e quando necessário o pH foi ajustado com bicarbonato de sódio (pH 7.0 – 7.4). As drogas foram manualmente injetadas na área A5 utilizando-se uma seringa de 5µl Hamilton (Hamilton, Reno, NV), conectada por meio de um tubo de polietileno PE-10 à uma agulha injetora (33 gauge). A fim de que as microinjeções atingissem diretamente a área A5 o comprimento da agulha injetora foi 3,6mm mais longo que a cânula-guia. O volume microinjetado na área A5 foi sempre de 100nl e a duração da microinjeção de aproximadamente 5 segundos.

5.4 Canulação da artéria e veia femoral

Um dia antes dos experimentos foi realizada a canulação da artéria e veia femoral. As cânulas utilizadas foram confeccionadas à partir de um tubo de polietileno PE-10 (4cm para a artéria e 2cm para veia) soldado a outro tubo de polietileno PE-50

com o comprimento ajustado de acordo com o tamanho do animal (15 a 17cm). Antes de serem implantadas, as cânulas foram preenchidas com solução fisiológica e obstruídas na extremidade livre do PE-50 com pinos de metal. Nos animais sob anestesia pelo tribromoetanol (250mg/Kg), as cânulas foram introduzidas na aorta abdominal, através da artéria femoral, e na veia femoral. Nos protocolos de estimulação do barorreflexo através de infusão de drogas vasoativas, foram introduzidas cânulas nas duas veias femorais. Uma vez implantadas, com auxílio de um trocarte, as cânulas foram dirigidas subcutaneamente para a cintura escapular, onde foram exteriorizadas e fixadas com linha de sutura. A cânula arterial foi utilizada para registro direto da pressão arterial e da frequência cardíaca e a cânula venosa para administração sistêmica de drogas.

5.5 Registro da pressão arterial e da frequência cardíaca

Os registros da pressão arterial e da frequência cardíaca foram realizados no dia seguinte ao da canulação, em animais não-anestesiados e com livre movimentação. A cânula arterial, previamente heparinizada (1:20), foi conectada a um transdutor de pressão o qual foi acoplado a um sistema de aquisição de dados analógico-digital (Biopac Systems, Inc.). Foi utilizado o programa de computador Acqknowledge (Biopac Systems, Inc.), após prévia calibração do equipamento, para o registro da pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC). PAM e a FC foram calculadas pelo programa de computador a partir dos valores de PAP.

5.6 Estimulação dos quimiorreceptores periféricos

Para a estimulação dos quimiorreceptores periféricos foi utilizada solução de cianeto de potássio (KCN 40µg/0,1ml/rato), a qual foi injetada através da cânula

venosa previamente implantada. O cianeto é descrito na literatura como um potente estímulo para os quimiorreceptores periféricos (Biscoe e Duchon, 1990; Gonzáles e cols., 1994; Franchini e Krieger, 1993), atuando por inibição da enzima citocromo-oxidase, a qual está envolvida na cadeia respiratória, impedindo a redução do oxigênio, e portanto a sua utilização pela célula. Como consequência ocorre um déficit energético celular associado à indisponibilidade de oxigênio, promovendo uma hipóxia citotóxica, a qual é detectada pelas células quimiossensíveis do corpúsculo carotídeo, ativando o quimiorreflexo. As respostas cardiovasculares e respiratórias observadas são dependentes da ativação das células do corpúsculo carotídeo uma vez que a ligadura da artéria que irriga o corpúsculo carotídeo abole essas respostas (Franchini e Krieger, 1993; Haibara e cols., 1995).

5.7 Estimulação dos barorreceptores arteriais

Para a estimulação dos barorreceptores arteriais foram realizadas injeções em bôlus (0,1ml) ou infusões (1,2ml/min, durante 15 segundos) intravenosas (i.v.) de soluções de fenilefrina (5µg/ml) e nitroprussiato de sódio (NPS, 10µg/ml) através de seringa 1ml conectada ao cateter venoso. A fenilefrina é um agonista α_1 -adrenérgico, o qual promove vasoconstrição periférica, elevação da pressão arterial, estimulação dos barorreceptores e consequente bradicardia barorreflexa. Entretanto o NPS é uma droga capaz de elevar os níveis de óxido nítrico resultando assim em vasodilatação periférica, redução da pressão arterial, desativação dos barorreceptores e consequente taquicardia barorreflexa. A sensibilidade do barorreflexo foi avaliada pela razão entre as alterações reflexas de FC, convertidas em intervalo de pulso ($IP = 60.000/FC$), induzidas por alterações transitórias da PAM ($\Delta IP/\Delta PAM$, ms/mmHg), denominado índice de sensibilidade barorreflexa (Campagnole-Santos e cols., 1988).

5.8 Drogas utilizadas

Microinjetadas na área A5

- (+/-)-ácido-1-aminociclopentano-trans-1,3-dicarboxílico, ACPD (*agonista glutamatérgico metabotrópico - Tocris, Ballwin, MO*);
- Ácido kinurênico, KIN (*antagonista glutamatérgico ionotrópico - Sigma Chemical, St. Louis, MO*);
- α -metil-4-carboxifenilglicina, MCPG (*antagonista glutamatérgico metabotrópico - Sigma Chemical, St. Louis, MO*);
- Bicuculina, BIC (*antagonista de receptores gabaérgicos - Sigma Chemical, St. Louis, MO*);
- L-glutamato, L-Glu (*aminoácido excitatório - Sigma Chemical, St. Louis, MO*);
- Lidocaína, (*anestésico local, Hipolabor Farmacêutica, Sabará, MG*);
- Muscimol, MUS (*agonista de receptores GABA-A - Sigma Chemical, St. Louis, MO*).

Estimulação dos reflexos cardiovasculares

- Cianeto de potássio, KCN (*inibidor da citocromo oxidase - Sigma, St. Louis, MO*);
- Fenilefrina, Fenil (*agonista α_1 -adrenérgico - Sigma Chemical, St. Louis, MO*);
- Nitroprussiato de sódio, NPS (*doador de óxido nítrico - Sigma Chemical, St. Louis, MO*).

5.9 Histologia

Ao final dos experimentos foram realizadas microinjeções do corante Alcian Blue (100nl) na área A5, a fim de se determinar os sítios específicos das microinjeções. A seguir, os animais foram anestesiados (Tiopental, 40mg/Kg, i.p.) e submetidos à abertura da região torácica para exposição do coração, através do qual foi feita a perfusão com solução de formol 10%. Para facilitar a perfusão cerebral, a aorta descendente foi bloqueada com pinça hemostática e a cava superior seccionada. O cérebro foi removido e mantido em solução de sacarose (20%) por 48 horas. Após esse período, secções transversais do tronco cerebral foram feitas em

micrótomo de congelamento em fatias de 50 μ m de espessura. Os cortes foram corados pelo vermelho neutro 1% utilizando-se a técnica de Nissl, e analisados por microscopia óptica. Somente os animais com confirmação histológica dos sítios de microinjeção na área A5 foram considerados neste estudo.

5.10 Análise estatística dos resultados

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média ($x \pm \text{epm}$). Na análise estatística dos resultados dentro de cada grupo experimental foi aplicado o teste-*t* pareado ou teste-*t* não pareado. Para a comparação entre grupos foi utilizada a análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de Newman-Keuls. As alterações foram consideradas estatisticamente significativas com $p < 0,05$.

5.11 Protocolos Experimentais

5.11.1 Efeito da microinjeção bilateral do ácido kinurênico na área A5 sobre as respostas cardiovasculares induzidas pela estimulação do quimiorreflexo.

Como o objetivo de avaliar a participação dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos da área A5 na integração das respostas cardiovasculares induzidas pelo quimiorreflexo, o antagonista ácido kinurênico (KIN; 2,5nmol/100nl) foi microinjetado bilateralmente nessa região, e o quimiorreflexo estimulado antes e após esta microinjeção. Para isso, foram utilizados animais previamente submetidos ao implante bilateral de cânulas-guia em direção à área A5 e implante de cânulas na artéria e veia femorais. No dia do experimento, após um período de adaptação do animal frente às novas condições ambientais, o quimiorreflexo foi testado através de injeção intravenosa de KCN (40 μ g/0,1ml). Após o retorno da pressão arterial e da frequência cardíaca aos valores basais, o ácido kinurênico (2,5nmol/100nl) foi microinjetado

bilateralmente na área A5. Dez, trinta e sessenta minutos após a microinjeção na área A5, o quimiorreflexo foi novamente estimulado com KCN, e essas respostas foram comparadas com a primeira (antes da microinjeção na área A5). O registro dos parâmetros cardiovasculares foi realizado por aproximadamente 60 minutos após a microinjeção do ácido kinurênico, tempo necessário para se verificar a completa reversão dos efeitos deste antagonista (Colombari e cols., 1994). Com o objetivo de verificar a eficácia do KIN, na dose utilizada, no bloqueio dos receptores glutamatérgicos, em alguns animais o L-glutamato também foi microinjetado na área A5 antes e 10 minutos após o antagonista KIN.

5.11.2 Efeitos cardiovasculares induzidos pela microinjeção unilateral do agonista glutamatérgico metabotrópico ACPD na área A5.

Com o objetivo de avaliar as respostas cardiovasculares induzidas pela ativação dos receptores glutamatérgicos metabotrópicos da área A5, o agonista ACPD foi microinjetado nessa região. Para isso foram utilizados animais previamente submetidos ao implante de cânulas-guia em direção à área A5 e implante de cânula na artéria femoral. No dia do experimento, após um período de adaptação do animal frente às novas condições ambientais, foi microinjetado o veículo salina (NaCl 0,9%/100nl), L-glutamato (2,5nmol/100nl) e o agonista glutamatérgico metabotrópico ACPD (0,5, 1,0 e 2,5nmol/100nl) unilateralmente na área A5, e as alterações dos parâmetros cardiovasculares foram registrados.

Com o intuito de observar a especificidade das alterações cardiovasculares promovidas pela microinjeção do agonista glutamatérgico metabotrópico, a microinjeção deste agonista foi avaliada antes e dez minutos após a microinjeção

ipsilateral do antagonista glutamatérgico metabotrópico MCPG (2,5nmol/100nl) na área A5.

5.11.3 Efeito da microinjeção bilateral do MCPG na área A5 sobre as respostas cardiovasculares induzidas pela estimulação do quimiorreflexo.

Com o objetivo avaliar a participação dos receptores glutamatérgicos metabotrópicos da área A5 na integração das respostas cardiovasculares produzidas pela estimulação do quimiorreflexo, o antagonista glutamatérgico metabotrópico MCPG (2,5nmol/100nl) foi microinjetado bilateralmente nessa região, e o quimiorreflexo foi estimulado antes e após essa microinjeção. Para isso os animais foram previamente submetidos ao implante bilateral de cânulas-guia direcionadas à área A5 e implantes de cânulas na artéria e veia femorais. No dia do experimento, após um período de adaptação do animal frente às novas condições ambientais, o quimiorreflexo foi testado através de injeção intravenosa de KCN (40µg/0,1ml). Após o retorno da pressão arterial e da frequência cardíaca aos valores basais, o MCPG (2,5nmol/100nl) foi microinjetado bilateralmente na área A5. Dez, vinte e cinco, quarenta e sessenta minutos após a microinjeção na área A5, o quimiorreflexo foi novamente estimulado com KCN, e essas respostas foram comparadas com a primeira (antes da microinjeção na área A5). O registro dos parâmetros cardiovasculares foi realizado por aproximadamente 60 minutos após a microinjeção do MCPG, tempo necessário para se verificar a completa reversão dos efeitos deste antagonista (Haibara e cols., 1999).

5.11.4 Efeito da microinjeção bilateral de bicuculina na área A5 sobre as respostas cardiovasculares induzidas pela estimulação do quimiorreflexo.

Como o objetivo de avaliar a participação dos receptores gabaérgicos da área A5 na integração das respostas cardiovasculares induzidas pelo quimiorreflexo, o

antagonista gabaérgico bicuculina (10pmol/100nl) foi microinjetado bilateralmente nessa região, e o quimiorreflexo estimulado antes e após esta microinjeção. Para isso foram utilizados animais previamente submetidos ao implante bilateral de cânulas-guia em direção à área A5 e implante de cânulas na artéria e veia femorais. No dia do experimento, após um período de adaptação do animal frente às novas condições ambientais, o quimiorreflexo foi testado através de injeção intravenosa de KCN (40µg/0,1ml). Após o retorno da pressão arterial e da frequência cardíaca aos valores basais, a bicuculina (10nmol/100nl) foi microinjetada bilateralmente na área A5. Dez, vinte e cinco, quarenta e sessenta minutos após a microinjeção na área A5, o quimiorreflexo foi novamente estimulado com KCN, e as respostas foram comparadas com a primeira (antes da microinjeção na área A5). O registro dos parâmetros cardiovasculares foi realizado por aproximadamente 60 minutos após a microinjeção da bicuculina, tempo necessário para se verificar a completa reversão dos efeitos deste antagonista.

5.11.5 Efeito da microinjeção bilateral de muscimol na área A5 sobre as respostas cardiovasculares induzidas pela estimulação do barorreflexo.

Como o objetivo de avaliar a participação dos neurônios da área A5 na integração das respostas cardíacas induzidas pelo barorreflexo, o agonista gabaérgico muscimol, nas doses de 250pmol/100nl e 1,0nmol/100nl, foi microinjetado bilateralmente nessa região, e o barorreflexo estimulado (por fenilefrina e nitroprussiato de sódio) antes e após esta microinjeção. Para isso foram utilizados animais previamente submetidos ao implante bilateral de cânulas-guia em direção à área A5 e implante de cânulas na artéria e veias femorais. No dia do experimento, após um período de adaptação do animal frente às novas condições ambientais, o

barorreflexo foi testado por injeção em bôlus (0,1ml) ou infusão (1,2ml/min, durante 15 segundos) intravenosa de fenilefrina (Fenil, 5µg/ml) e nitroprussiato de sódio (NPS, 10µg/ml). Após o retorno da pressão arterial e frequência cardíaca aos valores basais, o muscimol (250 pmol e 1,0nmol/100nl) foi microinjetado bilateralmente na área A5. Dez e vinte e cinco minutos após a microinjeção do agonista na área A5, o barorreflexo foi novamente estimulado com fenilefrina e NPS, e essas respostas foram comparadas com as primeiras (antes da microinjeção na área A5). O registro dos parâmetros cardiovasculares foi realizado por aproximadamente 30 minutos após a microinjeção do muscimol, tempo necessário para se verificar a completa reversão dos efeitos deste agonista (Ramos, 2002).

5.11.6 Efeito da microinjeção bilateral de lidocaína na área A5 sobre as respostas cardiovasculares induzidas pela estimulação do barorreflexo.

Como o objetivo de avaliar a participação da área A5 na integração das respostas cardíacas induzidas pelo barorreflexo, o anestésico local lidocaína (2%/100nl) foi microinjetado bilateralmente nessa região. Para isso foram utilizados animais previamente submetidos ao implante bilateral de cânulas-guia em direção à área A5 e implante de cânulas na artéria e veias femorais. No dia do experimento, após um período de adaptação do animal frente às novas condições ambientais, o barorreflexo foi testado por injeção intravenosa em bôlus de fenilefrina (Fenil; 5µg/0,1ml) e nitroprussiato de sódio (NPS; 10µg/0,1ml). Após o retorno da pressão arterial e frequência cardíaca aos valores basais, a lidocaína foi microinjetada bilateralmente na área A5. Dois, cinco, dez, vinte e trinta minutos após a microinjeção do anestésico na área A5, o barorreflexo foi novamente estimulado com fenilefrina e NPS, e essas respostas foram comparadas com a primeira (antes da microinjeção na

área A5). O registro dos parâmetros cardiovasculares foi realizado por aproximadamente 30 minutos após a microinjeção da lidocaína, tempo necessário para se verificar a completa reversão dos efeitos deste anestésico (Haibara e cols, 2002).

6. RESULTADOS

6.1 Efeito da microinjeção bilateral do ácido kinurênico na área A5 sobre as respostas cardiovasculares induzidas pela estimulação do quimiorreflexo.

Com o objetivo de avaliar a participação dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos da área A5 na integração das respostas cardiovasculares induzidas pelo quimiorreflexo, o antagonista ácido kinurênico (KIN; 2,5nmol/100nl) foi microinjetado bilateralmente nessa região, e o quimiorreflexo estimulado (KCN 40µg/0,1ml) antes e após esta microinjeção.

A figura 01 corresponde a um traçado representativo de um animal do grupo estudado, mostrando as alterações da pressão arterial pulsátil (PAP, mmHg), pressão arterial média (PAM, mmHg) e frequência cardíaca (FC, bpm) em resposta a estimulação do quimiorreflexo antes e após a microinjeção bilateral do ácido kinurênico na área A5. Podemos observar que, como descrito em estudos anteriores (Franchini e Krieger, 1993), a estimulação dos quimiorreceptores periféricos com KCN promoveu resposta pressora e bradicárdica. Dez, trinta e sessenta minutos após a microinjeção do ácido kinurênico na área A5 a magnitude dessas respostas cardiovasculares não foi diferente do período controle.

A figura 02 representa os dados obtidos nesse grupo, mostrando que a microinjeção bilateral na área A5 do antagonista glutamatérgico ionotrópico ácido kinurênico, não promoveu alterações significativas sobre a resposta pressora (+45±4 vs. +41±3; +45±5; +44±5 mmHg) e bradicárdica (-212±21 vs. -202±23; -216±19; -240±13 bpm) do quimiorreflexo (tabela 01).

A dose utilizada do ácido kinurênico (2,5 nmol/100nl) foi eficaz em bloquear os receptores glutamatérgicos, uma vez que a resposta pressora (+22±3 mmHg) e a taquicardia (+25±14 bpm) induzida pela microinjeção ipsilateral do agonista L-glutamato na área A5 foram reduzidas em aproximadamente 70 e 80%,

respectivamente, após a microinjeção do ácido kinurênico ($+6\pm 2$ mmHg, $+3\pm 6$ bpm) (figura 03, tabela 02).

Em relação aos parâmetros cardiovasculares basais (figura 04), a microinjeção bilateral de ácido kinurênico não alterou significativamente os valores da pressão arterial média (113 ± 3 vs. 115 ± 3 mmHg), bem como os valores de frequência cardíaca (394 ± 18 vs. 411 ± 20 bpm), quando comparados com o período controle, anterior à microinjeção (tabela 03).

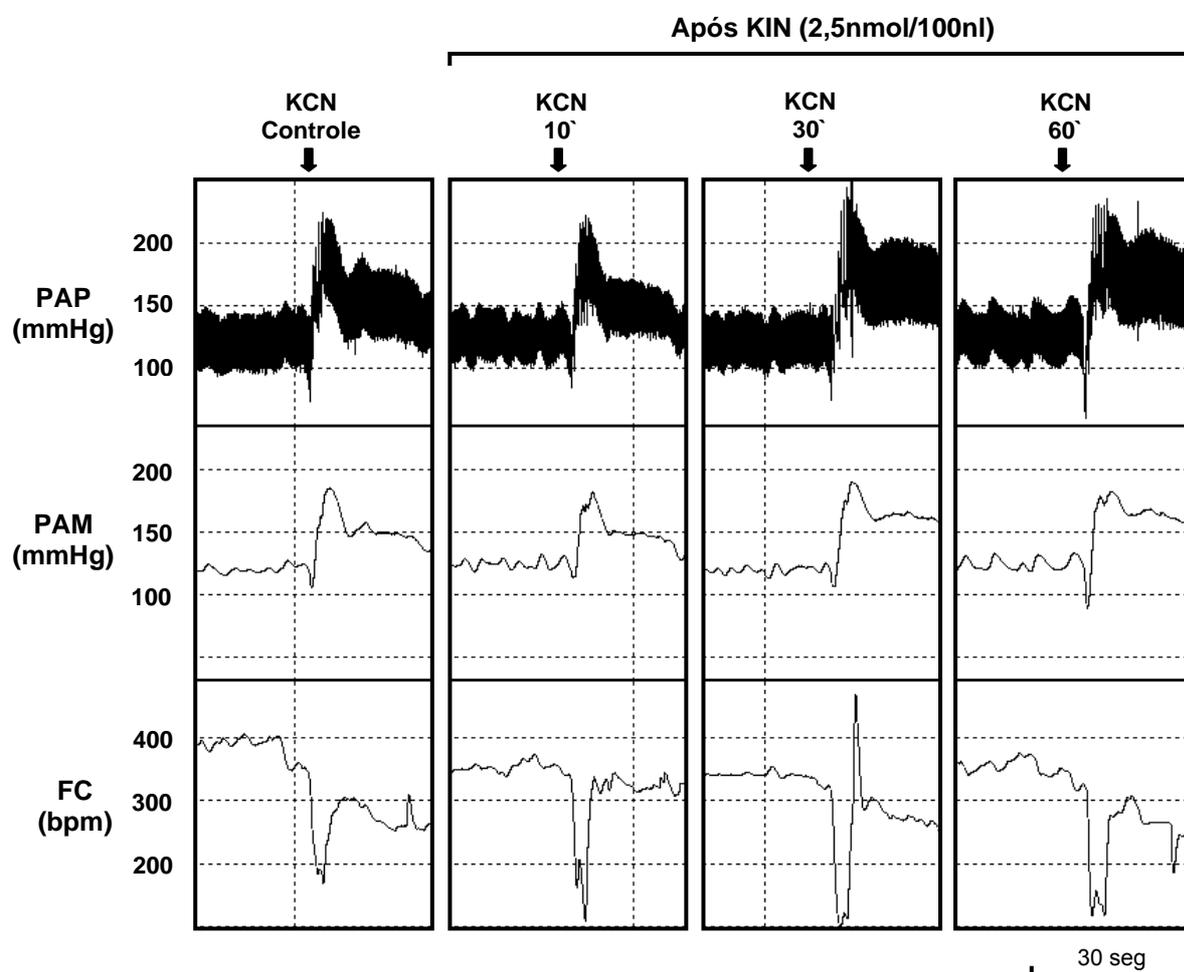


Figura 01 - Traçado de um rato, representativo do grupo estudado, mostrando as alterações na pressão arterial pulsátil (PAP, mmHg), pressão arterial média (PAM, mmHg) e frequência cardíaca (FC, bpm) em resposta à estimulação do quimiorreflexo com KCN (40µg/0,1ml, i.v.), antes (controle) e após (10, 30 e 60 minutos) à microinjeção bilateral de ácido kinurênico (KIN 2,5nmol/100nl) na área A5.

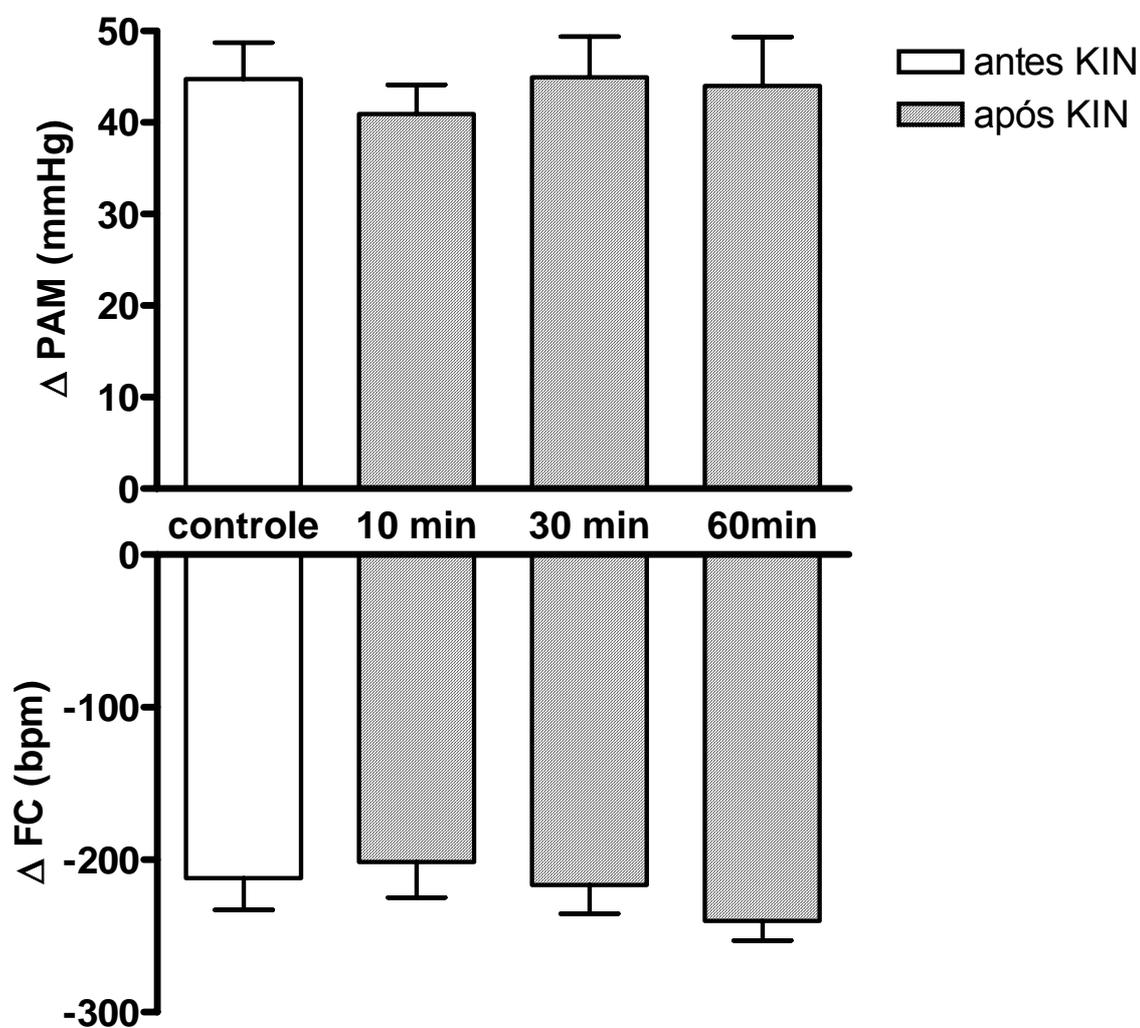


Figura 02 - Alterações na pressão arterial média (Δ PAM, mmHg) e frequência cardíaca (Δ FC, bpm), produzidas pela injeção i.v. de KCN (40 μ g/0,1ml) antes (controle) e após (10, 30 e 60 minutos) à microinjeção bilateral de ácido kinurênico (KIN 2,5 nmol/100 nl) na área A5 de ratos não anestesiados (n=13).

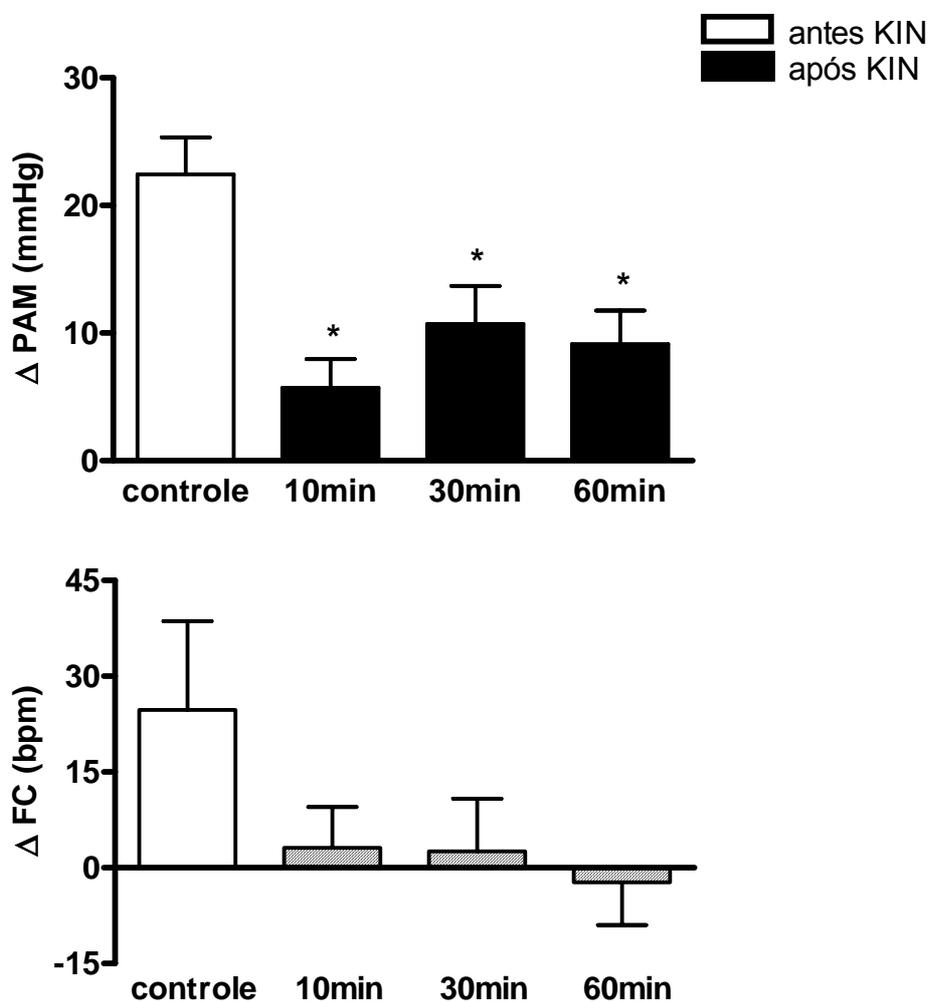


Figura 03 - Alterações na pressão arterial média (Δ PAM, mmHg) e frequência cardíaca (Δ FC, bpm), produzidas pela microinjeção de L-glutamato (2,5nmol/100nl) antes (controle) e após (10, 30 e 60 minutos) à microinjeção de ácido kinurênico (KIN, 2,5nmol/100nl) na área A5 de ratos não anestesiados (n=07). (*) Diferença significativa em relação ao período controle (Teste-*t* pareado; $p < 0,05$).

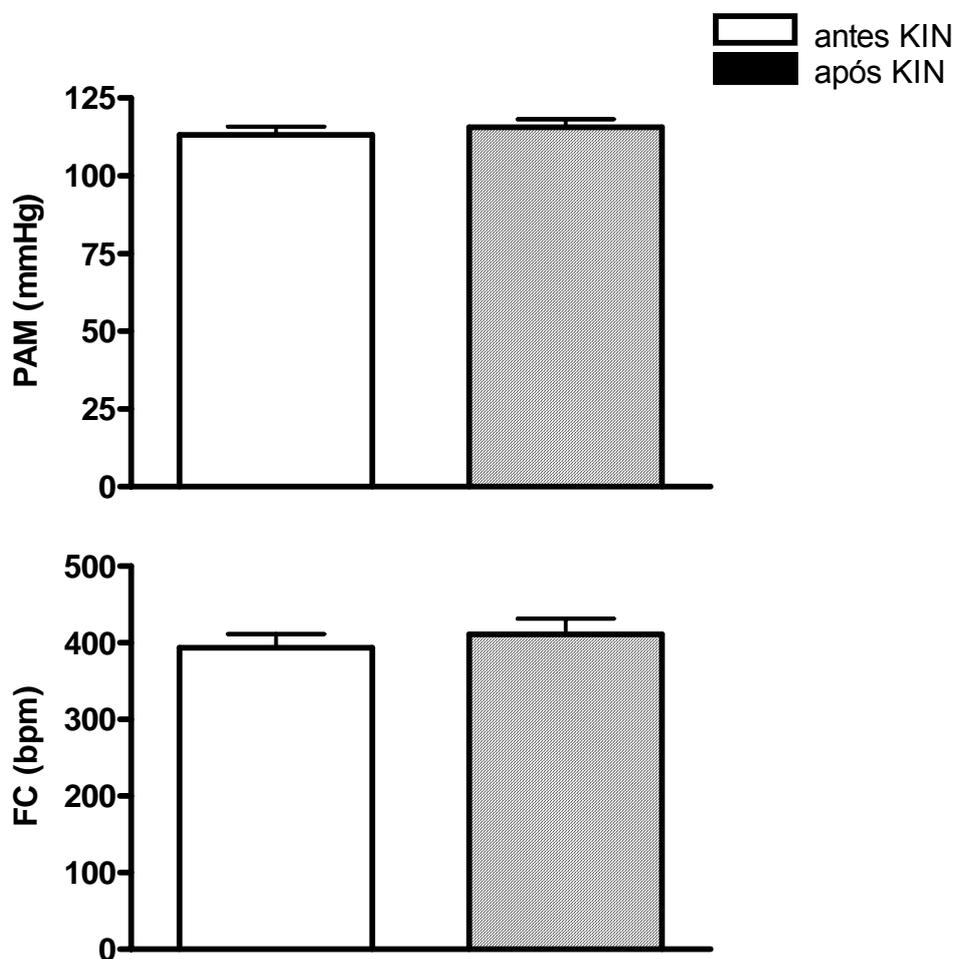


Figura 04 - Valores basais de pressão arterial média (PAM, mmHg) e frequência cardíaca (FC, bpm), antes e após microinjeção bilateral de ácido kinurênico (KIN, 2,5nmol/100nl) na área A5 de ratos não anestesiados (n=13).

6.2 Efeitos cardiovasculares induzidos pela microinjeção unilateral do agonista glutamatérgico metabotrópico ACPD na área A5.

Com o objetivo de avaliar as respostas cardiovasculares induzidas pela ativação dos receptores glutamatérgicos metabotrópicos da área A5, o agonista ACPD foi microinjetado nessa região.

A figura 05 corresponde a um traçado representativo de um dos animais dos grupos estudados mostrando as alterações cardiovasculares induzidas pela microinjeção unilateral na área A5 do veículo salina (NaCl; 0,9%/100nl), L-glutamato (2,5nmol/100nl) e ACPD em duas doses (0,5 e 1,0nmol/100nl). A figura 06 corresponde a outro traçado representativo de outro animal dos grupos estudados mostrando as alterações cardiovasculares promovidas pela microinjeção do agonista ACPD na dose de 2,5nmol/100nl, antes e após a microinjeção ipsilateral do antagonista glutamatérgico metabotrópico MCPG (2,5nmol/100nl) na área A5.

Os dados referentes a estes grupos estão agrupados nas figuras 07 e 08. A figura 07 mostra que a microinjeção unilateral do agonista glutamatérgico metabotrópico ACPD, na dose de 2,5nmol/100nl, promoveu respostas pressora ($+6\pm 1$ vs. $+16\pm 3$ mmHg) e taquicárdica ($+7\pm 2$ vs. $+58\pm 15$ bpm) significativas quando comparadas às alterações promovidas pela microinjeção do veículo salina (controle) (tabela 04). Ao passo que o agonista ACPD quando microinjetado nas doses 0,5 e 1,0nmol/100nl não promoveu alterações significativas dos parâmetros cardiovasculares de pressão arterial ($+6\pm 1$ vs. $+7\pm 1$ e 6 ± 1 mmHg) e frequência cardíaca ($+7\pm 2$ vs. $+15\pm 6$ e $+9\pm 4$ bpm) quando comparadas ao controle (veículo salina) (tabela 04). O L-glutamato foi utilizado como índice funcional de estimulação dos neurônios da área A5. Como esperado, a microinjeção de L-glutamato promoveu

aumento da pressão arterial ($+16\pm 3$ mmHg) e taquicardia ($+24\pm 7$ bpm) em relação ao grupo salina (tabela 04).

A figura 08 mostra que a microinjeção ipsilateral do antagonista glutamatérgico metabotrópico MCPG ($2,5\text{nmol}/100\text{nl}$) na área A5 promoveu redução significativa da resposta pressora ($+16\pm 3$ vs. $+7\pm 0,4$ mmHg) e taquicárdica ($+58\pm 15$ vs. $+31\pm 13$ bpm) induzida pela microinjeção unilateral do agonista ACPD ($2,5\text{nmol}/100\text{nl}$) (tabela 05).

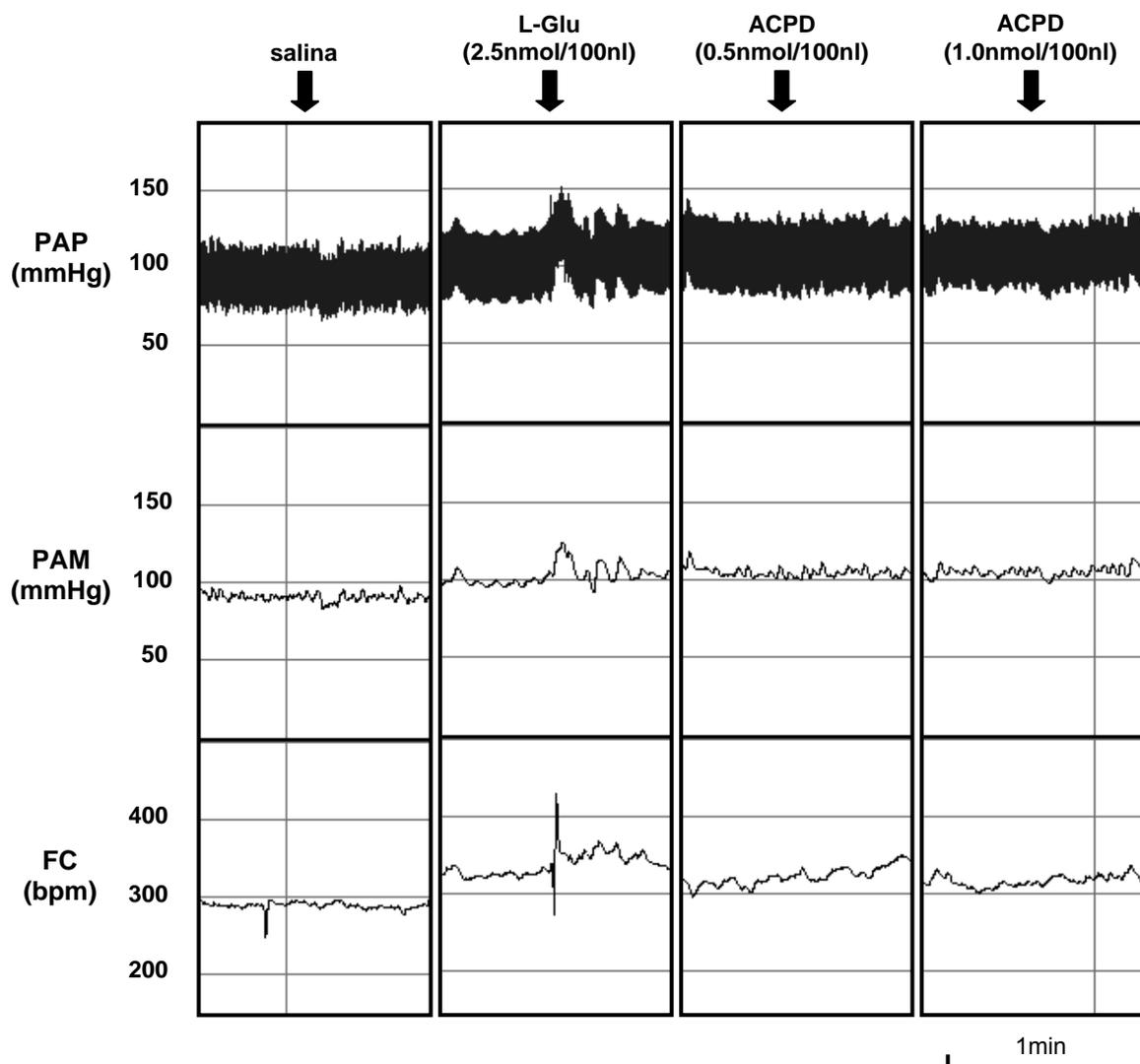


Figura 05 - Traçado de um rato, representativo do grupo estudado, mostrando as alterações na pressão arterial pulsátil (PAP, mmHg), pressão arterial média (PAM, mmHg) e frequência cardíaca (FC, bpm) em resposta à microinjeção unilateral na área A5 de salina (NaCl 0,9%/100nl), L-glutamato (L-Glu, 2,5nmol/100nl) e ACPD (0,5 e 1,0nmol/100nl).

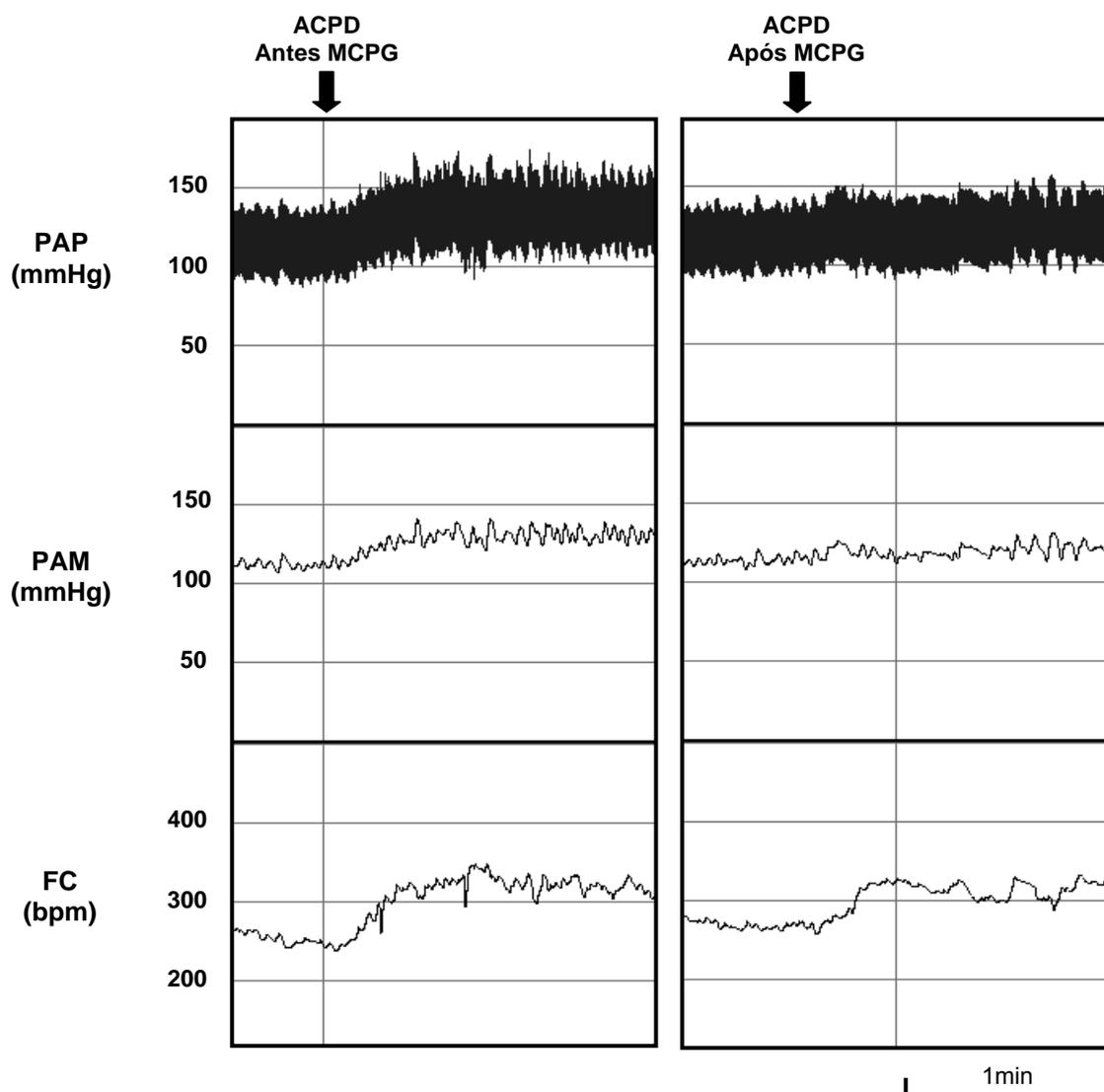


Figura 06 - Traçado de um rato, representativo do grupo estudado, mostrando as alterações na pressão arterial pulsátil (PAP, mmHg), pressão arterial média (PAM, mmHg) e frequência cardíaca (FC, bpm) em resposta à microinjeção unilateral na área A5 de ACPD (2,5nmol/100nl), antes e após a microinjeção ipsilateral do antagonista MCPG (2,5nmol/100nl).

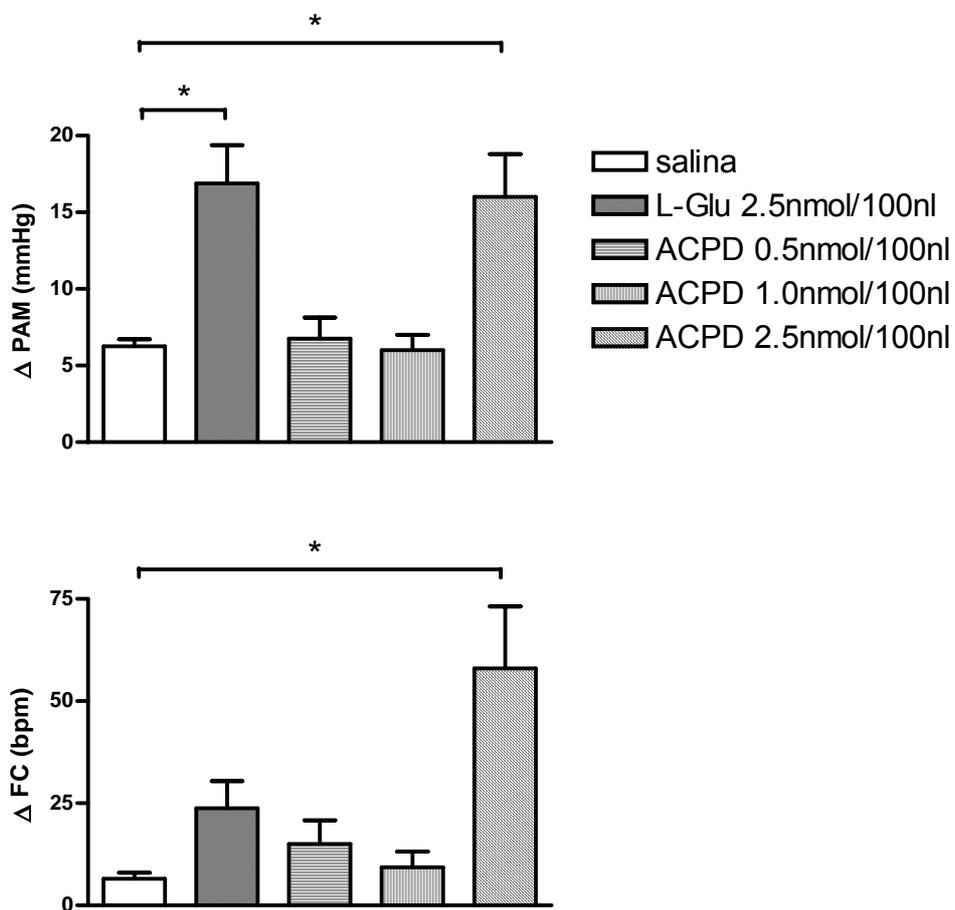


Figura 07 - Alterações na pressão arterial média (Δ PAM, mmHg) e frequência cardíaca (Δ FC, bpm) induzidas pela microinjeção unilateral de salina (NaCl 0,9%/100nl), L-glutamato (L-Glu, 2,5nmol/100nl) e ACPD (0,5; 1,0 e 2,5nmol/100nl) (n=04). (*) Diferença significativa em relação ao grupo salina (Teste-*t* não pareado, $p < 0,05$).

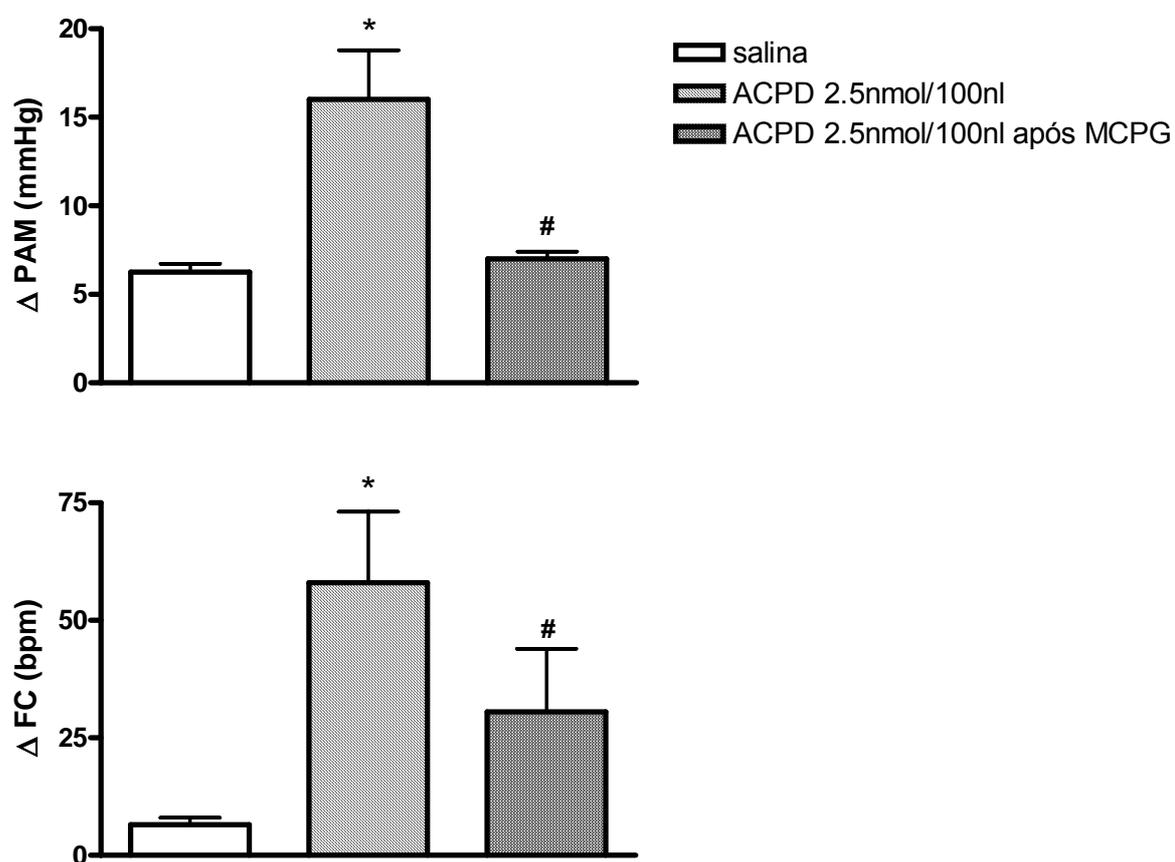


Figura 08 - Alterações na pressão arterial média (Δ PAM, mmHg) e frequência cardíaca (Δ FC, bpm) induzidas pela microinjeção unilateral de salina (NaCl 0,9%/100nl; n=04), e ACPD (2,5nmol/100nl; n=04) antes e após a microinjeção ipsilateral do antagonista glutamatérgico metabotrópico MCPG (2,5nmol/100nl; n=04). (*) Diferença significativa em relação ao grupo salina (Teste-t não pareado, $p < 0,05$). (#) Diferença significativa em relação ao período antes do MCPG (Teste-t pareado, $p < 0,05$).

6.3 Efeito da microinjeção bilateral do MCPG na área A5 sobre as respostas cardiovasculares induzidas pela estimulação do quimiorreflexo.

Com o objetivo avaliar a participação dos receptores glutamatérgicos metabotrópicos da área A5 na integração das respostas cardiovasculares produzidas pela estimulação do quimiorreflexo, o antagonista glutamatérgico metabotrópico MCPG (2,5nmol/100nl) foi microinjetado bilateralmente nessa região, e o quimiorreflexo estimulado (KCN 40µg/0,1ml) antes e após esta microinjeção.

A figura 09 corresponde a um traçado representativo de um animal do grupo estudado mostrando as respostas cardiovasculares induzidas pela estimulação do quimiorreflexo antes e após a microinjeção bilateral do antagonista MCPG na área A5. Podemos observar que a estimulação dos quimiorreceptores periféricos com KCN promoveu resposta pressora e bradicárdica. A microinjeção de MCPG não modificou as respostas cardiovasculares do quimiorreflexo.

A figura 10 representa os dados obtidos nesse grupo, mostrando que a microinjeção bilateral na área A5 do antagonista glutamatérgico metabotrópico MCPG, não promoveu alterações significativas sobre a resposta pressora (+42±4 vs. +38±4; +45±5; +44±6; +38±3 mmHg) e bradicárdica (-199±11 vs. -245±16; -238±7; -226±15; -240±11 bpm) do quimiorreflexo (tabela 06).

Em relação aos parâmetros cardiovasculares basais (figura 11), a microinjeção bilateral de MCPG não alterou significativamente os valores da pressão arterial média (120±3 vs. 122±3 mmHg), bem como não alterou os valores de frequência cardíaca (364±5 vs. 379±13 bpm), quando comparados com o período controle, anterior à microinjeção do antagonista (tabela 07).

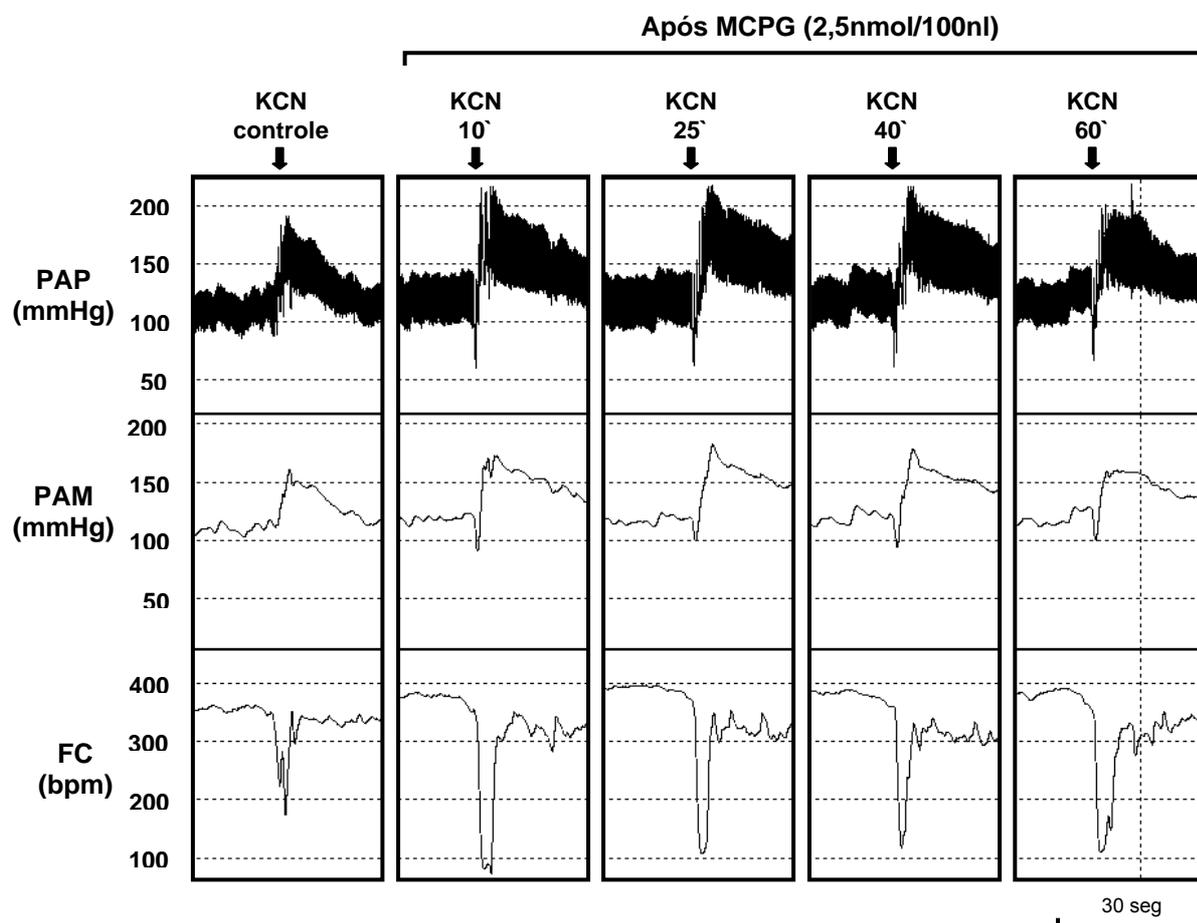


Figura 09 - Traçado de um rato, representativo do grupo estudado, mostrando as alterações na pressão arterial pulsátil (PAP, mmHg), pressão arterial média (PAM, mmHg) e frequência cardíaca (FC, bpm) em resposta à estimulação do quimiorreflexo com KCN (40µg/0,1ml, i.v.), antes (controle) e após (10, 25, 40 e 60 minutos) à microinjeção bilateral do MCPG (2,5nmol/100nl) na área A5.

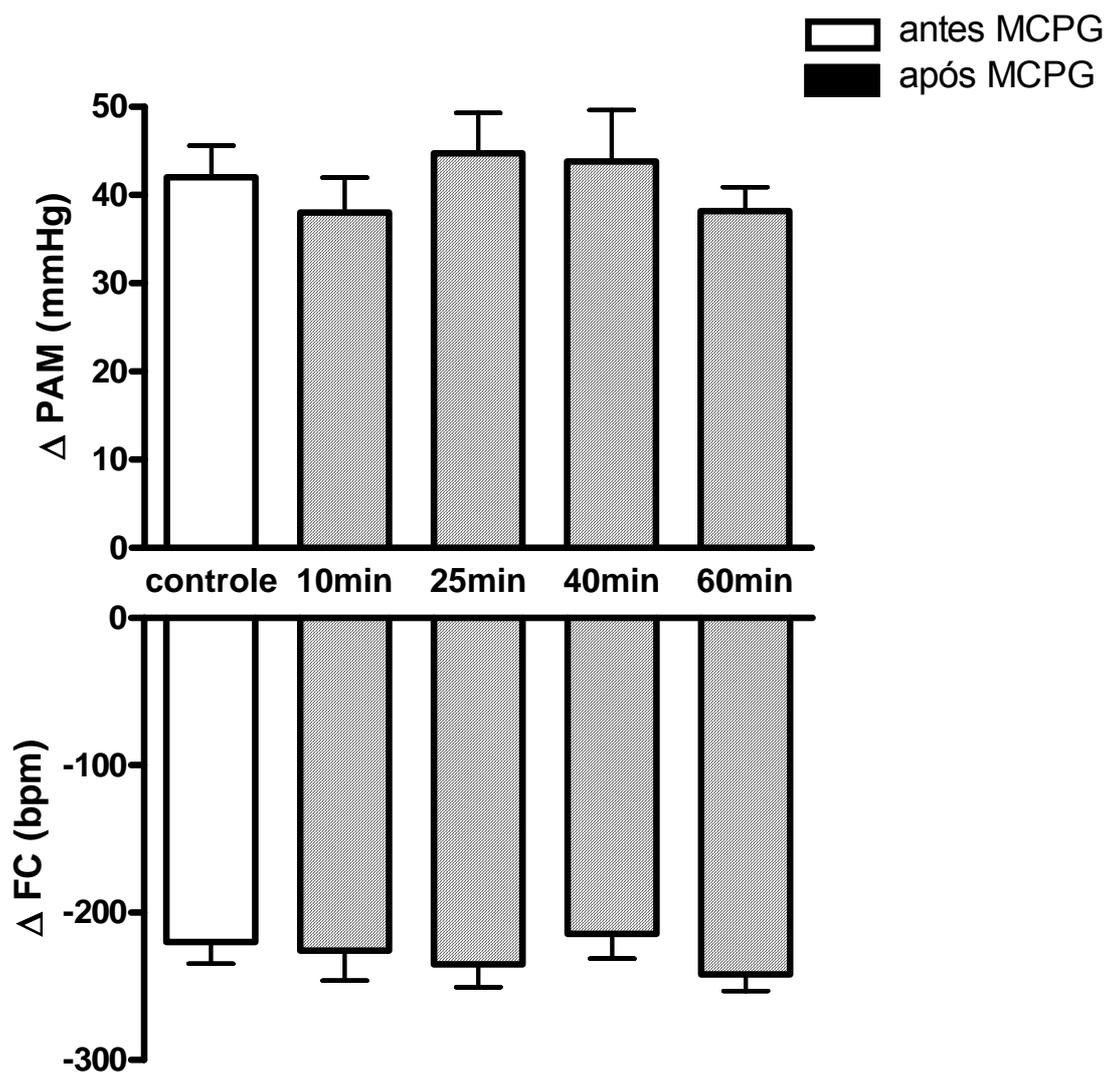


Figura 10 - Alterações na pressão arterial média (Δ PAM, mmHg) e frequência cardíaca (Δ FC, bpm), produzidas pela injeção i.v. de KCN (40 μ g/0,1ml) antes (controle) e após (10, 25, 40 e 60 minutos) à microinjeção bilateral do MCPG (2,5nmol/100nl) na área A5 de ratos não anestesiados (n=07).

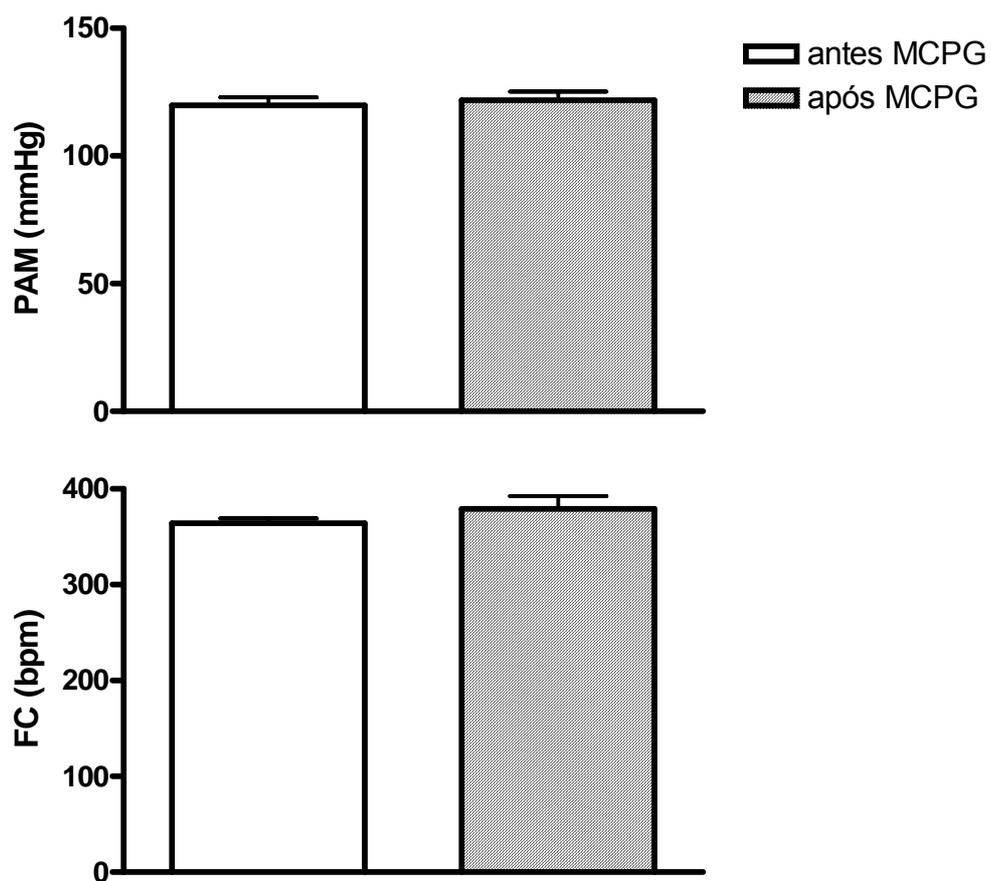


Figura 11 - Valores basais de pressão arterial média (PAM, mmHg) e frequência cardíaca (FC, bpm), antes e após microinjeção bilateral de MCPG (2,5nmol/100nl) na área A5 de ratos não anestesiados (n=07).

6.4 Efeito da microinjeção bilateral de bicuculina na área A5 sobre as respostas cardiovasculares induzidas pela estimulação do quimiorreflexo.

Com o objetivo de avaliar a participação dos receptores gabaérgicos da área A5 na integração das respostas cardiovasculares induzidas pelo quimiorreflexo, o antagonista gabaérgico bicuculina (10pmol/100nl) foi microinjetado bilateralmente nessa região, e o quimiorreflexo estimulado (KCN 40µg/0,1ml) antes e após esta microinjeção.

A figura 12 corresponde a um traçado representativo de um animal do grupo estudado, mostrando a resposta quimiorreflexa antes (controle) e após (10, 25 e 40 minutos) da microinjeção bilateral do antagonista bicuculina na área A5. A microinjeção de bicuculina não promoveu alterações das respostas pressora e bradicárdica do quimiorreflexo.

A figura 13 representa o conjunto desses resultados, e mostra que não houve alterações significativas entre a magnitude da resposta pressora do quimiorreflexo observada no período controle ($+38\pm 5$ mmHg) e as obtidas nos tempos dez minutos ($+43\pm 5$ mmHg), vinte e cinco minutos ($+39\pm 4$ mmHg), quarenta minutos ($+38\pm 5$ mmHg) e sessenta minutos ($+36\pm 4$ mmHg), após a microinjeção de bicuculina (tabela 08). Da mesma forma, a resposta bradicárdica do quimiorreflexo (-203 ± 35 bpm) não foi alterada pela bicuculina em nenhum dos tempos analisados (-184 ± 32 ; -207 ± 29 ; -220 ± 32 e -220 ± 25 bpm, respectivamente) (tabela 07).

Em relação aos parâmetros cardiovasculares basais (figura 14), a microinjeção bilateral de bicuculina não alterou significativamente os valores de pressão arterial média (113 ± 4 vs. 116 ± 4 mmHg), bem como não alterou os valores de frequência cardíaca (357 ± 12 vs. 361 ± 12 bpm), quando comparados com o período controle (tabela 09).

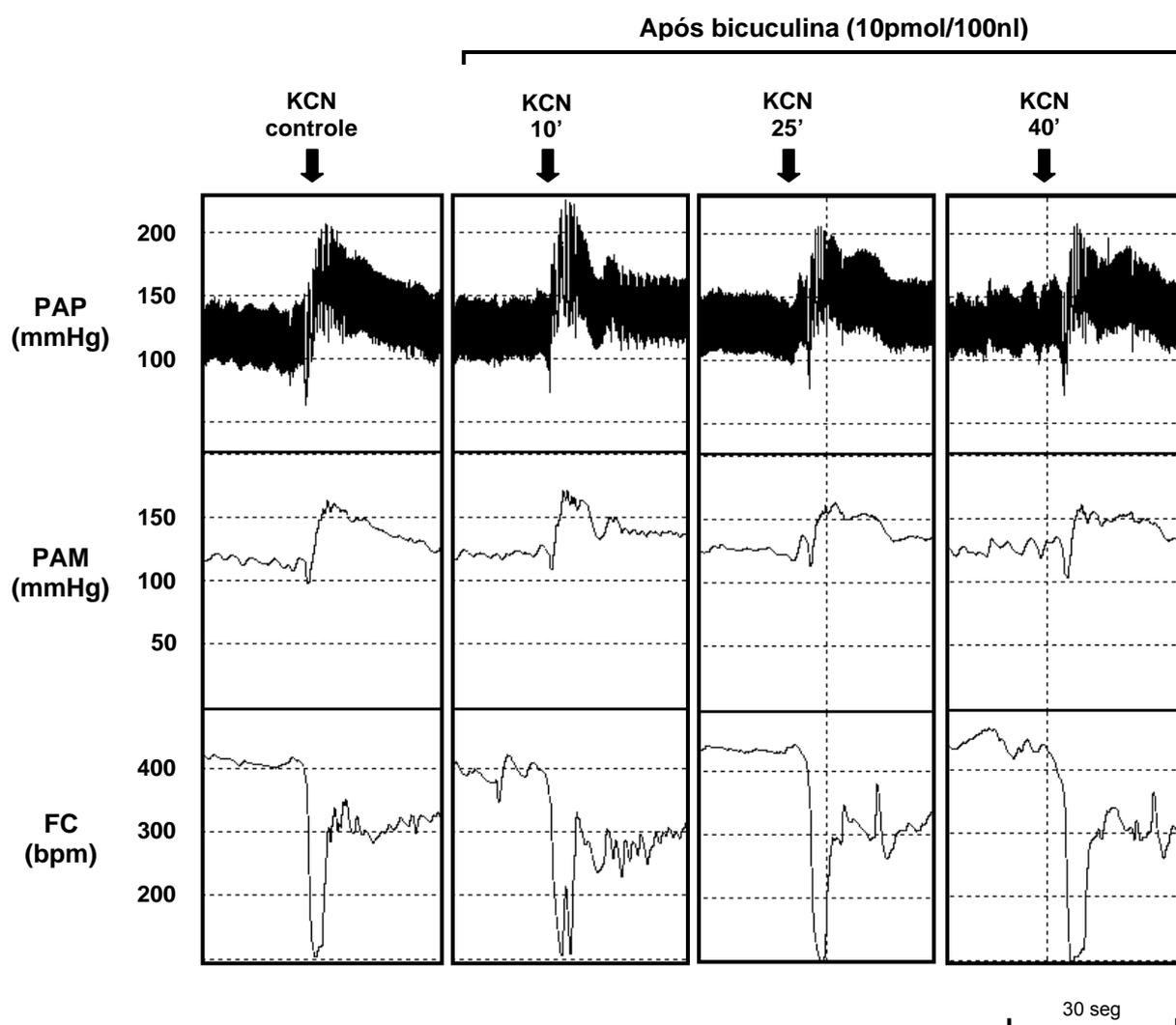


Figura 12 - Traçado de um rato, representativo do grupo estudado, mostrando as alterações na pressão arterial pulsátil (PAP, mmHg), pressão arterial média (PAM, mmHg) e frequência cardíaca (FC, bpm) em resposta à estimulação do quimiorreflexo com KCN (40µg/0,1ml, i.v.), antes (controle) e após (10, 25 e 40 minutos) da microinjeção bilateral de bicuculina (10pmol/100nl) na área A5.

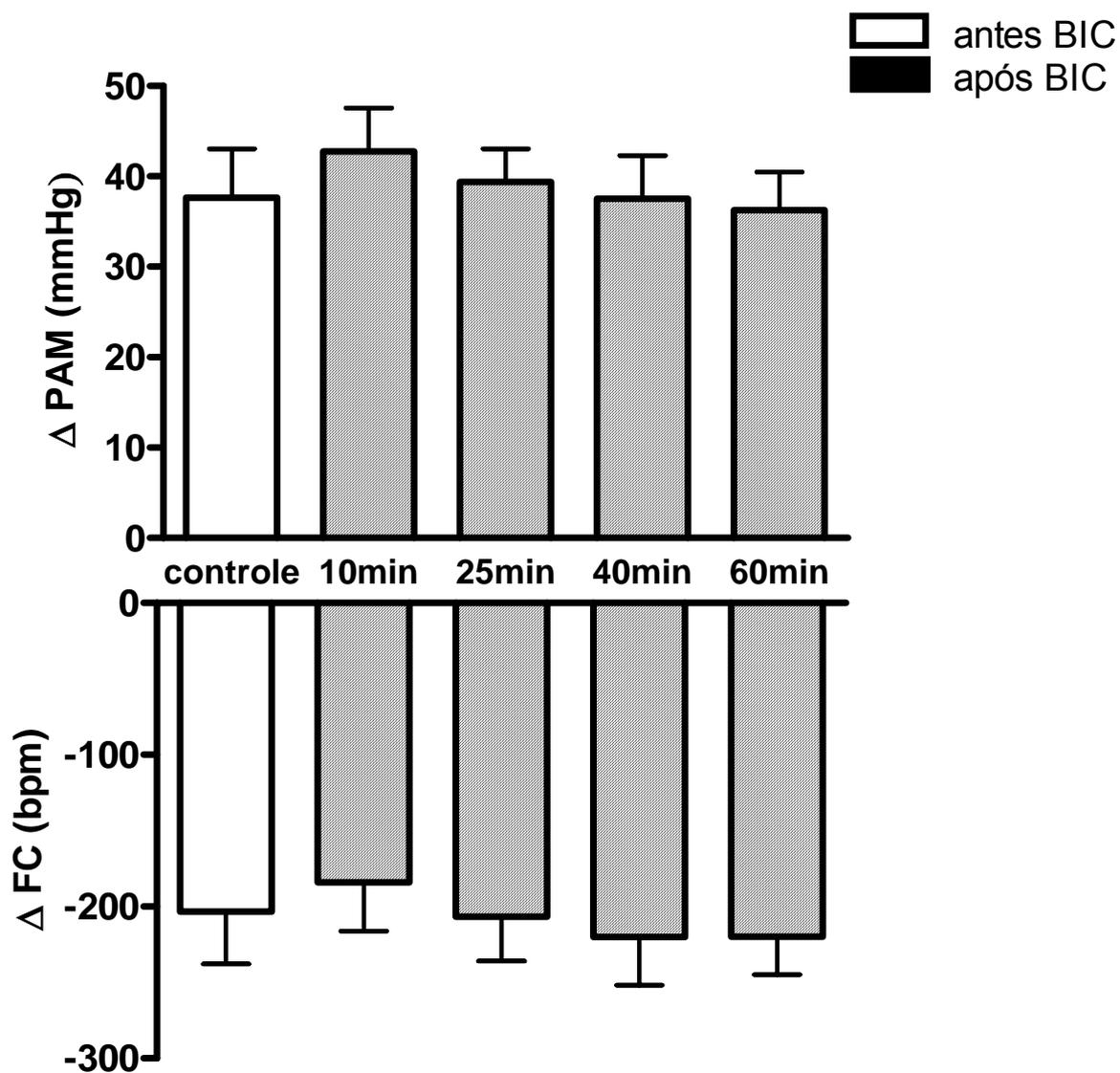


Figura 13 - Alterações na pressão arterial média (Δ PAM, mmHg) e frequência cardíaca (Δ FC, bpm), produzidas pela injeção i.v. de KCN ($40\mu\text{g}/0,1\text{ml}$) antes (controle) e após (10, 25, 40 e 60 minutos) da microinjeção de bicuculina (BIC, $10\text{pmol}/100\text{nl}$) na área A5 de ratos não anestesiados ($n=08$).

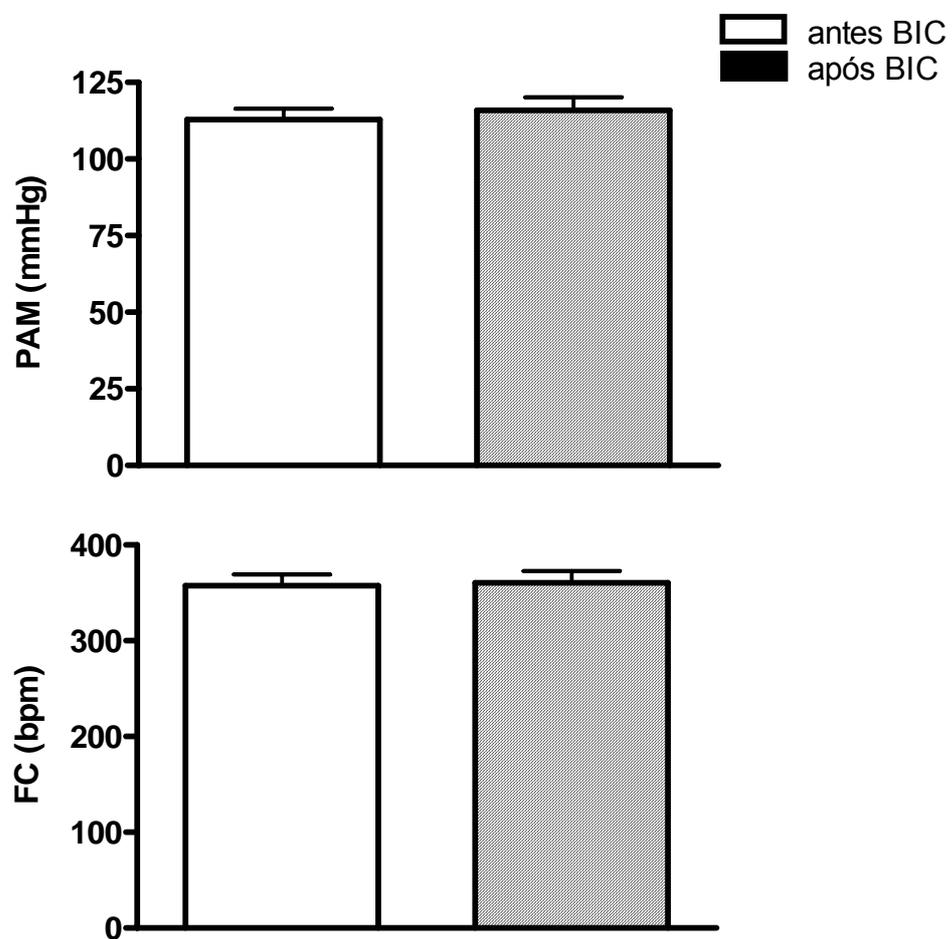


Figura 14 - Valores de pressão arterial média (PAM, mmHg) e frequência cardíaca (FC, bpm) basais, antes e após microinjeção bilateral de bicuculina (BIC, 10pmol/100nl) na área A5 de ratos não anestesiados (n=08).

6.5 Efeito da microinjeção bilateral de muscimol na área A5 sobre as respostas cardiovasculares induzidas pela estimulação do barorreflexo.

Com o objetivo de avaliar a participação dos neurônios da área A5 na integração das respostas cardíacas induzidas pelo barorreflexo, o agonista gabaérgico muscimol, nas doses de 250pmol/100nl e 1,0nmol/100nl, foi microinjetado bilateralmente nessa região, e o barorreflexo estimulado (por fenilefrina e nitroprussiato de sódio) antes e após esta microinjeção.

As figuras 15 e 16 correspondem a traçados representativos de dois animais dos grupos estudados, mostrando as respostas barorreflexas antes (controle) e nos períodos de tempo dez e vinte e cinco minutos após a microinjeção bilateral do muscimol na área A5 de ratos não anestesiados. A figura 15 corresponde ao traçado de um animal que recebeu microinjeção bilateral de muscimol na dose de 250pmol/100nl, e submetido ao estímulo do barorreflexo por infusão de fenilefrina e NPS. A figura 16 corresponde ao traçado de outro animal que recebeu microinjeção bilateral de muscimol na dose de 1,0nmol/100nl, e submetido ao estímulo do barorreflexo por injeção em bôlus de fenilefrina e NPS.

As figuras 17 e 18 mostram o conjunto dos dados obtidos nesses grupos experimentais, onde observamos que a microinjeção bilateral do muscimol, nas duas doses utilizadas, não promoveu alterações significativas na sensibilidade da bradicardia e taquicardia barorreflexas em nenhum dos tempos analisados (tabelas 10, 11 e 12).

Em relação aos parâmetros cardiovasculares basais (figura 19), a microinjeção bilateral de muscimol (250pmol/100nl ou 1,0nmol/100nl) também não alterou significativamente os valores da pressão arterial média (113±4 vs. 112±4 mmHg; 108±6 vs. 113±4 mmHg, respectivamente), bem como não alterou os valores de

freqüência cardíaca (348 ± 11 vs. 366 ± 18 bpm; 374 ± 08 vs. 379 ± 23 bpm, respectivamente), quando comparados com o período controle (antes da microinjeção) (tabelas 13 e 14).

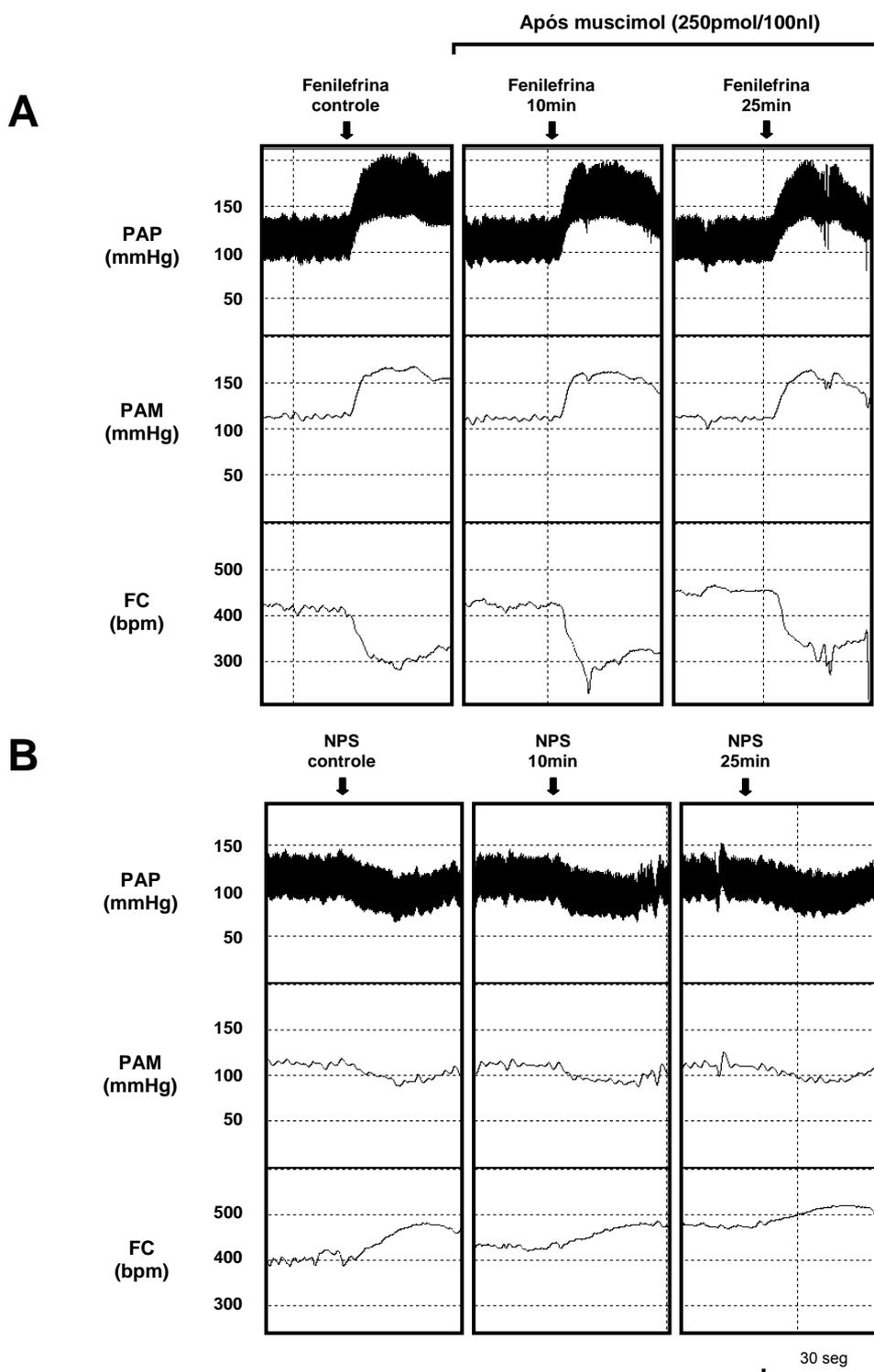


Figura 15 - Traçado de um rato, representativo do grupo estudado, mostrando as alterações na pressão arterial pulsátil (PAP, mmHg), pressão arterial média (PAM, mmHg) e frequência cardíaca (FC, bpm) em resposta à estimulação do barorreflexo com infusão (1,2ml/min/15seg, i.v.) de fenilefrina (5µg/ml – painel A) e nitroprussiato de sódio (NPS, 10µg/ml – painel B), antes (controle) e após (10 e 25 minutos) da microinjeção bilateral de muscimol (250pmol/100nl) na área A5.

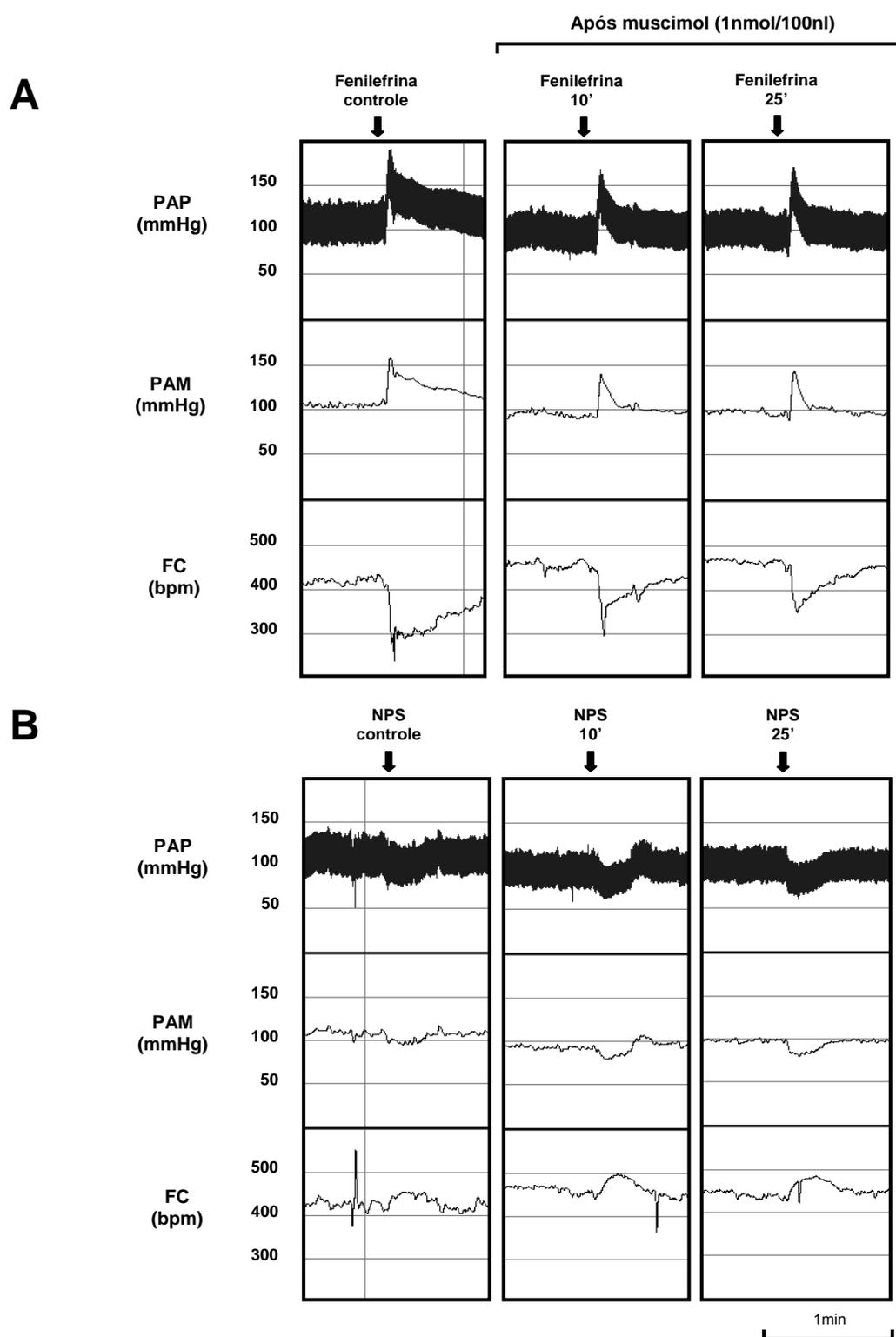


Figura 16 - Traçado de um rato, representativo de dos grupos estudados, mostrando as alterações na pressão arterial pulsátil (PAP, mmHg), pressão arterial média (PAM, mmHg) e frequência cardíaca (FC, bpm) em resposta à estimulação do barorreflexo com injeções em bôlus de fenilefrina (Fenil; 5 μ g/ml, i.v. – painel A) e nitroprussiato de sódio (NPS; 10 μ g/ml, i.v. – painel B), antes (controle) e após (10 e 25 minutos) da microinjeção bilateral de muscimol (1,0nmol/100nl) na área A5.

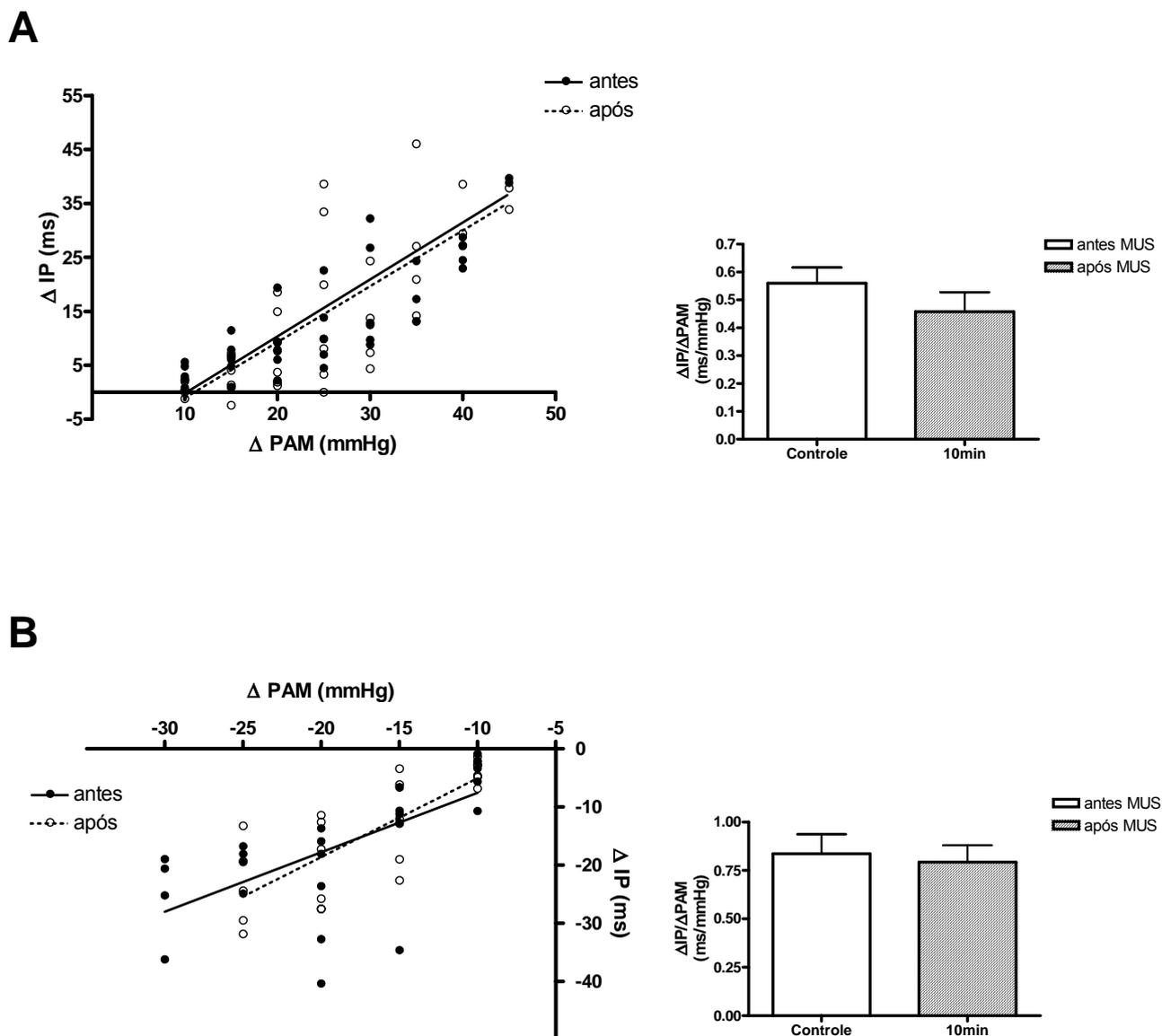


Figura 17 - Alterações da frequência cardíaca, expressas em intervalo de pulso (ΔIP , ms), em resposta as alterações de pressão arterial média (ΔPAM , mmHg) induzidas pela infusão de fenilefrina (painel A) e NPS (painel B) ($5\mu\text{g/ml}$ e $10\mu\text{g/ml}$, respectivamente, a $1,2\text{ml/min}/15\text{seg}$), antes e dez minutos após a microinjeção bilateral de muscimol (MUS, $250\text{pmol}/100\text{nl}$) na área A5 de ratos não anestesiados ($n=06$). As linhas inclinadas representam as retas de melhor ajuste calculadas por regressão linear. Os gráficos representam a sensibilidade do barorreflexo ($\Delta IP/\Delta PAM$, mmHg).

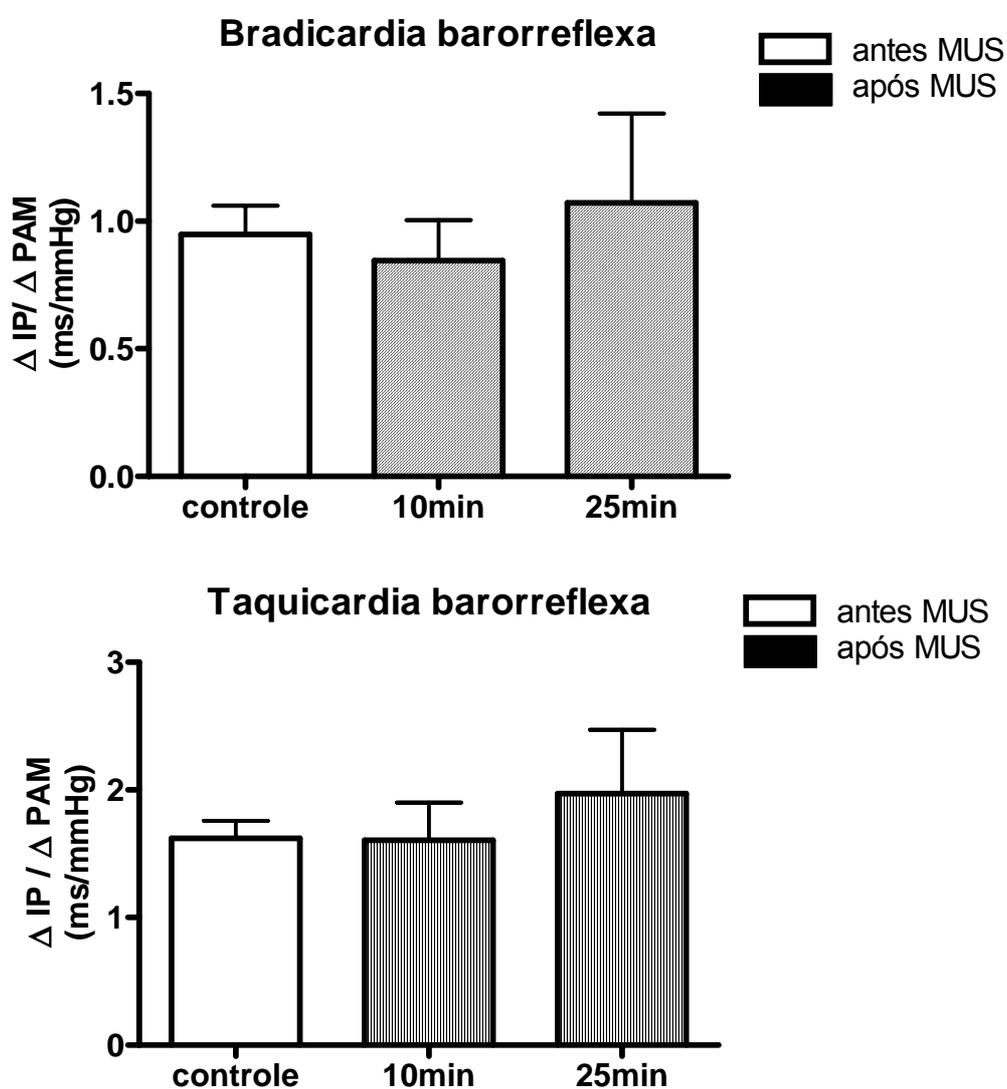


Figura 18 - Alterações na bradicardia e taquicardia barorreflexa ($\Delta IP/\Delta PAM$) induzidas por injeção i.v. de fenilefrina ($0,5\mu g/0,1ml$) e NPS ($1,0\mu g/0,1ml$) respectivamente, antes (controle) e após (10 e 25 minutos) a microinjeção bilateral de muscimol (MUS, $1,0nmol/100nl$) na área A5 de ratos não anestesiados ($n=06$).

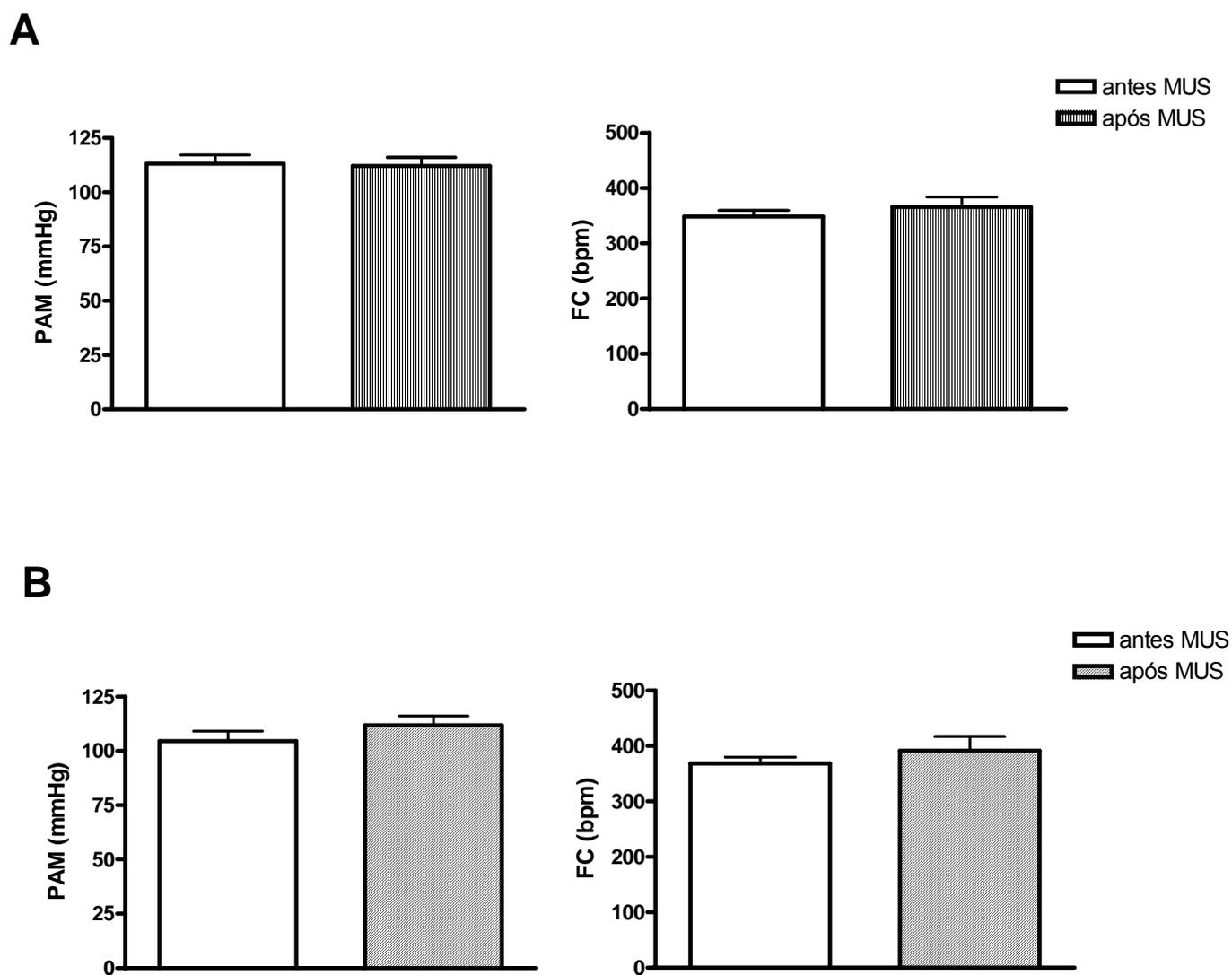


Figura 19 - Valores de pressão arterial média (PAM, mmHg) e frequência cardíaca (FC, bpm) basais, antes e após microinjeção bilateral de muscimol (painel A, 250pmol/100nl, n=06) e (painel B, 1,0nmol/100nl, n=06) na área A5 de ratos não anestesiados.

6.6 Efeito da microinjeção bilateral de lidocaína na área A5 sobre as respostas cardiovasculares induzidas pela estimulação do barorreflexo.

Os estudos anteriores da literatura que sugerem que a área A5 pode participar da via neural do barorreflexo (Andrade e Aghajanian, 1982; Guyenet, 1984; Huangfu e cols., 1991), entretanto em nossos estudos a microinjeção de muscimol, o qual promove hiperpolarização neuronal, não modificou de forma significativa a sensibilidade do barorreflexo. Com o objetivo de avaliar, ou descartar, a participação da área A5 na integração do barorreflexo, o anestésico local Lidocaína (2%/100nl) foi microinjetado bilateralmente nessa região, com o objetivo de promover um bloqueio reversível da atividade dessa região.

A figura 20 mostra o conjunto dos dados desse grupo experimental, onde podemos observar que a microinjeção bilateral do anestésico lidocaína (2%/100nl), não promoveu alterações significativas na sensibilidade da bradicardia ou da taquicardia barorreflexa em nenhum dos tempos analisados (tabela 15).

Em relação aos efeitos da Lidocaína sobre os parâmetros cardiovasculares basais, podemos observar na figura 21 que a microinjeção bilateral do anestésico na área A5, não alterou significativamente os valores basais de pressão arterial média (112 ± 6 vs. 112 ± 3) e frequência cardíaca (396 ± 33 vs. 395 ± 4) (tabela 16).

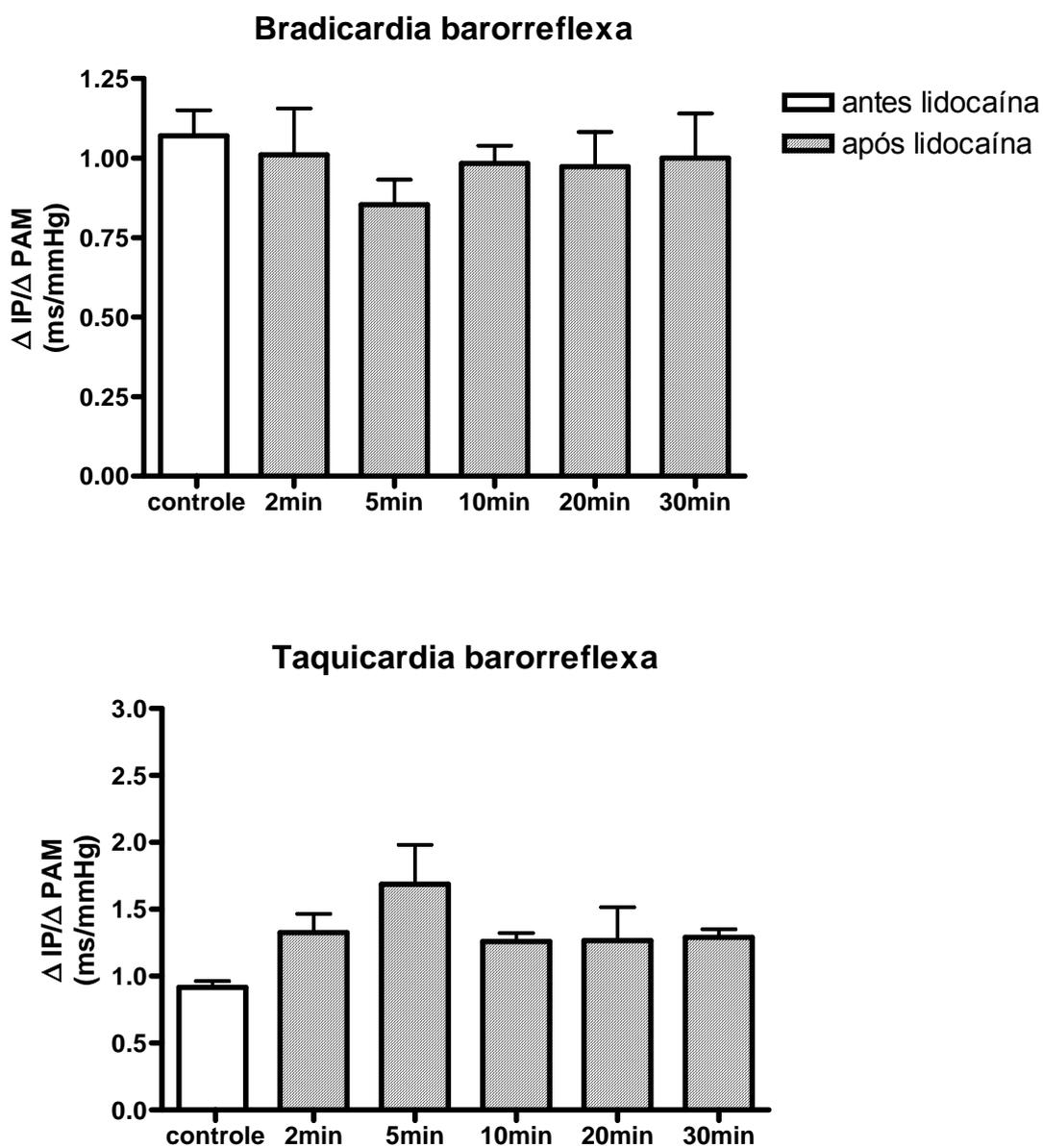


Figura 20 - Alterações na bradicardia e taquicardia barorreflexa ($\Delta IP/\Delta PAM$) induzidas por injeção i.v. de fenilefrina (0,5 μ g/0,1ml) e NPS (1,0 μ g/0,1ml) respectivamente, antes (controle) e após (02, 05, 10, 20 e 30 minutos) a microinjeção bilateral de lidocaína (2%/100nl) na área A5 de ratos não anestesiados (n=03).

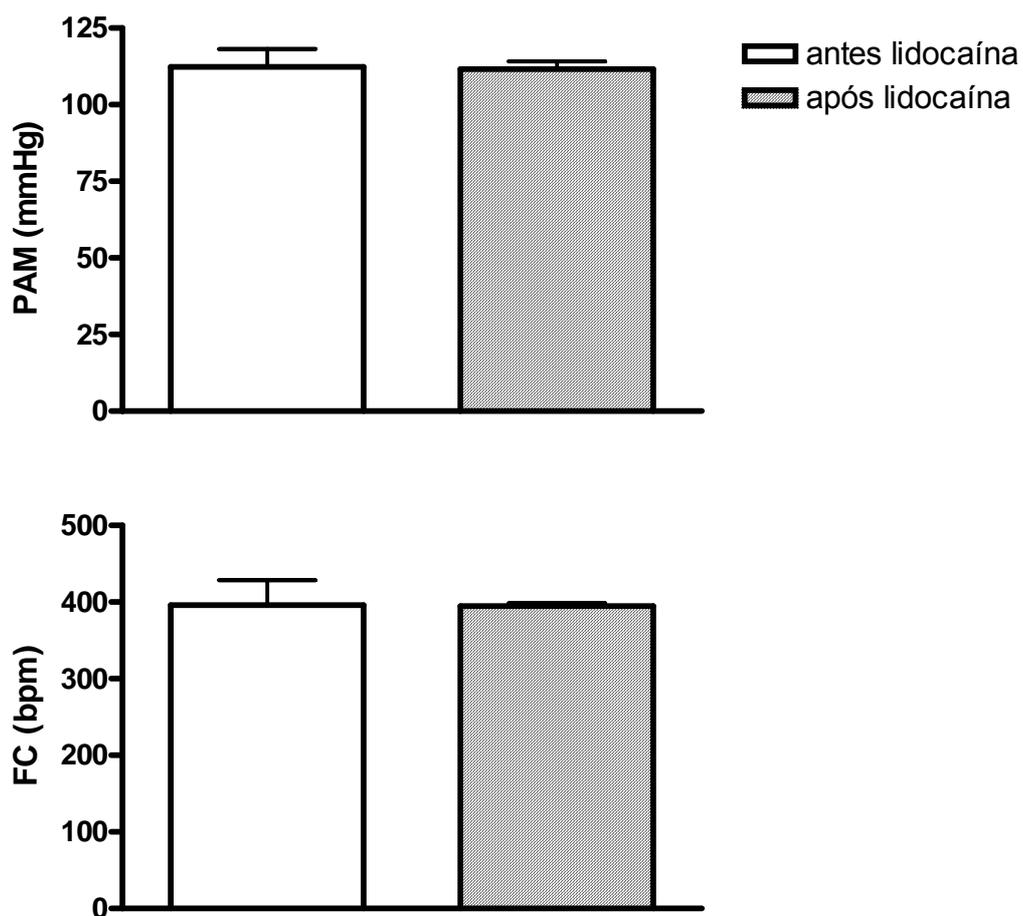


Figura 21 - Valores de pressão arterial média (PAM, mmHg) e frequência cardíaca (FC, bpm) basais, antes e após microinjeção bilateral lidocaína (2%/100nl; n=03) na área A5 de ratos não anestesiados.

6.7 Análise Histológica

A figura apresentada a seguir (figura 22) corresponde à fotomicrografia de uma secção transversal do tronco cerebral de um animal representativo do grupo estudado, mostrando a localização da microinjeção do corante Alcian Blue. O painel A da figura 22 mostra um sítio típico de microinjeção na área A5, localizado 426 μ m anterior ao óbex. Podemos observar que a área A5 localiza-se na ponte ventrolateral, logo abaixo do nervo facial. O painel B da figura 22 corresponde à representação esquemática de um corte transversal do tronco cerebral de rato correspondente ao sítio de microinjeção na área A5 da fotomicrografia.

7. DISCUSSÃO

Este estudo demonstrou que os receptores de aminoácidos excitatórios não participam da neurotransmissão da resposta pressora do quimiorreflexo na área A5, e ainda que a desinibição desta área não modifica esta resposta. Os resultados obtidos nesse estudo também indicam que a área A5 não participa de forma importante da modulação das respostas cardíacas reflexas à estimulação dos barorreceptores.

A participação da área A5 na regulação das repostas reflexas a estimulação dos quimiorreceptores periféricos já é bem estabelecida na literatura. A estimulação dos quimiorreceptores carotídeos através da inalação de N₂ aumenta significativamente a atividade espontânea dos neurônios da área A5, além de promover aumento da descarga do nervo frênico e aumento moderado da pressão arterial (Guyenet e cols, 1993). Koshiya e Guyenet (1994) observaram que a microinjeção de muscimol, um agonista gabaérgico, na área A5 de ratos anestesiados, promoveu redução da resposta simpato-excitatória do quimiorreflexo. Outros estudos, realizados em animais não-anestesiados, demonstraram ainda que a integridade dos neurônios noradrenérgicos da área A5 é essencial para a expressão da resposta pressora do quimiorreflexo (Ramos, 2002). Apesar das evidências relacionando a área A5 com o quimiorreflexo, a neurotransmissão da informação aferente dos quimiorreceptores na área A5 ainda não foi suficiente explorada.

A participação do aminoácido excitatório L-glutamato na regulação da atividade dos neurônios da área A5 no controle cardiovascular tem sido sugerida principalmente baseado no fato de que a microinjeção de aminoácidos excitatórios nesta região promove respostas cardiovasculares, as quais são abolidas quando da microinjeção prévia dos seus antagonistas seletivos (Close e cols., 1982; Drye e cols, 1990). Particularmente em relação ao quimiorreflexo foi observado que tanto a estimulação dos quimiorreceptores quanto a microinjeção de L-glutamato na área A5 promovem respostas semelhantes, isto é aumentam a atividade dos neurônios dessa

região, bem como a atividade do nervo frênico (Guyenet e cols., 1993). Ainda, em animais não-anestesiados, a microinjeção de L-glutamato na área A5 promove respostas cardiovasculares simpato-excitatórias (aumento da pressão arterial e taquicardia), sendo a área A5 uma região essencial para a expressão da resposta pressora do quimiorreflexo (Ramos, 2002). Mais recentemente, Rosin e cols. (2006) observaram a presença de terminais glutamatérgicos na área A5 provenientes do núcleo retrotrapezóide, o qual é estimulado quando da ativação dos quimiorreceptores carotídeos (Takakura e cols., 2006). Considerando este conjunto de evidências é razoável supor que o L-glutamato participe da neurotransmissão do quimiorreflexo na área A5.

Considerando que o L-glutamato atua em diferentes subtipos de receptores, ionotrópicos e metabotrópicos (Cunningham e cols 1994), avaliamos ainda a contribuição desses receptores na neurotransmissão do quimiorreflexo através dos seus antagonistas seletivos.

Nossos resultados mostraram que o bloqueio dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos da área A5 com o antagonista ácido kinurênico não promoveu alteração significativa das respostas cardiovasculares do quimiorreflexo. Este antagonista, na dose utilizada, foi eficaz em bloquear os receptores glutamatérgicos, uma vez que as respostas cardiovasculares induzidas pelo L-glutamato, na presença do ácido kinurênico, foram significativamente atenuadas. Estudos realizados por Guyenet e cols. (1993) em animais anestesiados demonstraram que o ácido kinurênico também não foi capaz de atenuar o aumento da frequência de disparos dos neurônios da área A5 induzido pela estimulação do quimiorreceptores. Esses resultados indicam que os receptores ionotrópicos da área A5 não participam da neurotransmissão das respostas cardiovasculares do quimiorreflexo.

Antes de investigarmos o papel dos receptores metabotrópicos da área A5 na regulação do quimiorreflexo, inicialmente avaliamos se esses receptores desempenham papel relevante no controle cardiovascular. Com o intuito de investigar os efeitos cardiovasculares à estimulação dos receptores glutamatérgicos metabotrópicos dos neurônios da área A5, três doses do agonista metabotrópico ACPD foram eleitas para os protocolos de microinjeção. Duas dessas (0,5 e 1,0nmol/100nl) são comumente utilizadas em estudos na literatura que realizam estimulações de áreas envolvidas no controle cardiovascular (Braga e cols, 2006). Como não foram observadas alterações dos parâmetros cardiovasculares com essas doses, optamos em um outro grupo experimental utilizar uma dose com maior concentração do agonista (2,5nmol/100nl). Nesse protocolo observamos que o ACPD na área A5 promove, de forma semelhante ao L-glutamato, respostas pressora e taquicárdica, as quais foram atenuadas na presença do antagonista glutamatérgico metabotrópico MCPG (2,5nmol/100nl). Entretanto esta mesma dose do MCPG quando microinjetada bilateralmente não foi capaz de modificar as respostas cardiovasculares do quimiorreflexo. Esses resultados sugerem que os neurônios da área A5 possuem receptores glutamatérgicos metabotrópicos que participam da regulação cardiovascular, mas não da neurotransmissão do quimiorreflexo.

Diante dos resultados apresentados, sugerimos que o L-glutamato não é o neurotransmissor responsável pela estimulação dos neurônios da área A5 durante a transmissão da resposta simpato-excitatória do quimiorreflexo em ratos não anestesiados.

Outros neurotransmissores já foram identificados na área A5, e podem estar envolvidos na transmissão do componente simpato-excitatório da resposta quimiorreflexa. Yao e cols. (2000) identificaram através de imunohistoquímica a presença de receptores purinérgicos do tipo P2x nos neurônios noradrenérgicos da

área A5. Os receptores P2x são receptores de membrana ligados a canais iônicos, ativados pela molécula de ATP, conferindo assim a propriedade de neurotransmissor de ação rápida à molécula de ATP extracelular (Burnstock, 2006). Esses receptores são encontrados em vários locais do SNC, dentre esses, áreas relacionadas com controle motor, processos sensoriais e áreas relacionadas com a regulação cardiovascular (Yao e cols., 2000; Burnstock, 2006). Alguns estudos indicam ainda que o ATP, via seus receptores P2, estejam envolvidos no processamento das respostas autonômicas do quimiorreflexo. Estudos de Zhang e Nurse (2004) e Gourine e cols. (2005) demonstraram que o ATP participa da transdução da quimiorrecepção central na RVL. No NTS também foi demonstrado que o antagonismo dos receptores P2 bloqueou seletivamente os impulsos excitatórios do quimiorreceptores periféricos (Paton e cols., 2002). De forma interessante, estudos recentes de Braga e cols. (2007) mostraram que o bloqueio isolado dos receptores purinérgicos ou glutamatérgicos do NTS não foram capazes de reduzir a resposta simpato-excitatória do quimiorreflexo, o que só foi observado após o bloqueio simultâneo desses receptores. De acordo com os estudos de Gu e Macdeermott (1997), os receptores P2x estão localizados pré-sinápticamente em terminais de neurônios excitatórios e podem facilitar a liberação do L-glutamato, sendo o ATP, neste caso, um co-transmissor da liberação do L-glutamato. Desta forma, considerando a existência de terminais glutamatérgicos e de receptores purinérgicos P2x na área A5, e ainda que o bloqueio isolado dos receptores glutamatérgicos nesta região não modificou as respostas cardiovasculares do quimiorreflexo, é possível que o L-glutamato e o ATP também possam atuar como co-transmissores da informação aferente dos quimiorreceptores na área A5. Entretanto até o momento nenhum estudo mostrando que os receptores P2x da área A5 participam, de alguma forma, da regulação cardiovascular foram ainda realizados.

Ainda em relação aos possíveis candidatos a neurotransmissores na área A5, Allen e cols. (1991) em experimentos de autoradiografia *in vitro* de tecidos cerebrais humanos, identificaram quantidades razoáveis do peptídeo angiotensina II ligados aos seus receptores nos neurônios da área A5. Experimentos com a administração, no quarto ventrículo cerebral, de angiotensina II demonstraram aumento da atividade neuronal dos neurônios da área A5 através do aumento da expressão da proteína Fos (Hirooka e cols., 1996). Estudos funcionais de Maiorov e cols. (1999) demonstraram que a microinjeção bilateral de angiotensina II na área A5 de coelhos não anestesiados produz aumento da descarga simpática para o nervo renal de forma dose dependente. Entretanto se a angiotensina II participa da mediação da resposta pressora do quimiorreflexo na área A5 isto ainda não é possível de ser definido.

Outra possibilidade a ser explorada em relação à neurotransmissão do quimiorreflexo na área A5 refere-se ao papel dos receptores α_2 -adrenérgicos. A clonidina é um agonista α_2 -adrenérgico, com efeitos anti-hipertensivos de ação mediada centralmente (Kobinger, 1978). Em particular, tem sido mostrado que um dos principais sítios da ação hipotensora da clonidina é a RVL (Bousquet e Guertzenstein, 1973). Entretanto, a clonidina também afeta neurônios de outras regiões do tronco cerebral. Hauesler (1974) demonstrou previamente que embora o efeito hipotensor da clonidina não seja abolido pela destruição das vias noradrenérgicas centrais, sua potência é reduzida em três vezes, sugerindo que esta redução da potência hipotensora da clonidina é devido à perda do efeito inibitório pré-sináptico da droga sobre os neurônios noradrenérgicos centrais. Huangfu e cols. (1991) demonstraram que a clonidina é capaz de inibir os neurônios catecolaminérgicos da área A5, sendo que 95% dos neurônios catecolaminérgicos da área A5 possuem receptores α_2 -adrenérgicos (Guyenet e cols., 1994). A clonidina, além do efeito inibitório sobre a atividade dos neurônios da área A5, também potencia

o efeito inibitório do barorreflexo sobre a atividade elétrica desses neurônios (Guyenet, 1984). Além disso, estudos em andamento em nosso laboratório mostram que a microinjeção de clonidina na área A5 abole a resposta pressora do quimiorreflexo. Entretanto, apesar desse estudo demonstrar que a ativação dos receptores α_2 -adrenérgicos da área A5 tem efeitos inibitórios importantes na modulação da resposta simpato-excitatória do quimiorreflexo, não podemos afirmar ainda que exista uma via tônica catecolaminérgica sobre os neurônios da área A5 e que a diminuição da atividade desta via possa participar da ativação da área A5 produzindo o componente simpato-excitatório da resposta quimiorreflexa.

Desta forma, estudos adicionais são ainda necessários para identificar o neurotransmissor envolvido na transmissão do componente simpato-excitatório da resposta quimiorreflexa.

Estudos eletrofisiológicos demonstraram que os neurônios da área A5 possuem atividade espontânea, sendo que essa autoatividade pode ser silenciada pela elevação da pressão arterial (Andrade e Aghajanian, 1982; Guyenet, 1984; Byrum e cols., 1984; Huangfu e cols., 1991), sugerindo assim que esses neurônios recebem sinapses inibitórias envolvidas na modulação da pressão arterial. Huangfu e cols. (1991) relataram que a frequência de disparos dos neurônios da área A5 se correlaciona com as descargas elétricas do nervo simpático esplâncnico, e sugeriram ainda que essa propriedade é semelhante aos neurônios excitatórios da RVL que se projetam para os neurônios pré-ganglionares simpáticos na CIML. Estes neurônios da RVL estão em constante modulação inibitória por sinapses vindas dos neurônios da CVL (Li, 1991; Jeske, 1995). Em relação à área A5, Kwiat e cols. (1993) também identificaram sinapses gabaérgicas nos neurônios noradrenérgicos dessa área e ainda sugeriram que esses possam estar em constante inibição. Anteriormente já havíamos observado que a ativação dos receptores GABA da área A5 com muscimol

abole a resposta pressora do quimiorreflexo (Ramos, 2002). Desta forma podemos sugerir que a retirada dessa inibição possa ser o mecanismo pelo qual a ativação do quimiorreflexo resulte na ativação da área A5 produzindo o componente simpato-excitatório da resposta quimiorreflexa. Para investigar esta possibilidade avaliamos o efeito da microinjeção do antagonista GABA-A, bicuculina, sobre as respostas cardiovasculares do quimiorreflexo.

Em nossos resultados observamos que o bloqueio dos receptores gabaérgicos da área A5 não resultou em alteração da pressão arterial basal, bem como não alterou a resposta pressora do quimiorreflexo, sugerindo que a neurotransmissão da resposta simpato-excitatória deste reflexo na área A5 não ocorre por desinibição de seus neurônios.

Achados eletrofisiológicos de Guyenet (1984) e Huangfu e cols. (1991), sugerem que os neurônios noradrenérgicos da área A5 possuem baixa atividade espontânea. Huangfu e Guyenet (1997b) atribuem a baixa atividade espontânea dos neurônios noradrenérgicos da área A5 a propriedades intrínsecas das células do que influências sinápticas. Huangfu e Guyenet em outro trabalho (1997a) relataram que a presença de receptores α_2 -adrenérgicos inibitórios nos neurônios da área A5 sugerem que essas células autoregulam a própria atividade ou são alvo de neurônios noradrenérgicos de outras áreas do SNC que modulam a atividade elétrica desses neurônios. As influências das sinapses gabaérgicas na área A5, portanto, podem estar envolvidas na modulação de outras funções fisiológicas, como o controle ventilatório ou com a nocicepção.

Além do quimiorreflexo, estudos anteriores têm sugerido que a área A5 também possa participar da regulação do barorreflexo. Estudos eletrofisiológicos correlacionaram a atividade espontânea dos neurônios da área A5 com alterações na pressão arterial, induzidas por administração i.v. de fármacos com vasopressina,

angiotensina II (Guyenet, 1984), fenilefrina (Huangfu e cols., 1991), noradrenalina (NA), ou nitroprussiato de sódio (NPS) (Andrade e Aghajanian, 1982; Guyenet, 1984; Guyenet e Byrum, 1985). Estes estudos observaram que elevações dos níveis pressóricos se correlacionam com a diminuição da atividade espontânea dos neurônios da área A5, enquanto que a redução da pressão arterial resulta em efeito oposto. Achados do aumento da expressão da proteína Fos na área A5 resultante da hipotensão obtida com infusão contínua de NPS (Li e Dampney, 1994; Polson e cols., 2002), ou modelos de hemorragia (Chan e Sawchenko, 1994) corroboram com as observações anteriores. Guyenet (1984) demonstrou ainda, em animais submetidos à desnervação sino-aórtica, que as alterações na atividade dos neurônios da área A5 resultantes das alterações na pressão arterial dependem da integridade das vias aferentes barorreceptoras. Uma vez que a ativação dos barorreceptores resulta em redução da atividade eferente simpática e da pressão arterial, podemos sugerir que a inibição dos neurônios da área A5 resultante da ativação dos barorreceptores contribua para a geração da resposta simpato-inibitória do barorreflexo.

Demonstramos no presente estudo que a inibição dos neurônios da área A5 com o agonista gabaérgico muscimol, bem como a inibição da região que compreende a área A5 com o anestésico local lidocaína, não alterou a bradicardia ou mesmo a taquicardia barorreflexa. Diferente do observado em nosso estudo, Maiorov e cols. (2000) realizando estudos em coelhos não anestesiados, demonstrou que a inibição da área A5 com o agonista gabaérgico resulta em aumento do ganho barorreflexo. É importante destacar que neste estudo de Maiorov e cols. (2000) a análise do barorreflexo foi feita analisando-se as alterações na atividade simpática do nervo renal. Essa diferença metodológica pode ter contribuído para a divergência de respostas encontradas. Em acordo com nossos resultados, estudo de Madden e Sved (2003) demonstrou que a destruição de aproximadamente 75% dos neurônios

noradrenérgicos da área A5, através da neurotoxina 6-hidroxidopamina, não alterou a sensibilidade da bradicardia ou taquicardia barorreflexa. Esses resultados nos indicam que a área A5 não é parte integrante ou não possui papel importante na modulação do controle barorreflexo da frequência cardíaca.

Nossos resultados mostraram ainda que o bloqueio bilateral desta área com lidocaína ou muscimol não promoveu qualquer alteração significativa sobre os níveis basais da pressão arterial e da frequência cardíaca. Esses dados são confirmados pelos estudos de Koshiya e Guyenet (1994) e Schreihöfer e Guyenet (2000), os quais também observaram que os neurônios da área A5 não contribuem para a manutenção da atividade simpática basal.

8. SUMÁRIO E CONCLUSÕES

- A inibição dos receptores glutamatérgicos, ionotrópicos com ácido kinurênico ou metabotrópicos com MCPG, não promoveu alterações das respostas pressora e bradicárdica do quimiorreflexo, bem como não alterou os parâmetros cardiovasculares basais. Sugerindo assim que os receptores glutamatérgicos não estão envolvidos na neurotransmissão da resposta simpato-excitatória do quimiorreflexo na área A5; assim como esses receptores não estão envolvidos na modulação da pressão arterial e frequência cardíaca basais em ratos não anestesiados.
- A inibição dos receptores gabaérgicos do tipo A nos neurônios da área A5 com bicuculina, não alterou a respostas pressora e bradicárdica do quimiorreflexo bem como não modificou os valores basais de pressão arterial e frequência cardíaca. Esses dados sugerem que a desinibição da área A5 não parece ser componente integrante da neurotransmissão da resposta simpato-excitatória do quimiorreflexo em ratos não anestesiados.
- A inibição dos neurônios da área A5 com o agonista gabaérgico muscimol ou com o anestésico local lidocaína, não alterou a sensibilidade da bradicardia ou mesmo da taquicardia barorreflexa, sugerindo assim que a área A5 não é parte integrante ou não participa de forma importante para a modulação das respostas cardíacas barorreflexas em ratos não anestesiados.

O conjunto desses resultados nos permite concluir que, em ratos não anestesiados, a neurotransmissão da resposta pressora do quimiorreflexo na área A5 não ocorre através de sinapses glutamatérgicas, ou mesmo por desinibição desta área. Os resultados obtidos nesse estudo indicam ainda que a área A5 não participa

de forma importante da modulação das respostas cardíacas reflexas à estimulação dos barorreceptores.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aicher SA, Milner TA, Pickel VM, e Reis DJ. Anatomical substrates for baroreflex sympathoinhibition in the rat. *Brain Research Bulletin* 51: 107-110, 2000.

Aicher SA, Saravay RH, Cravo S, Jeske I, Morrison SF, Reis DJ, e Milner TA. Monosynaptic projections from the nucleus tractus solitarii to C1 adrenergic neurons in the rostral ventrolateral medulla: comparison with input from the caudal ventrolateral medulla. *The Journal of Comparative Neurology* 373: 62-75, 1996.

Allen AM, Paxinos G, McKinley MJ, Chai SY, e Mendelsohn FA. Localization and characterization of angiotensin II receptor binding sites in the human basal ganglia, thalamus, midbrain pons, and cerebellum. *The Journal of Comparative Neurology* 312: 291-298, 1991.

Amaral FT. Estudo da neurotransmissão da área bulbar ventral e da substância cinzenta periaquedutal dorsolateral sobre o componente simpato-excitatório do quimiorreflexo em ratos não anestesiados. In: *Centro Biomédico*. Vitória: Universidade Federal do Espírito Santo, 1999, p.135,

Andrade R, e Aghajanian GK. Single cell activity in the noradrenergic A-5 region: responses to drugs and peripheral manipulations of blood pressure. *Brain Research* 242: 125-135, 1982.

Bernthal T, e Woodcock CC, Jr. Responses of the vasomotor center to hypoxia after denervation of carotid and aortic bodies. *American Journal of Physiology* 166: 45-54, 1951.

Biscoe TJ. Carotid body: structure and function. *Physiology Reviews* 51: 437-495, 1971.

Biscoe TJ, e Duchen MR. Responses of type I cells dissociated from the rabbit carotid body to hypoxia. *Journal of Physiology* 428: 39-59, 1990.

Bousquet P, e Guertzenstein PG. Localization of the central cardiovascular action of clonidine. *British Journal of Pharmacology* 49: 573-579, 1973.

Braga VA, e Machado BH. Chemoreflex sympathoexcitation was not altered by the antagonism of glutamate receptors in the commissural nucleus tractus solitarii in the working heart-brainstem preparation of rats. *Experimental Physiology* 91: 551-559, 2006.

Braga VA, Soriano RN, Braccialli AL, de Paula PM, Bonagamba LG, Paton JF, e Machado BH. Involvement of L-glutamate and ATP in the neurotransmission of the sympathoexcitatory component of the chemoreflex in the commissural nucleus tractus solitarii of awake rats and in the working heart-brainstem preparation. *Journal of Physiology* 581: 1129-1145, 2007.

Bronk DW, Ferguson LK, Magaria R, e Solandt DT. The activity of the cardiac sympathetic centers. *American Journal of Physiology* 117: 237-249, 1936.

Burman KJ, Ige AO, White JH, Marshall FH, Pangalos MN, Emson PC, Minson JB, e Llewellyn-Smith IJ. GABAB receptor subunits, R1 and R2, in brainstem catecholamine and serotonin neurons. *Brain Research* 970: 35-46, 2003.

Burnstock G. Historical review: ATP as a neurotransmitter. *Trends in Pharmacological Sciences* 27: 166-176, 2006.

Byrum CE, e Guyenet PG. Afferent and efferent connections of the A5 noradrenergic cell group in the rat. *The Journal of Comparative Neurology* 261: 529-542, 1987.

Byrum CE, Stornetta R, e Guyenet PG. Electrophysiological properties of spinally-projecting A5 noradrenergic neurons. *Brain Research* 303: 15-29, 1984.

Campagnole-Santos MJ, Diz DI, e Ferrario CM. Baroreceptor reflex modulation by angiotensin II at the nucleus tractus solitarii. *Hypertension* 11: 1167-171, 1988.

Chan RK, e Sawchenko PE. Spatially and temporally differentiated patterns of c-fos expression in brainstem catecholaminergic cell groups induced by cardiovascular challenges in the rat. *The Journal of Comparative Neurology* 348: 433-460, 1994.

Cheng Z, Zhang H, Yu J, Wurster RD, e Gozal D. Attenuation of baroreflex sensitivity after domoic acid lesion of the nucleus ambiguus of rats. *Journal of Applied Physiology: Respiratory, Environmental and Exercise Physiology* 96: 1137-1145, 2004.

Chitravanshi VC, e Sapru HN. Chemoreceptor-sensitive neurons in commissural subnucleus of nucleus tractus solitarius of the rat. *American Journal of Physiology* 268: R851-858, 1995.

Close JM, Neil JJ, e Loewy AD. Actions of N-methyl aspartate and its antagonist aminophosphonovalerate on the A5 catecholamine cell group in rat. *Brain Research* 249: 393-396, 1982.

Colombari E, Bonagamba LG, e Machado BH. Mechanisms of pressor and bradycardic responses to L-glutamate microinjected into the NTS of conscious rats. *American Journal of Physiology* 266: R730-738, 1994.

Coote JH, e Macleod VH. Evidence for the involvement in the baroreceptor reflex of a descending inhibitory pathway. *Journal of Physiology* 241: 477-496, 1974.

Cunningham MD, Ferkany JW e Enna SJ. Excitatory amino acid receptors: A gallery of new targets for pharmacological intervention. *Life Science* 54:135-148, 1994.

Dahlstrom A, e Fuxe K. Localization of monoamines in the lower brain stem. *Experientia* 20: 398-399, 1964.

Daly BM, Hazzledine JL, e Howe A. Reflex Respiratory and Peripheral Vascular Responses to Stimulation of the Isolated Perfused Aortic Arch Chemoreceptors of the Dog. *Journal of Physiology* 177: 300-322, 1965.

Dampney RA. Functional organization of central pathways regulating the cardiovascular system. *Physiological Reviews* 74: 323-364, 1994.

Davies J. NMDA receptor in synaptic path ways. In: *The NMDA receptor*, edited by Watkins JC e Collingridge GL. New York: Oxford University Press, 1989, p. 77-91.

Dickerson LW, Panico WH, Kuhn FE, Willis AC, Fitzgerald JF, Meyer EL, Norman WP, e Gillis RA. Stimulation of dog RVLM and A5 area changes sympathetic outflow to vascular beds without effect on the heart. *American Journal of Physiology* 272: R821-839, 1997.

Downing SE, e Siegel JH. Baroreceptor and chemoreceptor influences on sympathetic discharge to the heart. *American Journal of Physiology* 204: 471-479, 1963.

Drye RG, Baisden RH, Whittington DL, e Woodruff ML. The effects of stimulation of the A5 region on blood pressure and heart rate in rabbits. *Brain Research Bulletin* 24: 33-39, 1990.

Easton J, e Howe A. The distribution of thoracic glomus tissue (aortic bodies) in the rat. *Cell and Tissue Research* 232: 349-356, 1983.

Erickson JT, e Millhorn DE. Hypoxia and electrical stimulation of the carotid sinus nerve induce Fos-like immunoreactivity within catecholaminergic and

serotonergic neurons of the rat brainstem. *The Journal of Comparative Neurology* 348: 161-182, 1994.

Franchini KG, e Krieger EM. Cardiovascular responses of conscious rats to carotid body chemoreceptor stimulation by intravenous KCN. *Journal of the Autonomic Nervous System* 42: 63-69, 1993.

Gonzalez C, Almaraz L, Obeso A, e Rigual R. Carotid body chemoreceptors: from natural stimuli to sensory discharges. *Physiological Reviews* 74: 829-898, 1994.

Gourine AV, Llaudet E, Dale N, e Spyer KM. ATP is a mediator of chemosensory transduction in the central nervous system. *Nature* 436: 108-111, 2005.

Gu JG, e MacDermott AB. Activation of ATP P2X receptors elicits glutamate release from sensory neuron synapses. *Nature* 389: 749-753, 1997.

Guyenet PG. Baroreceptor-mediated inhibition of A5 noradrenergic neurons. *Brain Research* 303: 31-40, 1984.

Guyenet PG. Role of the Ventral Medulla Oblongata in Blood Pressure Regulation. In: *Central Regulation of Autonomic Functions*, edited by Loewy AD, e Spyer KM. New York: Oxford University Press, 1990, p. 145-167.

Guyenet PG, e Byrum CE. Comparative effects of sciatic nerve stimulation, blood pressure, and morphine on the activity of A5 and A6 pontine noradrenergic neurons. *Brain Research* 327: 191-201, 1985.

Guyenet PG, Koshiya N, Huangfu D, Verberne AJ, e Riley TA. Central respiratory control of A5 and A6 pontine noradrenergic neurons. *American Journal of Physiology* 264: R1035-1044, 1993.

Guyenet PG, Stornetta RL, Riley T, Norton FR, Rosin DL, e Lynch KR. Alpha 2A-adrenergic receptors are present in lower brainstem catecholaminergic and serotonergic neurons innervating spinal cord. *Brain Research* 638: 285-294, 1994.

Haeusler G. Clonidine-induced inhibition of sympathetic nerve activity: no indication for a central presynaptic or an indirect sympathomimetic mode of action. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 286: 07-111, 1974.

Haibara AS, Bonagamba LG, e Machado BH. Sympathoexcitatory neurotransmission of the chemoreflex in the NTS of awake rats. *American Journal of Physiology* 276: R69-80, 1999.

Haibara AS, Colombari E, Chianca DA, Jr., Bonagamba LG, e Machado BH. NMDA receptors in NTS are involved in bradycardic but not in pressor response of chemoreflex. *American Journal of Physiology* 269: H1421-1427, 1995.

- Haibara AS, Tamashiro E, Oliven MV, Bonagamba LGH e Machado BH.** Involvement of the parabrachial nucleus in the pressor response to chemoreflex activation in awake rats. *Autonomic Neuroscience* 101(1-2): 60-67, 2002.
- Heymans C, e Bouckaert JJ.** Sinus caroticus and respiratory reflexes: I. Cerebral blood flow and respiration. Adrenaline apnoea. *Journal of Physiology* 69: 254-266, 1930.
- Hirooka Y, Head GA, Potts PD, Godwin SJ, Bendle RD, e Dampney RA.** Medullary neurons activated by angiotensin II in the conscious rabbit. *Hypertension* 27: 287-296, 1996.
- Hirooka Y, Polson JW, Potts PD, e Dampney RA.** Hypoxia-induced Fos expression in neurons projecting to the pressor region in the rostral ventrolateral medulla. *Neuroscience* 80: 1209-1224, 1997.
- Huangfu D, e Guyenet PG.** Alpha 2-adrenergic autoreceptors in A5 and A6 neurons of neonate rats. *American Journal of Physiology* 273: H2290-2295, 1997a.
- Huangfu D, e Guyenet PG.** Autoactivity of A5 neurons: role of subthreshold oscillations and persistent Na⁺ current. *American Journal of Physiology* 273: H2280-2289, 1997b.
- Huangfu D, Hwang LJ, Riley TA, e Guyenet PG.** Splanchnic nerve response to A5 area stimulation in rats. *American Journal of Physiology* 263: R437-446, 1992.

Huangfu DH, Koshiya N, e Guyenet PG. A5 noradrenergic unit activity and sympathetic nerve discharge in rats. *American Journal of Physiology* 261: R393-402, 1991.

Jeske I, Reis DJ, e Milner TA. Neurons in the barosensory area of the caudal ventrolateral medulla project monosynaptically on to sympathoexcitatory bulbospinal neurons in the rostral ventrolateral medulla. *Neuroscience* 65: 343-353, 1995.

Katona PG, Poitras JW, Barnett GO, e Terry BS. Cardiac vagal efferent activity and heart period in the carotid sinus reflex. *American Journal of Physiology* 218: 1030-1037, 1970.

Kirchheim HR. Systemic arterial baroreceptor reflexes. *Physiological Reviews* 56: 100-177, 1976.

Kock LL. Histology of the Carotid Body. *Nature* 167:611-612, 1951.

Kobinger. Central alpha-adrenergic systems as targets for hypotensive drugs. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology* 81: 39-100, 1978.

Koshiya N, e Guyenet PG. A5 noradrenergic neurons and the carotid sympathetic chemoreflex. *American Journal of Physiology* 267: R519-526, 1994a.

Koshiya N, e Guyenet PG. NTS neurons with carotid chemoreceptor inputs arborize in the rostral ventrolateral medulla. *American Journal of Physiology* 270: R1273-1278, 1996.

Koshiya N, e Guyenet PG. Role of the pons in the carotid sympathetic chemoreflex. *American Journal of Physiology* 267: R508-518, 1994b.

Koshiya N, Huangfu D, e Guyenet PG. Ventrolateral medulla and sympathetic chemoreflex in the rat. *Brain Research* 609: 174-184, 1993.

Kwiat GC, Liu H, Williamson AM, e Basbaum AI. GABAergic regulation of noradrenergic spinal projection neurons of the A5 cell group in the rat: an electron microscopic analysis. *The Journal of Comparative Neurology* 330: 557-570, 1993.

Li YW, e Dampney RA. Expression of Fos-like protein in brain following sustained hypertension and hypotension in conscious rabbits. *Neuroscience* 61: 613-634, 1994.

Li YW, Gieroba ZJ, McAllen RM, e Blessing WW. Neurons in rabbit caudal ventrolateral medulla inhibit bulbospinal barosensitive neurons in rostral medulla. *American Journal of Physiology* 261: R44-51, 1991.

Lipski J, Lin J, Teo MY, e van Wyk M. The network vs. pacemaker theory of the activity of RVL presympathetic neurons--a comparison with another putative pacemaker system. *Autonomic Neuroscience* 98: 85-89, 2002.

Loewy AD, Gregorie EM, McKellar S, e Baker RP. Electrophysiological evidence that the A5 catecholamine cell group is a vasomotor center. *Brain Research* 178: 196-200, 1979.

MacAllen RM, Spyer KM. The location of cardiac vagal preganglionic motoneurons in the medulla of the cat. *Journal of Physiology* 258:187-204, 1976.

Madden CJ, Ito S, Rinaman L, Wiley RG, e Sved AF. Lesions of the C1 catecholaminergic neurons of the ventrolateral medulla in rats using anti-DbetaH-saporin. *American Journal of Physiology* 277: R1063-1075, 1999.

Madden CJ, e Sved AF. Cardiovascular regulation after destruction of the C1 cell group of the rostral ventrolateral medulla in rats. *American Journal of Physiology* 285: H2734-2748, 2003.

Maiorov DN, Malpas SC, e Head GA. Influence of pontine A5 region on renal sympathetic nerve activity in conscious rabbits. *American Journal of Physiology* 278: R311-319, 2000.

Maiorov DN, Wilton ER, Badoer E, Petrie D, Head GA, e Malpas SC. Sympathetic response to stimulation of the pontine A5 region in conscious rabbits. *Brain Research* 815: 227-236, 1999.

Marshall JM. Peripheral chemoreceptors and cardiovascular regulation. *Physiological Reviews* 74: 543-594, 1994.

Mauad H, e Machado BH. Pressor response to unilateral carotid chemoreceptor activation is not affected by ipsilateral antagonism of excitatory amino acid receptors in the rostral ventrolateral medulla of awake rats. *Autonomic Neuroscience* 91: 26-31, 2001.

Mifflin SW. Absence of respiration modulation of carotid sinus nerve inputs to nucleus tractus solitarius neurons receiving arterial chemoreceptor inputs. *Journal of the Autonomic Nervous System* 42: 191-199, 1993.

Minson J, Llewellyn-Smith I, Neville A, Somogyi P e Chalmers J. Quantitative analysis of spinally projecting adrenaline-synthesising neurons of C1, C2 and C3 groups in rat medulla oblongata. *Journal of the Autonomic Nervous System* 30: 209-220, 1990.

Morrison SF, Sved AF, e Passerin AM. GABA-mediated inhibition of raphe pallidus neurons regulates sympathetic outflow to brown adipose tissue. *American Journal of Physiology* 276: R290-297, 1999.

Neil JJ, e Loewy AD. Decreases in blood pressure in response to L-glutamate microinjections into the A5 catecholamine cell group. *Brain Research* 241: 271-278, 1982.

Paton JF, De Paula PM, Spyer KM, Machado BH, e Boscan P. Sensory afferent selective role of P2 receptors in the nucleus tractus solitarii for mediating the

cardiac component of the peripheral chemoreceptor reflex in rats. *Journal of Physiology* 543: 995-1005, 2002.

Paxinos G e Watson C. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Second edition. New South Wales: Academic Press Australia, 1986

Polson JW, Mrljak S, Potts PD, e Dampney RA. Fos expression in spinally projecting neurons after hypotension in the conscious rabbit. *Autonomic Neuroscience* 100: 10-20, 2002.

Ramos AS. Papel da área A5 na resposta simpato-excitatória do quimiorreflexo em ratos não-anestesiados. In: *Departamento de Fisiologia e Biofísica*. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 2002, p. 112.

Rosin DL, Chang DA, e Guyenet PG. Afferent and efferent connections of the rat retrotrapezoid nucleus. *The Journal of Comparative Neurology* 499: 64-89, 2006.

Ross CA, Ruggiero DA, e Reis DJ. Projections from the nucleus tractus solitarii to the rostral ventrolateral medulla. *The Journal of Comparative Neurology* 242: 511-534, 1985.

Ruggeri P, Cogo CE, Picchio V, Molinari C, Ermirio R, e Calaresu FR. Influence of GABAergic mechanisms on baroreceptor inputs to nucleus tractus solitarii of rats. *American Journal of Physiology* 271: H931-936, 1996.

Sapru HN, e Krieger AJ. Carotid and aortic chemoreceptor function in the rat. *Journal of Applied Physiology: Respiratory, Environmental and Exercise Physiology* 42: 344-348, 1977.

Schoepp D, Bockaert J, e Sladeczek F. Pharmacological and functional characteristics of metabotropic excitatory amino acid receptors. *Trends in Pharmacological Sciences* 11: 508-515, 1990.

Schreihofe AM, e Guyenet PG. Sympathetic reflexes after depletion of bulbospinal catecholaminergic neurons with anti-DbetaH-saporin. *American Journal of Physiology* 279: R729-742, 2000.

Shefner SA, e Osmanovic SS. GABAA and GABAB receptors and the ionic mechanisms mediating their effects on locus coeruleus neurons. *Progress in Brain Research* 88: 187-195, 1991.

Spyer KM. Annual review prize lecture. Central nervous mechanisms contributing to cardiovascular control. *Journal of Physiology* 474: 1-19, 1994.

Spyer KM. The Central Nervous Organization of Reflex Circulatory Control. In: *Central Regulation of Autonomic Function*, edited by Loewy AD, and Spyer KM. New York: Oxford University Press, 1990, p. 169-188.

Stanek KA, Neil JJ, Sawyer WB, e Loewy AD. Changes in regional blood flow and cardiac output after L-glutamate stimulation of A5 cell group. *American Journal of Physiology* 246: H44-51, 1984.

Strack AM, Sawyer WB, Platt KB, e Loewy AD. CNS cell groups regulating the sympathetic outflow to adrenal gland as revealed by transneuronal cell body labeling with pseudorabies virus. *Brain Research* 491: 274-296, 1989.

Stuesse SL. Origins of cardiac vagal preganglionic fibers: a retrograde transport study. *Brain Research* 236: 15-25, 1982.

Stuesse SL, e Fish SE. Projections to the cardioinhibitory region of the nucleus ambiguus of rat. *The Journal of Comparative Neurology* 229: 271-278, 1984.

Sun MK, e Spyer KM. Responses of rostroventrolateral medulla spinal vasomotor neurones to chemoreceptor stimulation in rats. *Journal of the Autonomic Nervous System* 33: 79-84, 1991.

Swanson LW, e Hartman BK. The central adrenergic system. An immunofluorescence study of the location of cell bodies and their efferent connections in the rat utilizing dopamine-beta-hydroxylase as a marker. *The Journal of Comparative Neurology* 163: 467-505, 1975.

Takakura AC, Moreira TS, Colombari E, West GH, Stornetta RL, e Guyenet PG. Peripheral chemoreceptor inputs to retrotrapezoid nucleus (RTN) CO₂-sensitive neurons in rats. *Journal of Physiology* 572: 503-523, 2006.

Urbanski RW, e Sapru HN. Putative neurotransmitters involved in medullary cardiovascular regulation. *Journal of the Autonomic Nervous System* 25: 181-193, 1988.

Watkins JC, Davies J, Evans RH, Francis AA, e Jones AW. Pharmacology of receptors for excitatory amino acids. *Advances in Biochemical Psychopharmacology* 27: 263-273, 1981.

Westlund KN, Bowker RM, Ziegler MG, e Coulter JD. Noradrenergic projections to the spinal cord of the rat. *Brain Research* 263: 15-31, 1983.

Woodruff ML, Baisden RH, e Whittington DL. Effects of electrical stimulation of the pontine A5 cell group on blood pressure and heart rate in the rabbit. *Brain Research* 379: 10-23, 1986.

Yao ST, Barden JA, Finkelstein DI, Bennett MR, e Lawrence AJ. Comparative study on the distribution patterns of P2X(1)-P2X(6) receptor immunoreactivity in the brainstem of the rat and the common marmoset (*Callithrix jacchus*): association with catecholamine cell groups. *The Journal of Comparative Neurology* 427: 485-507, 2000.

Zhang M, e Nurse CA. CO₂/pH chemosensory signaling in co-cultures of rat carotid body receptors and petrosal neurons: role of ATP and ACh. *Journal Neurophysiology* 92: 3433-3445, 2004.