

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

DIEGO FRANÇA PEDROSA

**PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES NICOTÍNICOS NA
NEUROTRANSMISSÃO DA RESPOSTA CÁRDIO-VAGAL DO
BARORREFLEXO E DO REFLEXO BEZOLD-JARISCH NO
NÚCLEO AMBÍGUO DE RATOS ANESTESIADOS**

**VITÓRIA
2007**

DIEGO FRANÇA PEDROSA

**PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES NICOTÍNICOS NA
NEUROTRANSMISSÃO DA RESPOSTA CÁRDIO-VAGAL DO
BARORREFLEXO E DO REFLEXO BEZOLD-JARISCH NO
NÚCLEO AMBÍGUO DE RATOS ANESTESIADOS**

Pró-forma apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Fisiológicas

Orientador: Prof. Dr. Hélder Mauad

**VITÓRIA
2007**

DIEGO FRANÇA PEDROSA

**PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES NICOTÍNICOS NA
NEUROTRANSMISSÃO DA RESPOSTA CÁRDIO-VAGAL DO
BARORREFLEXO E DO REFLEXO BEZOLD-JARISCH NO
NÚCLEO AMBÍGUO DE RATOS ANESTESIADOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo para obtenção do grau de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Aprovada em 11 Outubro de 2007.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Hélder Mauad

Departamento de Ciências Fisiológicas – UFES
Orientador

Prof. Dr. Fabian Tadeu do Amaral

Faculdade Estácio de Sá de Vitória – FESV

Prof^a. Dr^a. Karla Nívea Sampaio

Departamento de Ciências Farmacêuticas – UFES

Prof. Dr. Luis Carlos Schenberg
Coordenador do PPGCF – UFES

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
Vitória, 11 de Outubro de 2007

RESUMO

RESUMO

Estudos imunohistoquímicos têm demonstrado que o núcleo ambíguo (NA) desempenha um papel predominante no controle cárdio-vagal, devido sua projeção direta para o coração, via nervo vago. Estudos anteriores mostraram através do bloqueio com ácido kinurênico, que os receptores de aminoácido excitatório dos neurônios do NA possuem grande importância na mediação da resposta cronotrópica negativa do barorreflexo (BRF) e reflexo Bezold-Jarisch (RBJ). Entretanto, outros aspectos ainda precisam ser melhores esclarecidos, como por exemplo, o papel dos receptores colinérgicos nicotínicos na mediação desta resposta reflexa bradicárdica, assim como a possível influência destes receptores sobre as respostas induzidas pelo L-Glutamato (L-Glu) no NA. O objetivo deste estudo foi avaliar a participação dos receptores colinérgicos nicotínicos na modulação das respostas cardiovasculares induzidas pela ativação do BRF e do RBJ e estudar uma possível interação entre a neurotransmissão glutamatérgica e colinérgica nicotínica ao nível do NA. Foram utilizados ratos *Wistar*, anestesiados com uretana, paralisados com succinilcolina e ventilados artificialmente. Os animais foram submetidos à cateterização das artéria e veia femorais, para permitir os registros cardiovasculares e administração de drogas, respectivamente, e ao bloqueio da manifestação da atividade simpática cardíaca, através do antagonista β -adrenérgico atenolol. Foram feitas microinjeções no NA com as seguintes coordenadas: ântero-posterior = nível do óbex, lateral $\pm 1,7$ mm da linha média e dorso-ventral = $-1,4$ a $-1,8$ mm da superfície do óbex. As drogas utilizadas neste estudo foram: L-Glu (5 nmol/50 nL), nicotina (0,5; 1; 5 e 10 mM), α -bungarotoxina (1 μ M), DH- β -E (100 μ M) e solução controle (salina, NaCl 0,9%). O BRF foi induzido pela infusão contínua da fenilefrina (50 μ g/mL/min) e o RBJ pela injeção endovenosa de fenilbiguanida (10 μ g/Kg). Os resultados mostraram discretas respostas hipotensoras e bradicardia consistente às microinjeções de L-Glu no NA. As microinjeções de nicotina promoveram significativas respostas bradicárdicas nas doses de 1 e 5 mM e respostas pressoras discretas. Na dose de 10 mM, tanto as respostas bradicárdicas como as pressoras não foram mais observadas. A microinjeção unilateral de DH- β -E no NA não causou alterações significativas nas respostas para o L-Glu e a nicotina, no entanto, microinjeção unilateral de α -

bungarotoxina no NA atenuou as respostas bradicárdicas induzidas pelo L-Glu e a nicotina no mesmo sítio. Em relação aos reflexos cardiovasculares, observamos que o bloqueio com α -bungarotoxina atenuou significativamente o BRF, enquanto que apenas a resposta bradicárdica do RBJ foi atenuada. Os resultados obtidos no presente estudo confirmam que o NA desempenha um importante papel na modulação das respostas cardiovasculares. Sugerem ainda que as subunidades $\alpha 7$ dos receptores colinérgicos nicotínicos do NA, ao nível do óbex, participam da modulação das respostas reflexas cárdio-vagais do BRF e RBJ em ratos anestesiados. Em relação à neurotransmissão glutamatérgica, nossos resultados mostraram que os receptores colinérgicos nicotínicos interferem nas respostas cardiovasculares glutamatérgicas. No entanto, estudos adicionais são necessários para elucidar esta interação, seja interferindo na liberação do L-Glu a partir de projeções provenientes do NTS (*nucleus of tractus solitarius*) ou diretamente nos receptores de aminoácidos excitatórios no NA.

Palavras-chave: Núcleo ambíguo; receptor colinérgico nicotínico; barorreflexo; reflexo Bezold-Jarisch; α -bungarotoxina; DH- β -E.

ABSTRACT

ABSTRACT

Immunohistochemical studies have demonstrated that the nucleus ambiguus (NA) plays a predominant role in the cardio-vagal control. Using the kynurenic acid blockade, previous studies demonstrated that the excitatory aminoacids receptors of NA neurons have an important role in mediating the negative chronotropic response of baroreflex (BRF) and Bezold Jarisch reflex (BJR) in anesthetized rats. However, there are other aspects that need a better understanding, as the role of nicotinic cholinergic receptors in mediating the participation of the reflex bradycardic response, as well as, the possible influence of these receptors on L-glutamate-induced responses in the NA. The goal of the present study was to evaluate the nicotinic cholinergic receptors participation in modulating the cardiovascular responses induced by BRF and BJR activation and to study a possible interaction between the glutamatergic and nicotinic cholinergic neurotransmission in the NA. Male *Wistar* rats were used. The animals were anesthetized with urethane, paralyzed with succinylcholine and artificially ventilated. The femoral artery and vein were cannulated for cardiovascular recording and for drug administration, respectively. The sympathetic cardiac activity was blocked with atenolol, a β -adrenoceptor antagonist. Microinjections into the NA were performed at the level of the δ bex, following the coordinates based in Paxinos and Watson (1998), ± 1.7 mm lateral to the midline and $-1.4/-1.7$ mm ventral to the dorsal surface of the δ bex. The drugs used in this study were: L-Glu (5 nmol/50 nL), nicotine (0,5; 1; 5 e 10 mM), α -bungarotoxin (1 μ M), DH- β -E (100 μ M) and control solutions (saline, NaCl 0,9%). The BRF was evoked with a continuous phenylephrine infusion (50 μ g/mL/min), and the BJR with an intravenous injection of phenylbiguanide (10 μ g/Kg). Our results demonstrated that L-Glu microinjected into the NA produced minimum hypotension and consistent bradycardia. The nicotine microinjections produced significant bradycardic and discrete pressure responses at 1 and 5 mM dosis. At 10 mM dosis, neither bradycardic or pressure responses were no longer observed. The DH- β -E unilateral microinjection at NA did not result in significant alterations in L-Glu induced responses, however, the α -bungarotoxin unilateral microinjection attenuated the L-Glu and nicotine-induced bradycardic responses. Regarding the cardiovascular reflexes, the blockade with α -bungarotoxin attenuated significantly the BRF, while

only the BJR bradycardic response was attenuated. The present results confirm that the NA plays an important role in modulating cardiovascular responses. They also suggest that the $\alpha 7$ nicotinic cholinergic receptors subunits, at Óbex level, participate of BRF and BJR cardio-vagal reflex responses in anesthetized rats. Regarding the glutamatergic neurotransmission, our results showed that the nicotinic cholinergic receptors intervene at glutamatergic cardiovascular responses. However, additional studies are needed to elucidate this interaction occurs at L-glutamate releasing from NTS projections or directly at the excitatory aminoacid receptors in the NA.

Key Words: nucleus ambiguus; nicotinic cholinergic receptor, baroreflex; Bezold-Jarisch reflex; α -bungarotoxin; DH- β -E.

LISTA DE ABREVIÇÕES

- ACh – acetilcolina
- AMPA – “ α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid”: α -amino-3-hidróxi-5-metil-isoxazolpropionato
- AP-5 – “DL-2-amino-5-phosphonopentanoic acid”: DL-2-amino-5-fosfono pentanoato
- AV – atrioventricular
- CS – calamus scriptorius
- CVLM – “caudal ventrolateral medulla”: bulbo ventrolateral caudal
- DAS – desnervação sinoáortica
- DH- β -E – Dihidro- β -eritrodina
- DMPP – dimethyl-fenyl-piperixinium
- DMX – “dorsal vagal motor nucleus”: núcleo motor dorsal do vago
- EPSP – “excitatory postsynaptic potential”: potencial pós-sináptico excitatório
- FBG – fenilbiguanida
- FC – frequência cardíaca
- FEN – fenilefrina
- GABA – “gamma-aminobutyric acid”: ácido gama-aminobutírico
- GRD – grupo respiratório dorsal
- GRV – grupo respiratório ventral
- 5-HT – 5-hidroxitriptamina
- IP – intraperitoneal
- IV – intravenoso
- IML – “intermediolateral column”: coluna intermediolateral
- L-Glu – L-Glutamato
- LTF – “lateral tegmental field”: campo tegumentar lateral
- NA – núcleo ambíguo
- nAChR – “nicotinic acetylcholine receptor”: receptor colinérgico nicotínico
- NaCl – cloreto de sódio
- NDA – nervo depressor aórtico
- NMDA – “N-methyl-D-aspartic acid”: N-metil-D-aspartato

- NOS – “nitric oxide synthase”: óxido nítrico sintase
- NTS – núcleo do trato solitário
- PA – pressão arterial
- RAE – receptor de aminoácido excitatório
- RBJ – reflexo Bezold-Jarisch
- RVLM – “rostral ventrolateral medulla”: bulbo ventrolateral rostral
- SA – sinoatrial
- SNC – sistema nervoso central
- VLc – ventro-lateral caudal
- VLi – ventro-lateral intermediário
- VLr – ventro-lateral rostral
- VPN – Neurônios pré-ganglionares vagais

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
2	OBJETIVOS.....	29
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
3.1	ANIMAIS EXPERIMENTAIS.....	32
3.2	ANESTESIA.....	32
3.3	CATETERIZAÇÃO.....	32
3.4	TRAQUEOSTOMIA E VENTILAÇÃO ARTIFICIAL.....	33
3.5	PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS PARA MICROINJEÇÃO NO NA.....	33
3.6	MICROINJEÇÕES NO NA.....	34
3.7	REGISTROS CARDIOVASCULARES.....	35
3.8	ESTIMULAÇÃO DOS BARORRECEPTORES E RECEPTORES CARDIOPULMONARES (REFLEXO BEZOLD-JARISCH).....	35
3.9	DROGAS UTILIZADAS.....	36
3.10	ANÁLISE HISTOLÓGICA.....	37
3.11	ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS.....	38
3.12	PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS.....	38
3.12.1	Microinjeções unilaterais de diferentes doses nicotina no NA	38
3.12.2	Efetividade do bloqueio dos receptores nicotínicos com microinjeção unilateral de α-bungarotoxina no NA.....	38
3.12.3	Efetividade do bloqueio dos receptores nicotínicos insensíveis à α- bungarotoxina com microinjeção unilateral de dihidro-β-eritrodina no NA.....	39
3.12.4	Respostas cardiovasculares promovidas pela ativação do barorreflexo antes e após a microinjeção bilateral de α-bungarotoxina no NA.....	39
3.12.5	Respostas cardiovasculares promovidas pela ativação do reflexo Bezold-Jarisch antes e após a microinjeção bilateral de α- bungarotoxina no NA.....	40
3.12.6	Respostas cardiovasculares promovidas pela ativação do reflexo Bezold-Jarisch e barorreflexo antes e após a microinjeção bilateral de solução fisiológica no NA.....	40

4	RESULTADOS	41
4.1	EFEITOS CARDIOVASCULARES DAS MICROINJEÇÕES DE L-GLUTAMATO NO NA.....	42
4.2	EFEITOS CARDIOVASCULARES DAS MICROINJEÇÕES DE NICOTINA EM DIFERENTES DOSES NO NA.....	44
4.3	EFEITOS DA MICROINJEÇÃO DE NICOTINA SOBRE AS RESPOSTAS CARDIOVASCULARES PROMOVIDAS PELA MICROINJEÇÃO DE L-GLUTAMATO NO NA.....	49
4.4	EFEITOS DA MICROINJEÇÃO DE SALINA NO NA SOBRE AS RESPOSTAS CARDIOVASCULARES INDUZIDAS PELO L-GLUTAMATO E NICOTINA.....	51
4.5	EFEITOS DA MICROINJEÇÃO DO ANTAGONISTA NICOTÍNICO DH- β -E SOBRE AS RESPOSTAS CARDIOVASCULARES PROMOVIDAS PELA MICROINJEÇÃO DE GLUTAMATO E NICOTINA NO NA.....	54
4.6	EFETIVIDADE DO BLOQUEIO COM α -BUNGAROTOXINA SOBRE AS RESPOSTAS CARDIOVASCULARES PROMOVIDAS PELA MICROINJEÇÃO DE GLUTAMATO E NICOTINA NO NA.....	57
4.7	EFEITOS DAS MICROINJEÇÕES DE SALINA E α -BUNGAROTOXINA BILATERALMENTE NO NA SOBRE AS RESPOSTAS PRESSÓRICAS E BRADICÁRDICAS DO BARORREFLEXO INDUZIDA PELA FENILEFRINA.....	60
4.8	EFEITOS DA MICROINJEÇÃO BILATERAL DE SALINA E α -BUNGAROTOXINA NO NA SOBRE AS RESPOSTAS PRESSÓRICAS E BRADICÁRDICAS DO REFLEXO BEZOLD-JARISCH INDUZIDA PELA FENILBIGUANIDA.....	65
4.9	FOTOMICROGRAFIA E REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA.....	68
5	DISCUSSÃO	69
5.1	EFEITOS CARDIOVASCULARES DAS MICROINJEÇÕES DE L-GLUTAMATO NO NA.....	70
5.2	EFEITOS CARDIOVASCULARES DAS MICROINJEÇÕES DE NICOTINA NO NA.....	72

5.3	EFEITOS DA MICROINJEÇÃO DE NICOTINA SOBRE AS RESPOSTAS CARDIOVASCULARES PROMOVIDAS PELA MICROINJEÇÃO DE L-GLUTAMATO NO NA.....	75
5.4	EFEITOS CARDIOVASCULARES DO BLOQUEIO DOS RECEPTORES NICOTÍNICOS INSENSÍVEIS À α -BUNGAROTOXINA COM DH- β -E NO NA.....	77
5.5	EFETIVIDADE DE BLOQUEIO DAS SUBUNIDADES α 7 DOS RECEPTORES NICOTÍNICOS PELA α -BUNGAROTOXINA NO NA.....	79
5.6	EFEITOS DA MICROINJEÇÃO BILATERAL DE α -BUNGAROTOXINA NO NA SOBRE AS RESPOSTAS CARDIOVASCULARES DO BARORREFLEXO E DO REFLEXO BEZOL-JARISCH.....	82
5.7	PERSPECTIVAS PARA O ESTUDO DA NEUROTRANSMISSÃO DO NA.....	86
6	CONCLUSÕES.....	87
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	90
	ANEXO.....	103
	APÊNDICES.....	105

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

O entendimento dos mecanismos de controle do sistema cardiovascular tem sido almejado há muito tempo, desde os clássicos experimentos dos fisiologistas Claude Bernard (1851) e Brown-Séquard (1852) que demonstraram em coelhos a atividade tônica do sistema nervoso simpático (*apud* Gebber, 1990). Desde então, tem sido atribuído ao Sistema Nervoso Central (SNC) um importante papel no controle da pressão arterial (PA). É sabido que a manutenção da PA em níveis de normalidade assegura uma adequada perfusão tecidual, e conseqüentemente, as trocas entre os capilares e os tecidos. No que se refere aos mecanismos de controle da PA, dois tipos estão envolvidos: aqueles que operam a curto prazo e aqueles que atuam a longo prazo. A regulação à curto prazo se dá através de mecanismos neurais que corrigem instantaneamente os desvios da PA dos seus níveis basais, em questão de segundos. Dentre os mecanismos neurais, os reflexos cardiovasculares possuem grande importância, destacando-se o barorreflexo e o reflexo Bezold-Jarisch. Os mecanismos à longo prazo por sua vez, demandam de maior tempo e envolvem a síntese e liberação de hormônios para a circulação sangüínea, bem como a participação direta de alguns órgãos, como por exemplo os rins.

Os mecanismos de regulação neural têm despertado o interesse de vários investigadores no intuito de esclarecer alguns aspectos da neurotransmissão central deste sistema regulador (Loewy & Spyer, 1990; Haibara et al, 1995; Hilmas et al, 1998; Dehkordi et al, 2006). A estimulação dos reflexos cardiovasculares é feita através de receptores especializados localizados periféricamente compreendidos pelos barorreceptores arteriais, receptores cardiopulmonares, quimiorreceptores e outros receptores.

Os barorreceptores são mecanorreceptores formados por terminações nervosas livres que estão localizadas na camada adventícia das grandes artérias (arco aórtico e seio carotídeo). Estes receptores são sensíveis às variações de tensão na parede destes vasos, isto é, quando ocorrem elevações súbitas da PA, estes receptores sofrem uma grande deformação e geram potenciais receptores, que ao ganharem à fibra nervosa produzem potenciais de ação. Por outro lado, quando ocorre queda da

PA, a tensão na parede dos vasos reduz, e conseqüentemente a geração de potenciais de ação (Figura 1).

Há evidências da existência de dois subtipos de barorreceptores, os quais têm participações diferentes no controle da PA (Seagard et al, 2000). Os barorreceptores tipo 1 possuem axônios mielínicos e regulam as variações da PA, enquanto os do tipo 2 apresentam axônios mais finos, não-mielínicos e controlam principalmente a PA basal. Além disso, estes receptores teriam padrões de disparo diferentes, sendo um de início rápido, com adaptação rápida (tipo 1), e outro de início lento, sem apresentar adaptação (tipo 2).

As informações sobre os níveis de PA são transmitidas ao SNC via nervo depressor aórtico (NDA), que caminham junto com o nervo vago (barorreceptores aórticos). Em relação aos barorreceptores carotídeos, as informações trafegam inicialmente pelo nervo sinusal (ou do seio carotídeo), incorporando-se posteriormente ao nervo glossofaríngeo. Em relação ao nervo vago, estudos de Andersen et al (1978) e Coleridge et al (1987) mostraram a existência de 2 tipos de fibras aferentes sensoriais: as fibras C não-mielínicas, que somam 90% das fibras aferentes dos axônios do NDA, e as fibras do tipo A mielínicas, que somam somente 10%.

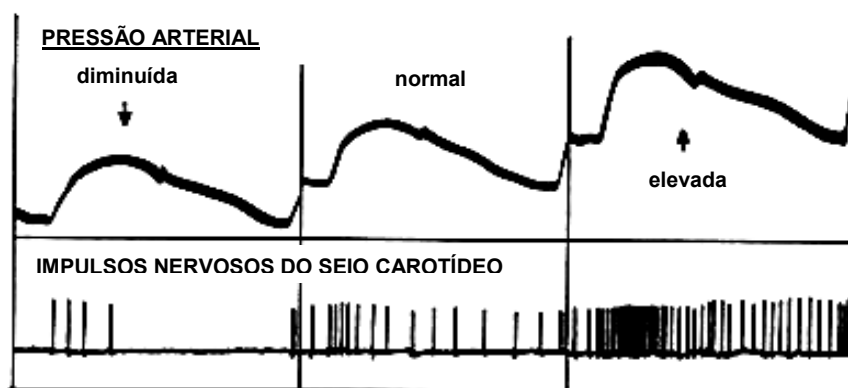


Figura 1 – Representação da atividade dos barorreceptores carotídeos em diferentes níveis de PA (modificado de Loewy & Spyer, 1990).

Um outro reflexo cardiovascular que desempenha importante função no controle da PA é o reflexo Bezold-Jarisch (RBJ). Sua ativação causa uma tríade de respostas cardiorrespiratórias (apnéia, bradicardia e hipotensão). A observação foi

primeiramente reportada em 1867 por Von Bezold e Hirt e confirmada em 1938-1940 por Jarisch. Esta tríade de respostas foi observada inicialmente pela injeção intravenosa de alcalóides do *Veratrum* em animais experimentais e são mediadas por núcleos localizados no tronco cerebral envolvidos no controle da respiração, da FC e do tônus vasomotor. Este reflexo possui receptores polimodais localizados nas câmaras cardíacas (átrios e ventrículos), os quais são estimulados quando estas câmaras são expandidas ou quimicamente pela serotonina (5-HT) e fenilbiguanida (FBG) (Kappagoda et al, 1972; Thorén, 1980). As fibras aferentes do RBJ, tal como as fibras aferentes barorreceptoras do arco aórtico, acompanham os nervos vagos em direção ao tronco cerebral (Aviado & Aviado, 2001).

A ativação deste reflexo com 5-HT ou FBG, leva a apnéia, bradicardia e hipotensão de curta duração (Chen, 1979a; Vardhan et al, 1993b; Chianca & Machado, 1994, 1996; Gieroba et al, 1995; Chianca et al, 1997), assim como à diminuição da atividade do nervo simpático renal e secreção de renina (Donald & Shepherd, 1978; Vayssettes-Courchay et al, 1997). A destruição dos neurônios aferentes cardiopulmonares abole o RBJ, eleva a PA e FC, e aumenta a resistência vascular renal, mesentérica e muscular (Donald & Shepherd, 1978; Verberne et al, 1987). A desnervação sino-aórtica (DSA) aguda ou crônica aumenta a sensibilidade do RBJ, sugerindo que ele tenha importância na regulação da PA na ausência do barorreflexo (Person et al, 1988; Raymundo et al, 1989; Chianca & Machado, 1994; Chianca et al, 1997). Esta mesma sensibilidade encontra-se atenuada na hipertrofia cardíaca e após infarto crônico do miocárdio (Meyrelles et al, 1996, 1998) e está elevado em ratos com hipertensão induzida pela inibição da enzima óxido nítrico sintase, mas atenuado em camundongos com o mesmo modelo de hipertensão arterial (Araújo et al, 1998; Peotta et al, 2001).

Várias estruturas bulbares e suprabulbares estão envolvidas nas respostas do barorreflexo e do RBJ ao nível do SNC. As aferências destes reflexos fazem à primeira sinapse ao nível da região intermediária do núcleo do trato solitário (NTS), situado na região dorsal da área bulbar (Palkovits & Záborszky, 1977; Kalia & Sullivan, 1982; Urbanski & Sapru, 1988b; Loewy & Spyer, 1990; Verberne & Guyenet, 1992; Sved & Gordon, 1994; Gieroba et al, 1995; Ohta & Talman, 1996). A partir do NTS, projeções neurais excitatórias se projetam para a área bulbar

ventrolateral caudal (CVLM)¹, que constitui a principal área vasodepressora do bulbo (Willette et al, 1984; Gordon & Leone, 1991; Urbanski & Sapru, 1988b; Agarwal et al, 1989; Murugaian et al, 1989; Cravo & Morrison, 1993; Sved et al, 2000). Quando inativada, observa-se um aumento na atividade nervosa simpática, na PA basal (Cravo & Morrison, 1993) e abolição da resposta hipotensora reflexa (Gordon & Leone, 1991; Murugaian et al, 1989; Verberne & Guyenet, 1992). O CVLM pode ser dividido em duas partes, conforme a sua função: uma parte rostral, que parece participar do componente barorreflexo junto com o controle tônico da PA, e a parte caudal, que somente teria um papel na regulação da atividade simpática tônica (Sved et al, 2000).

Em uma estimulação química do CVLM, a resposta esperada é hipotensão e bradicardia (Urbanski & Sapru, 1988b; Agarwal et al, 1989; Marchenko & Sapru, 2003), sendo a hipotensão um resultado da inibição da atividade da área bulbar ventrolateral rostral (RVLM)², através de uma ação inibitória gabaérgica (Urbanski & Sapru, 1988b; Agarwal et al, 1989, 1990; Verberne & Guyenet, 1992; Sved et al, 2000).

O RVLM é um importante centro gerador da atividade eferente simpática e também é composto por pelo menos dois grupos de neurônios (Ross et al, 1984; Guyenet, 1990; Kiely & Gordon, 1994). A maioria das células contém enzimas envolvidas na biossíntese de catecolaminas, como a PNMT (phenylethanolamine-N-methyl-transferase), enquanto a outra parte dos neurônios não tem esta atividade (Ross et al, 1984; Madden & Sved, 2003).

Há evidências de uma via excitatória do NTS para o RVLM (Urbanski & Sapru, 1988a,b; Mauad & Machado, 1998), e deste para a coluna intermediolateral (IML) da medula espinhal. Nesta coluna estão conectados os neurônios pré-ganglionares simpáticos, que por sua vez irão estimular, nos gânglios simpáticos, os neurônios pós-ganglionares que distribuem a atividade simpática para os diversos órgãos e sistemas (Gebber, 1990; Sved & Gordon, 1994) (Figura 2).

¹ A abreviação CVLM, originária da língua inglesa, foi utilizada para denominar a estrutura “caudal ventrolateral medulla”

² A abreviação RVLM, originária da língua inglesa, foi utilizada para denominar a estrutura “rostral ventrolateral medulla”

O estudo dos núcleos que compõe a via dos reflexos cardiovasculares tem despertado o interesse de vários pesquisadores. Estudos anteriores de Haibara et al (1995) e de Colombari et al (1994, 1997) mostraram que os reflexos cardiovasculares promovem a ativação de vias independentes no NTS, as quais irão modular as respostas autonômicas simpática e cárdio-vagal. As conexões entre o NTS, CVLM e RVLM descrevem, uma das vias centrais do barorreflexo e RBJ, isto é, a via simpato-inibitória, cujos efeitos se expressam principalmente sobre o coração (cronotropismo e inotropismo negativos) e vasos sanguíneos (diminuição da resistência periférica). Por outro lado, a estimulação destes reflexos promove uma resposta bradicárdica, que é comum para estes reflexos, assim como para o quimiorreflexo. Esta resposta seria decorrente da ativação de uma outra via central, que envolve o núcleo ambíguo (NA) e o núcleo motor dorsal do vago (DMX), denominada de via cárdio-vagal.

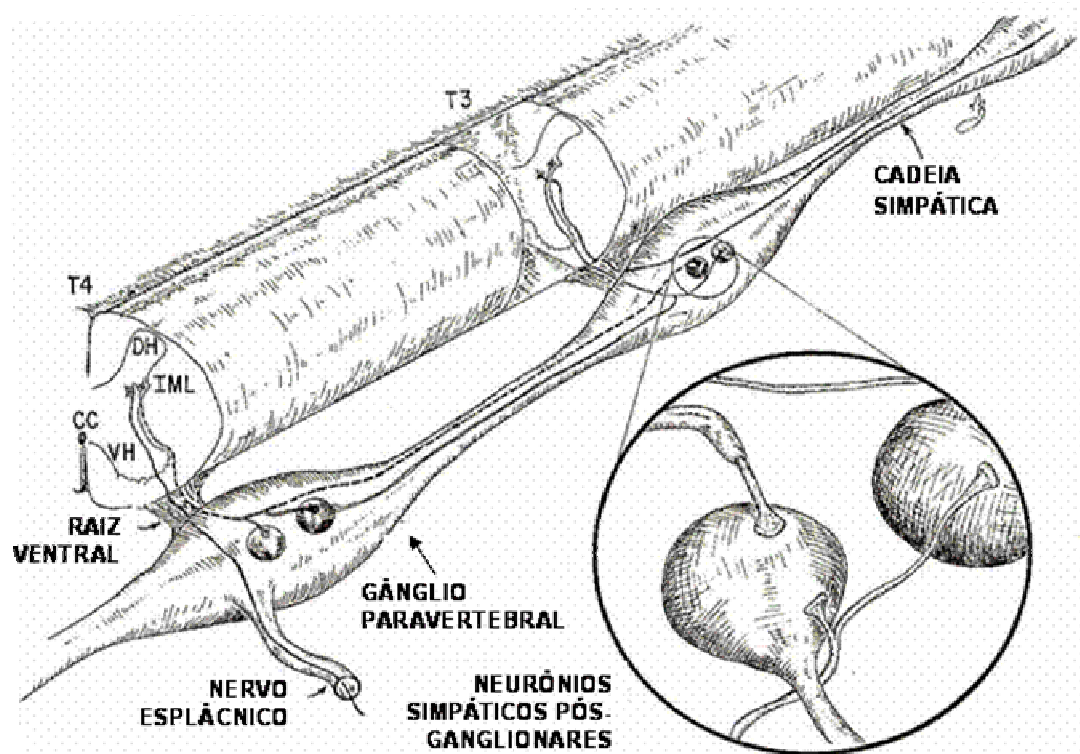


Figura 2 – Representação esquemática das projeções axônicas da coluna intermediolateral para os gânglios simpáticos (Modificado de Loewy & Spyer, 1990).

Tem sido sugerido que esta via seria ativada a partir de projeções excitatórias do NTS para os neurônios pré-ganglionares parassimpáticos localizados no NA e no DMX (Loewy & Spyer, 1990; Hsieh et al, 1998). Apesar de alguns estudos já realizados, o neurotransmissor liberado pelas projeções provenientes do NTS no NA, bem como os receptores ativados e os co-transmissores que participam desta neurotransmissão permanecem por serem melhor caracterizados.

As eferências pré-ganglionares parassimpáticas cardíacas provenientes do NA são fibras colinérgicas mielínicas que inervam os gânglios cardíacos situados no próprio coração (McAllen & Spyer, 1976; Loewy & Spyer, 1990; Cheg & Powley, 2000; Gray et al, 2004b). Estudos com corações de mamíferos coletados de autópsia demonstraram a existência de 458 gânglios atriais e 88 gânglios ventriculares, que estão distribuídos em 5 regiões atriais e 5 ventriculares, responsáveis pelo controle cronotrópico, dromotrópico e inotrópico cardíaco (Randall & Wurster, 1991). Foram identificados em ratos, três grupos ganglionares principais (Cheng et al, 1999,2000; Sampaio et al, 2001). Recentes estudos de Sampaio et al (2003) mostraram que em ratos há uma seletividade no controle cronotrópico e dromotrópico para os gânglios sinoatrial (SA) e atrioventricular (AV), respectivamente.

Apesar das fibras pré-ganglionares cardíacas vagais terem sua origem principalmente no NA, algumas fibras eferentes vagais também partem do DMX (Kalia & Sullivan, 1982). A função do DMX parece estar relacionada principalmente na regulação do trato gastrointestinal (Hsieh et al, 1998), embora possua uma pequena porção de neurônios que projetam fibras eferentes vagais não-mielínicas de classe C para o coração (Kalia & Sullivan, 1982; Loewy & Spyer, 1990; Cheng & Powley, 2000). Foi demonstrado por alguns autores que a estimulação elétrica ou química do DMX promove uma resposta bradicárdica rápida sem muita alteração da PA (Nosaka et al, 1979; Marchenko & Sapru, 2003). Estudos de Willis et al. (1996) corroboram estes achados e sugerem a existência de uma via monossináptica glutamatérgica entre o NTS e o DMX.

Estudos utilizando marcadores retrógrados mostraram a existência de neurônios dromotrópicos negativos no DMX do gato, mas a grande maioria deles tem a sua origem no NA (Massari et al, 1995). Foi demonstrada ainda a existência de fibras

eferentes vagais do DMX para os gânglios SA e AV no átrio de ratos (Cheng et al, 1999). Além disso, nesta mesma espécie, neurônios pré-ganglionares cardíacos vagais com imunorreatividade para acetilcolina e alguns com atividade para enzima óxido nítrico sintase (NOS) também foram encontrados no DMX (Takanaga et al, 2003).

Dentre todas estas estruturas citadas anteriormente, o NA tem nos despertado interesse por sua importância na modulação das respostas cárdio-vagais. Localizado na região ventrolateral bulbar, o NA estende-se do limite caudal do nervo facial até o nível C1 da medula espinhal (McAllen & Spyer, 1976; Loewy & Spyer, 1990) e consiste de duas partes: a divisão dorsal e a ventrolateral. A primeira é constituída por uma coluna longitudinal de motoneurônios que inervam o palato mole, esôfago e laringe, e é composta de três subdivisões denominadas: formação compacta, semi-compacta e reticulada ou “loose”. Já a divisão ventrolateral, também chamada de formação externa, possui seus limites anatômicos mal definidos, mas contém neurônios pré-ganglionares parassimpáticos que inervam o coração, traquéia, brônquios e outras estruturas supra-diafragmáticas (Bieger & Hopkins, 1987; Loewy & Spyer, 1990)(Figura 3).

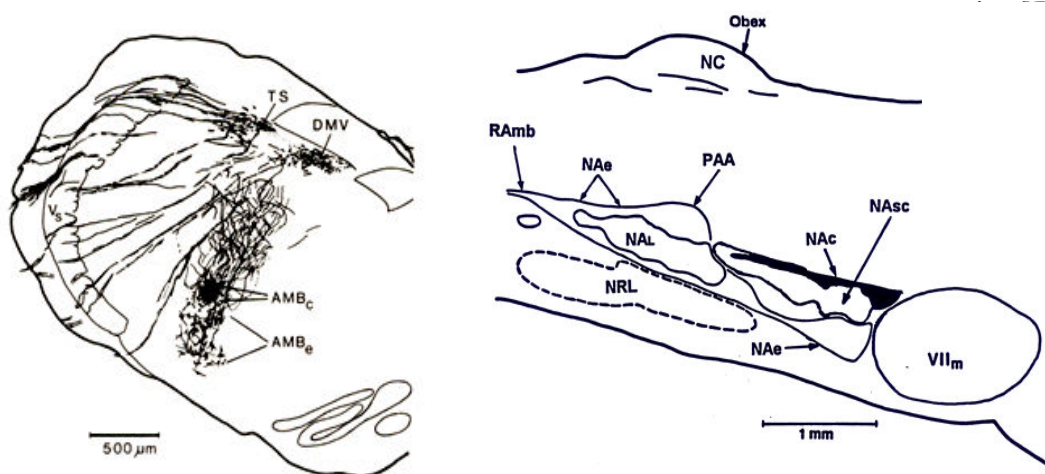


Figura 3 – Esquema representativo das subdivisões do Núcleo Ambíguo (NA) no tronco cerebral do rato nos cortes transversal (esquerda) e sagital (direita). DMV – Núcleo dorsal motor do vago; NA_c e AMB_c - núcleo ambíguo compacto; NA_e e AMB_e - núcleo ambíguo formação externa; NA_L - núcleo ambíguo formação reticulada (*loose formation*); NA_{sc} - núcleo ambíguo semi-compacto; NC - núcleo cuneatus; NRL - núcleo reticular lateral; PAA - núcleo paraambigualis; RAmb - núcleo retroambíguo; VII - núcleo facial medial (Modificado de Bieger e Hopkins, 1987).

Os neurônios pré-ganglionares vagais cardíacos constituem um grupo heterogêneo. Os estudos realizados em gatos sugerem a existência de uma organização

cardiotópica dentro do NA que permite o controle seletivo do ritmo do nó SA, da condução AV e da contratilidade cardíaca (Gatti et al, 1996). Usando um marcador retrógrado, a enzima peroxidase do rábano selvagem (*horseradish peroxidase* – HRP) com a subunidade β da toxina de cólera, pesquisadores identificaram neurônios dromotrópicos negativos na parte ventro-lateral rostral do NA (NA-VLr) de gatos. 75% destes neurônios foram encontrados no NA, principalmente no lado esquerdo, enquanto no DMX a maioria dos neurônios se encontrava no lado direito (Massari et al, 1995). A estimulação do NA com microinjeções de L-Glutamato (L-Glu) causou diminuição da velocidade de condução AV, sem alterar a FC. Os neurônios seletivamente cronotrópicos negativos são encontrados na parte caudal do NA-VL (NA-VLc) (Gatti et al, 1996; Blinder et al, 1998a), enquanto na parte intermediária do NA (NA-VLi), ao nível da área postrema, foram encontrados os dois tipos de neurônios. O trabalho de Brandão (2000) com ratos anestesiados também mostrou uma maior responsividade dos neurônios do NA ao nível +0,5 mm do CS, onde a estimulação com L-Glu promoveu respostas cronotrópicas e dromotrópicas negativas, sem diferença entre os lados esquerdo e direito.

Outros estudos realizados em nosso laboratório demonstraram em ratos uma maior responsividade dos neurônios cronotrópicos negativos do NA ao nível de 0 a +0,5 mm do CS (Brandão, 2000; Sampaio, 2001). Estes neurônios são encontrados na parte caudal do NA-VL, de ratos, enquanto que em gatos, a parte do NA-VLi foram encontrados os dois tipos de neurônios (Gatti et al, 1996; Blinder et al, 1998a). A maioria dos neurônios que foi localizada ao nível da área postrema de gatos projeta-se para o gânglio SA e para o gânglio AV. Um terceiro grupo projeta-se para estes dois gânglios, mostrando a existência de vias neurais comuns e independentes para o coração. Houve uma exclusividade do NA-VL na regulação bulbar da FC, pois nenhuma marcação foi observada no DMX (Gray et al, 2004b).

Em várias espécies como, camundongos, ratos, gatos e cães, foram demonstrados atividade tônica dos neurônios parassimpáticos cardíacos. Estes neurônios possuem uma atividade marca-passo e dependem de atividade sináptica aferente (Mendelowitz, 1999). Estes neurônios são excitados pelos estímulos provenientes dos barorreceptores durante cada sístole, ligando assim o padrão de disparo à FC (Rentero et al, 2002). A atividade dos neurônios parassimpáticos é sincronizada com

o ritmo respiratório, sendo reduzida durante a inspiração e mais ativa durante a fase de apnéia e expiração. Esta sincronização é denominada de “arritmia sinusal respiratória” (Mendelowitz, 1999; Bouairi et al, 2004). Neurônios laríngeos superiores estão localizados no NA junto com os neurônios cardíacos vagais, quando estes são estimulados pelo reflexo laríngeo, provocam apnéia prolongada, constrição dos músculos da laringe e bradicardia importante. Este mecanismo pode ser um dos responsáveis pela “síndrome da morte súbita do recém-nascido” (Mendelowitz, 2000). Rentero et al (2002) mostrou em ratos anestesiados com uretana que a atividade dos motoneurônios cardíacos vagais é maior durante a inspiração e a variação da FC durante o ciclo respiratório é menor do que em outras espécies, sugerindo que o rato teria um padrão de atividade diferente. Porém, Bouairi et al (2004) em ratos acordados mostrou um aumento da FC durante a inspiração igual em outros mamíferos e esta resposta foi alterada com o uso de anestésico.

Próximo ao NA estão localizados neurônios respiratórios que são formados pelos grupos respiratório dorsal (GRD), respiratório ventral (GRV), complexo Bötzing e complexo pré-Bötzing (Rekling & Feldman, 1998). Os neurônios do GRD se localizam na parte ventrolateral do NTS e são ativos principalmente na inspiração (Richter & Spyer, 1990; Duffin et al, 1995). O GRV e os complexos Bötzing e pré-Bötzing formam uma coluna de células respiratórias localizada ventralmente ao NA compacto e entre as células da formação externa (Ellenberger, 1999). Uma lesão ou microinjeções de uma antagonista dos receptores não-NMDA no complexo pré-Bötzing cessa a atividade do nervo frênico e abole a respiração. Na parte dorsal do NA, na divisão compacta, semi-compacta e “loose”, podem ser identificados os motoneurônios das vias aéreas superiores (Jordan, 2001).

Os neurônios pré-vagais que se projetam para o NA estão localizados principalmente no núcleo medial do NTS, na altura da área postrema (Loewy & Spyer, 1990; Agarwal & Calaresu, 1992; Blinder et al, 1998a; Dhruva et al, 1998). O NA também recebe aferências de várias outras regiões do cérebro, dentre estas podemos citar alguns núcleos do hipotálamo, amígdala, formação reticular e substância cinzenta periaquedutal (Loewy & Spyer, 1990; Ennis et al, 1997). Existem estudos que sugerem uma conexão recíproca entre o NA e CVLM, modulando a interação destes núcleos que participam no controle dos sistemas nervosos

parassimpático e simpático, respectivamente (McKittrick & Calaresu, 1997). Neurônios do NA e do RVLM controlam a atividade simpática para os leitos vasculares regionais, sendo que a estimulação do NA produz uma resposta pressora, além da bradicardia (Machado & Brody, 1990). Mas também há evidências de uma via inibitória do NA para o RVLM (McKittrick & Calaresu, 1996).

Vários neurotransmissores já foram identificados no NA. Uma via neuronal monossináptica glutamatérgica do NTS para o NA tem um papel importante no controle cardioreflexo (Neff et al, 1998a, Wang et al, 2001b). Apesar de uma grande variedade de neurotransmissores identificados no NA, o L-Glu é o principal neurotransmissor excitatório. Microinjeções de L-Glu no NA provoca uma bradicardia de início rápido e de curta duração, com poucas alterações de PA (Brandão, 2000; Sampaio, 2001; Marchenko & Sapru, 2003). O L-Glu atua em vários tipos de receptores, que são divididos em dois grupos: ionotrópicos e metabotrópicos. Os receptores ionotrópicos são canais iônicos seletivos aos cátions, permeáveis ao Na^+ e K^+ e bloqueados por Ca^{++} e Mg^{++} (Mayer & Armstrong, 2004). Estes receptores são divididos em três subgrupos: receptores AMPA, Kainato e NMDA, nomeados de acordo com seus agonistas seletivos. Todos os subgrupos de receptores ionotrópicos são encontrados no NTS e no NA (Botsford et al, 1999; Wang et al, 2001b; Corbett et al, 2003). O L-Glu também ativa receptores ligados à proteína G, chamados receptores metabotrópicos, que agem através de segundos mensageiros (Pin & Duvoisin, 1995; Viard & Sapru, 2002; Antunes & Machado, 2003). As ações fisiológicas dos receptores metabotrópicos podem ser tanto excitatória como inibitória, ou até mesmo modulando a neurotransmissão pela potenciação ou inibição pré-sináptica (Pin & Duvoisin, 1995).

Outros neurotransmissores foram identificados no NA, tais como: a acetilcolina (ACh), a substância P e as encefalinas, que também promovem bradicardia quando microinjetadas no NA, mas as respostas são mais lentas e demoradas (Agarwal & Calaresu, 1991). A dopamina microinjetada no NA promove bradicardia provavelmente via receptor D2, presentes nos neurônios cardíacos vagais (Chitravanshi & Calaresu, 1992). O GABA, por sua vez, tem um importante papel na inibição dos neurônios do NA durante a inspiração. A Endomorfina injetada endovenosamente diminui a FC e a PA (Kwok & Dun, 1998), sendo esta ação

bloqueada quando realizada uma vagotomia, através da administração de atropina ou antagonistas dos receptores muscarínicos, sugerindo assim, o envolvimento de neurônios parassimpáticos cardíacos (Irnatén et al, 2003).

Em relação à neurotransmissão colinérgica, o betanecol, um agonista muscarínico, não teve efeito nos neurônios do NA, mas a resposta provocada pela nicotina foi igual à resposta da ACh, sugerindo a participação dos receptores nicotínicos neste núcleo (Neff et al, 1998a). A ACh foi um dos primeiros neurotransmissores a serem estudados e caracterizados. Sua ação ocorre em receptores muscarínicos, que apresentam 5 subtipos diferentes de receptores ($M_1 - M_5$), ou nicotínicos, que serão descritos a seguir (Halbach & Dermietzel, 2002; Cooper et al, 2003).

Os receptores muscarínicos são metabotrópicos, portanto ligados à proteína G, tendo ação lenta, enquanto que os receptores nicotínicos são tipicamente ionotrópicos, permitindo o influxo de íons positivos (Na^+ , Ca^{++} e K^+) quando ativados (Halbach & Dermietzel, 2002; Cooper et al, 2003). A nicotina inicia sua ação através da sua ligação aos receptores colinérgicos nicotínicos, os quais podem ser classificados em duas subclasses: neuronal e muscular. Os receptores nicotínicos musculares contêm 4 diferentes subunidades (α , β , γ e δ), com uma estequiometria de 2 subunidades α e 1 subunidade β , γ e δ . Já a maioria dos receptores nicotínicos neuronais possui somente 2 tipos de subunidades (α e β), cujas combinações resultam em diferentes subtipos de receptores nicotínicos (Webster, 2001; Cooper et al, 2003).

Os receptores colinérgicos-nicotínicos (nAChR)³ neuronais são canais catiônicos, ligando-dependentes que estão localizados em sítios pré e pós-sinápticos dos neurônios do SNC e periférico (Buisson & Bertrand, 2002). O complexo canal-receptor é composto por 5 subunidades de polipeptídeos, os quais podem ser arranjados de forma heteromérica ou homomérica. As diferentes combinações das subunidades caracterizam as propriedades farmacológicas e funcionais de cada subtipo de receptor (Laviolette & Kooy, 2004).

³ A abreviação nAChR, originária da língua inglesa, foi utilizada para denominar a estrutura “nicotinic acetylcholine receptor”

Até o presente, foram identificadas 12 subunidades de nAChR neuronais: $\alpha 2$ - $\alpha 10$ e $\beta 2$ - $\beta 4$, onde as diferentes combinações entre as subunidades α e β formam os receptores heteroméricos. Somente as subunidades $\alpha 7$, $\alpha 8$ e $\alpha 9$ podem formar receptores homoméricos, os quais são compostos pela mesma subunidade. O subtipo $\alpha 7$ encontra-se amplamente distribuído no SNC de mamíferos, enquanto o subtipo $\alpha 4\beta 2$ é o mais abundante (Buisson & Bertrand, 2002).

Funcionalmente, os nAChR neuronais podem ser encontrados em três estados conformacionais (fechado, aberto e dessensibilizado), que são dinamicamente regulados pela exposição ao agonista endógeno (ACh) ou exógeno, como por exemplo, a nicotina (Laviolette & Kooy, 2004). Após a ligação do agonista, o nAChR entra em um estado conformacional que leva a abertura do canal iônico, permitindo a passagem de cátions (Ca^{++} , Na^+ e K^+) através do canal. Após poucos milissegundos, o receptor passa para uma conformação que fecha o canal, voltando ao estado de repouso, ou entra em estado conformacional de dessensibilização, o qual não responde mais ao agonista (Dani & De Biasi, 2001).

O que determina o estado em repouso ou dessensibilizado do receptor é a concentração do agonista e o tempo de exposição ao agonista na fenda sináptica (Dani & De Biasi, 2001). Nas sinapses do SNC, a ACh é liberada pelo terminal pré-sináptico a uma concentração em torno de 1 mM, sendo a mesma hidrolisada rapidamente pela acetilcolinesterase. Este pulso rápido do agonista produz uma ativação sincronizada dos nAChRs ocorrendo pouca ou mesmo não ocorrendo a dessensibilização.

O papel mais amplamente investigado dos nAChR no SNC é a sua influência na liberação de neurotransmissores. A ativação pré-sináptica dos nAChR favorece a permeabilidade ao Ca^{++} nos terminais axônicos, promovendo a liberação de neurotransmissores, tais como a própria ACh, glutamato, norepinefrina, serotonina e GABA (Wonnacott, 1997).

Conforme Dhar (2000) e Aberger (2001), microinjeções de nicotina nos núcleos NTS medial e CVLM, respectivamente, causaram respostas semelhantes às respostas provocadas por outros agonistas colinérgicos, tais como, acetilcolina, citisina e

dimethyl-phenyl-piperixinium (DMPP). No entanto, esta resposta foi de menor intensidade se comparada a promovida pela estimulação com L-Glu. Este mesmo estudo também avaliou o efeito de antagonistas colinérgicos, tais como a α -Bungarotoxina, um bloqueador dos receptores que contém $\alpha 7$ subunidades, e a mecamilamina ou α -conotoxina, um bloqueador dos receptores $\alpha 3\beta 4$. Os autores concluíram que o bloqueio combinado destes antagonistas (α -bungarotoxina e mecamilamina) aboliu a resposta da nicotina nos núcleos bulbares citados.

A neurotransmissão glutamatérgica na região bulbar e o seu papel no controle dos reflexos cardiovasculares têm sido extensivamente estudados, mas há pouca informação sobre a neurotransmissão colinérgica, mais precisamente sobre os receptores nicotínicos mediando o controle dos reflexos cardiovasculares no NA. Vários estudos demonstraram a existência de um importante papel modulatório na atividade dos neurônios parassimpáticos cardíacos em relação aos receptores nicotínicos no cérebro (Mendelowitz, 1998, 1999; Neff et al, 1998b, 2003; Wang et al, 2001a,b, 2003). Entretanto, a participação dos receptores nicotínicos na neurotransmissão reflexa cárdio-vagal do NA ainda não é conhecida, o que nos motivou a realização deste trabalho.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Objetivo Geral

- ✓ Estudar o envolvimento da neurotransmissão colinérgica nicotínica ao nível do NA nas respostas cárdio-vagais reflexas em ratos anestesiados.

Objetivos Específicos

- ✓ Avaliar a participação dos receptores nicotínicos do NA na neurotransmissão do componente cárdio-vagal do barorreflexo em ratos anestesiados.
- ✓ Avaliar a participação dos receptores nicotínicos do NA na neurotransmissão do componente cárdio-vagal do reflexo Bezold-Jarisch em ratos anestesiados.
- ✓ Estudar a possível neuromodulação dos receptores nicotínicos nas respostas cardiovasculares do L-Glutamato no NA de ratos anestesiados.

MATERIAIS E MÉTODOS

MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 – ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Para este estudo foram utilizados ratos da espécie *Wistar*, pesando entre 300 e 350 gramas fornecidos pelo biotério do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Espírito Santo. Os animais foram mantidos em gaiolas com livre acesso à água e ração (Primor Probiotério, Brasil), em ambiente com controle de temperatura (20 – 25°C) e luminosidade (ciclos claro e escuro de 12 /12 horas). Todos os experimentos foram conduzidos conforme o guia para uso e cuidados de animais experimentais, seguindo-se os princípios da Sociedade Brasileira de Fisiologia para pesquisa que envolve animais.

3.2 – ANESTESIA

Para a realização dos protocolos experimentais os animais foram anestesiados com uretana 30% (1,2 g/Kg IP). Durante o experimento, quando necessário, a anestesia era suplementada com alíquotas de 0,1 mL IV. O nível de anestesia do animal foi avaliado pela reação ao pinçamento da pata ou ao toque de córnea com um fio de algodão.

3.3 – CATETERIZAÇÃO

Após a anestesia do animal, o primeiro procedimento realizado foi a cateterização da artéria e veia femoral. Para tanto, foi feita uma pequena incisão inguinal, expondo-se o plexo femoral. A seguir, estas foram isoladas e receberam o implante de um cateter de polietileno PE-10 (SIMS Portex Ltd, Kent, Inglaterra) previamente soldado a um cateter de polietileno PE-50 (CPL MEDICAL'S, São Paulo, SP, Brasil). Para a artéria femoral, o cateter foi alocado na aorta abdominal para permitir o registro direto da PA. Para a veia femoral, o cateter foi alocado na veia cava inferior e foi utilizado para a administração de drogas. Os cateteres foram previamente preenchidos com solução fisiológica (NaCl 0,9%) e as extremidades livres obstruídas com pino de metal.

3.4 – TRAQUEOSTOMIA E VENTILAÇÃO ARTIFICIAL

Ainda sob anestesia, foi feita a traqueostomia do animal. Para tanto, foi feita na linha média do pescoço uma pequena incisão e o divulsionamento dos músculos para a exposição da traquéia. Uma cânula rígida de polietileno PE-90 (SIMS Portex Ltda, Kent, Inglaterra) foi introduzida na traquéia e fixada com fios de algodão.

Antes de iniciar os protocolos experimentais, o tubo de polietileno era conectado a um ventilador mecânico (Harvard Rodent Ventilator modelo 683). O volume corrente era ajustado para 2 mL de ar ambiente e a frequência respiratória em 70 cpm. Previamente ao início dos protocolos experimentais, os animais foram submetidos ao bloqueio da junção neuromuscular com succinilcolina (Sigma, St. Louis, MO, USA) na dose de 10 mg/Kg IV. Quando necessário, era feita a suplementação do bloqueador para garantir o bloqueio completo da respiração a fim de evitar a sua influência sobre os valores de FC.

3.5 – PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS PARA MICROINJEÇÕES NO NA

Para permitir a realização das microinjeções de drogas no NA, este foi exposto ainda sob anestesia. Para tanto, a região dorsal da cabeça era depilada e o animal colocado em um aparelho estereotáxico para pequenos animais (David Kopf Instruments, USA). O animal era colocado sobre uma manta aquecedora para manter a temperatura corporal em ~ 37 °C, a qual foi monitorada durante todo o protocolo experimental através de um termômetro digital por via intrarectal (Becton Dickinson, China). A cabeça do animal era fixada com barras auriculares e flexionada ventralmente com a barra incisora ao nível de 12 mm abaixo da linha interauricular. Em seguida, era feita uma incisão na pele para exposição do crânio, afastando-se os tecidos e o periósteo que o recobrem. Depois era realizada uma craniotomia por meio de uma broca odontológica (Dentec 405N, Brasil). Com o auxílio de uma lupa estereoscópica (WPI, modelo 13301, Sarasota, USA), as meninges (dura-máter, aracnóide e pia-máter) eram cortadas para expor o tronco cerebral e permitir a visualização do calamus scriptorius (CS), o qual foi utilizado como ponto de referência para acessar o NA.

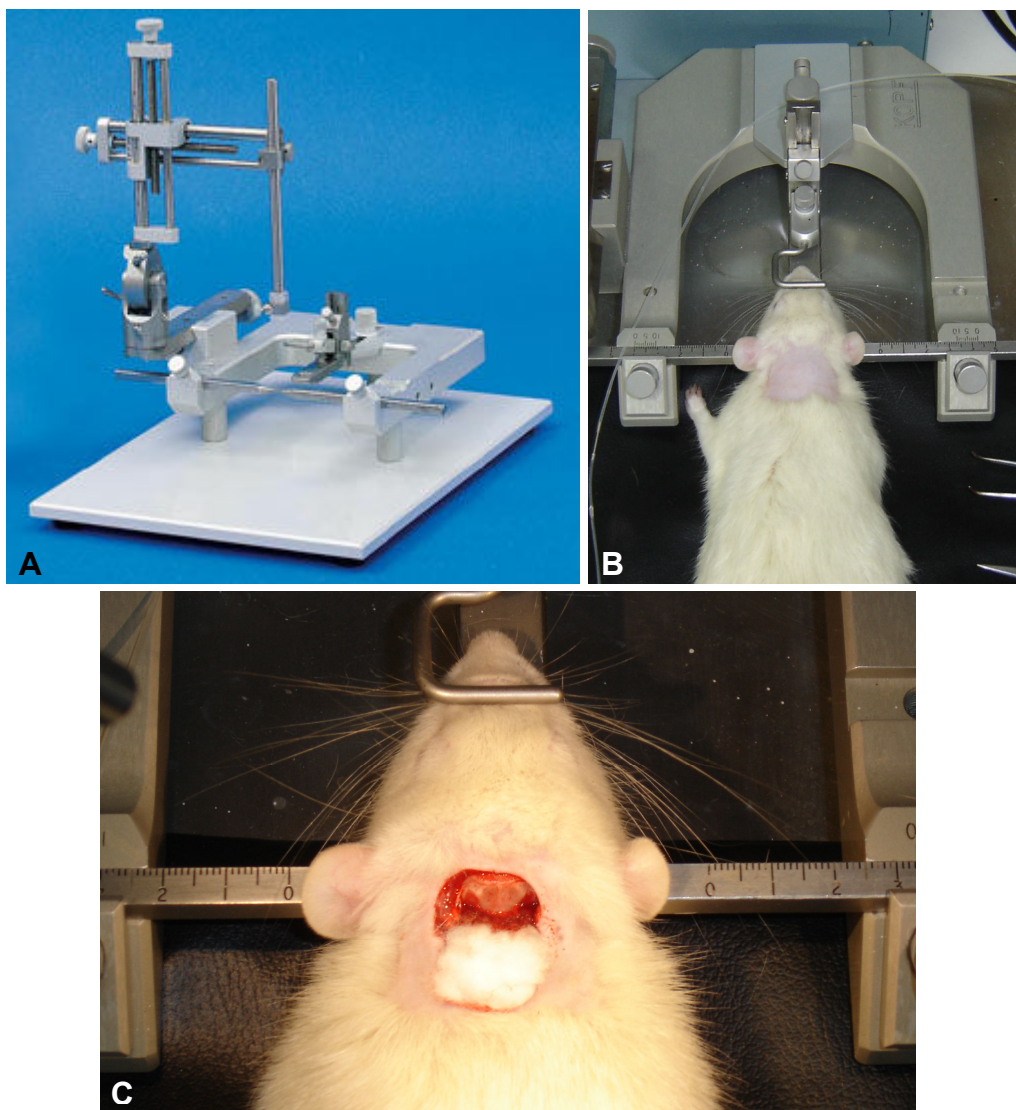


Figura 4 – Cirurgia estereotáxica para realização das microinjeções no NA. (A) Aparelho estereotáxico para pequenos animais; (B) animal fixado no estereotáxico; (C) exposição do osso occipital do rato.

3.6 – MICROINJEÇÕES NO NA

As microinjeções das drogas no NA eram feitas através de uma micropipeta de vidro de três a cinco vias, conforme o protocolo experimental. Para tanto, a pipeta era acoplada a uma bomba de pressão (PV 820 Pneumatic Picopump, WPI, USA) através de um tubo de polietileno, e este por sua vez, era conectado a um cilindro de gás nitrogênio (AGA, Brasil). O volume injetado era monitorizado pelo deslocamento do menisco, com o auxílio de uma lupa estereoscópica e de um papel milimetrado posicionado entre torre do estereotáxico e a pipeta de vidro.

As coordenadas utilizadas para as microinjeções foram baseadas no Atlas de Paxinos e Watson (1998). A saber, ântero-posterior ao nível de CS, lateral = $\pm 1,7$ mm e dorso-ventral = -1,2 a -1,8 mm da superfície do CS. A torre do estereotáxico foi mantida na posição vertical (angulação zero) e o volume injetado era de 50 nL num período de tempo de 2 a 5 segundos.

As drogas utilizadas para as microinjeções foram dissolvidas em solução fisiológica (NaCl 0,9%). O pH foi ajustado para valores próximos do fisiológico (pH 7,4) com bicarbonato de sódio (99,5%).

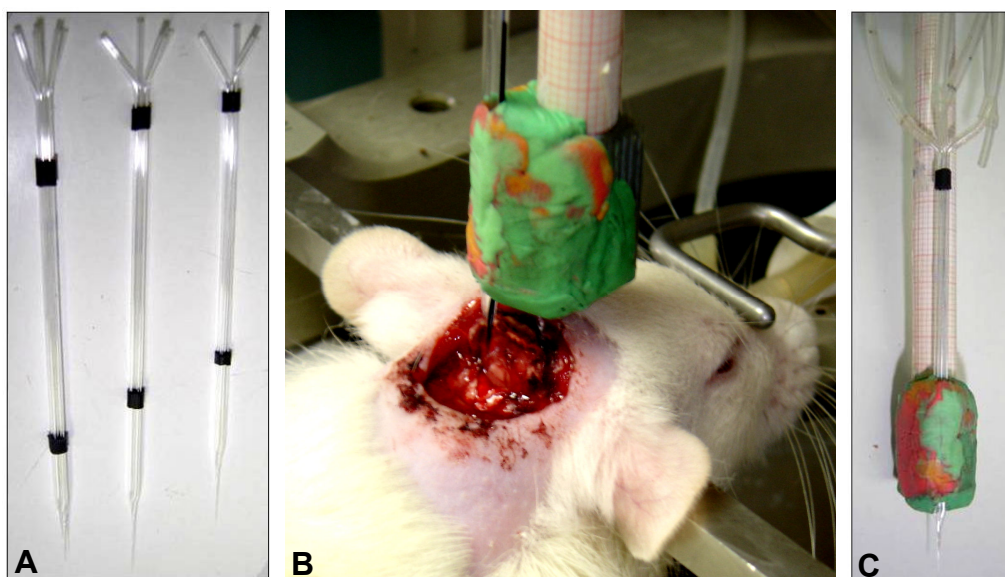


Figura 5 – Microinjeções no NA. (A) Micropipetas de vidro de 3 a 5 vias; (B) micropipeta posicionada no NA; (C) micropipeta fixada na torre do estereotáxico.

3.7 – REGISTROS CARDIOVASCULARES

Antes do início de todos os protocolos experimentais, foi realizado também o bloqueio dos adrenoceptores β_1 com atenolol (Sigma, St. Louis, MO, USA) na dose de 2 mg/Kg IV. Para os registros dos parâmetros cardiovasculares, o cateter arterial era conectado a um transdutor de pressão (COBE, Hewlett-Packard, modelo 78205). As alterações de pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) eram monitoradas e registradas durante todo o experimento por um computador (Pentium 550 MHz) acoplado a um programa para aquisição de dados biológicos (BIOPAC Systems, Inc., Santa Bárbara, Califórnia,

USA, mod. MP 100A – CE/série 199043215). A frequência de amostragem era fixada em 200 Hz.

3.8 – ESTIMULAÇÃO DOS BARORRECEPTORES E RECEPTORES CARDIOPULMONARES (REFLEXO BEZOLD-JARISCH)

A estimulação dos barorreceptores foi feita através de uma infusão endovenosa de uma solução de fenilefrina (50 µg/mL, Sigma, St. Louis, MO, USA) por meio de uma bomba de infusão (Orion model 341B, Sage Pumps, Boston, MA, USA). O fluxo utilizado foi de 50 µg/mL/min, o qual era mantido até a elevação da PAM para aproximadamente 50 mmHg em relação à linha de base. A fenilefrina é um agonista dos adrenoreceptores α_1 , que causa vasoconstrição periférica e conseqüentemente aumento da PAM e bradicardia reflexa. Neste estudo, a avaliação do ganho barorreflexo foi feita através da análise dos dados por regressão linear. Para tanto, foram tomados os valores de PAM de 10 em 10 mmHg, partindo-se do valor basal até o platô (~50 mmHg). A bradicardia reflexa correspondente a cada valor de PAM foi então obtida, tomando-se o cuidado de se descontar o atraso dos sistemas (de aquisição e fisiológico) para registrar o início da bradicardia. Para a determinação da regressão linear foi utilizado o programa estatístico Origin 7.0. Os valores de r e p foram então obtidos e plotados nos gráficos.

Para a estimulação do reflexo Bezold-Jarisch foi utilizado um agonista serotoninérgico dos receptores 5-HT₃, a fenilbiguanida (Sigma, St. Louis, MO, USA), na dose de 10 µg/Kg IV. A droga era injetada por meio de uma seringa Hamilton 50 µL (Hamilton Reno, NV, USA). A seguir, uma injeção de 0,15 mL de salina era feita para que toda droga ganhasse a corrente sangüínea, sem que qualquer fração desta permanecesse no cateter. A fenilbiguanida estimula os receptores cardiopulmonares 5-HT₃ localizados no coração, principalmente no ventrículo esquerdo. Sua ativação causa uma tríade resposta, isto é, apnéia, hipotensão e bradicardia (Donald & Shepherd, 1978; Vardhan et al, 1993b).

3.9 – DROGAS UTILIZADAS

- α -bungarotoxina, antagonista das subunidades $\alpha 7$ dos receptores nicotínicos (Sigma, St. Louis, MO, USA);
- Atenolol, antagonista do adrenoceptor $\beta 1$ (Sigma, St. Louis, MO, USA);
- Azul de Evans (Sigma, St. Louis, MO, USA);
- Bicarbonato de sódio 99,5% (Jand Química Ind., Brasil);
- Dihidro- β -eritrodina, antagonista dos receptores nicotínicos insensível à α -bungarotoxina (Sigma, St. Louis, MO, USA);
- D.P.X. (Aldrich Chemical Company, Inc., Milwaukee, USA);
- Fenilbiguanida, agonista dos receptores 5HT₃ (Sigma, St. Louis, MO, USA);
- Fenilefrina, agonista do adrenoceptor α_1 (Sigma, St. Louis, MO, USA);
- Formol (Formaldeído, Isofar, Duque de Caxias, RJ, Brasil);
- L-Glutamato monossódico (Sigma, St. Louis, MO, USA);
- Solução fisiológica (NaCl 0,9%);
- Succinilcolina (Sigma, St. Louis, MO, USA);
- Tartarato de nicotina (Sigma, St. Louis, MO, USA);
- Uretana (Sigma, St. Louis, MO, USA);
- Vermelho neutro (Sigma, St. Louis, MO, USA).

3.10 – ANÁLISE HISTOLÓGICA

Ao final de cada experimento foram feitas microinjeções do corante de azul de Evans 2%, no volume de 50 nL, para permitir a marcação dos sítios de microinjeções. A seguir, ainda sob anestesia, a caixa torácica era aberta para exposição do coração. Uma perfusão intraventricular esquerda era realizada injetando-se primeiro salina (20 mL) e depois formalina 10% (40 mL). Os troncos cerebrais foram retirados e conservados em solução de formaldeído a 10%, por no mínimo 48 horas. Os mesmos foram seccionados em cortes de aproximadamente 80-100 μ m de espessura em um vibrátomo (Série 1000 Plus – sistema de secção tecidual – St. Louis, MO, EUA). Os cortes eram posicionados em lâminas de uso histológicos, previamente gelatinizadas, e mantidas em estufa a uma temperatura de 45 °C por 24 horas para a sua completa desidratação. A seguir, os cortes eram

submetidos à coloração com vermelho neutro a 1% para visualização dos corpos de Nissl (Burés & Huston, 1983). Após a coloração, as lâminas eram cobertas com D.P.X. e lamínulas e deixadas em estufa (45 °C) para secagem. A visualização dos locais marcados foi feita através de uma lupa estereoscópica, baseando-se no Atlas de Paxinos & Watson (1986). Neste estudo foram considerados somente os animais com confirmação histológica.

3.11 – ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS

Os resultados foram expressos como média \pm EPM. Os métodos estatísticos utilizados foram: Teste *t*-Student, teste *t* pareado e análise de variância (ANOVA) para medidas repetidas, com análise *post hoc* pelo teste de Dunnett e Fisher's LSD. As diferenças foram fixadas como sendo estatisticamente significativas para $p < 0,05$.

3.12 – PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

3.12.1 - Microinjeções unilaterais de diferentes doses nicotina no NA

Inicialmente foram realizadas duas microinjeções de L-Glu na dose de 5 nmol/50 nL (100 mM) utilizado como um índice funcional de localização dos neurônios do NA. O intervalo entre as microinjeções foi de 10 minutos. Em seguida, foi realizada uma curva dose-resposta para nicotina nas seguintes doses, em grupos distintos de animais: 0,5 mM (25 pmol/50 nL; n=5), 1 mM (50 pmol/50 nL; n=6), 5 mM (250 pmol/50 nL; n=7) e 10 mM (500 pmol/50 nL; n=4). As microinjeções de nicotina foram repetidas em intervalos de tempo não inferiores há 30 minutos. Após 15 minutos da segunda microinjeção de nicotina era realizada uma nova microinjeção de L-Glu. No final do experimento, foi realizada uma microinjeção de corante azul de Evans para avaliação histológica.

O tempo de bradicardia provocada pelas microinjeções de nicotina foi analisado e comparado entre as doses de nicotina. Este delta de tempo foi considerado como o período compreendido do início da queda da FC até a recuperação da FC no nível basal.

3.12.2 - Efetividade do bloqueio dos receptores nicotínicos com microinjeção unilateral de α -bungarotoxina no NA

Inicialmente foi feita uma microinjeção unilateral de L-Glu 5 nmol/50 nL para localização dos neurônios do NA. Após 10 minutos era microinjetado nicotina 5 mM. Após 10 minutos, um bloqueador nicotínico, a α -bungarotoxina, era microinjetado na dose de 1 μ M observando-se as alterações de PA e FC. Decorridos 15 min do bloqueio, microinjeções de nicotina e L-Glutamato eram três vezes repetidas alternadamente, com intervalo de 15 min. entre elas. No final do experimento o local das microinjeções era marcado com corante azul de Evans para avaliação histológica. Para a realização de um grupo controle, foi utilizada salina no lugar do bloqueador nicotínico, repetindo-se o mesmo experimento realizado acima.

3.12.3 - Efetividade do bloqueio dos receptores nicotínicos insensíveis à α -bungarotoxina com microinjeção unilateral de dihidro- β -eritrodina no NA

Inicialmente foi feita uma microinjeção unilateral de L-Glu 5 nmol/50 nL para localização dos neurônios do NA. Após 10 minutos, foi microinjetado nicotina 5 mM. Após mais 10 minutos, foi feita uma microinjeção de dihidro- β -eritrodina (DH- β -E) na dose de 100 μ M, observando-se as alterações de PA e FC. Decorridos 15 minutos do bloqueio, microinjeções de nicotina e L-Glutamato eram três vezes repetidas alternadamente, com intervalo de 15 minutos entre elas. No final do experimento, o local das microinjeções era marcado com corante azul de Evans para avaliação histológica. Para a realização de um grupo controle, foi utilizada salina no lugar do bloqueador nicotínico, repetindo-se o experimento realizado acima.

3.12.4 - Respostas cardiovasculares promovidas pela ativação do barorreflexo antes e após a microinjeção bilateral de α -bungarotoxina no NA

Inicialmente foi feito no NA uma microinjeção unilateral de L-Glu na dose de 5 nmol/50 nL para a localização dos neurônios do NA. Decorridos 10 minutos, foi feita uma infusão de fenilefrina até a elevação da PAM em 50 mmHg acima do nível basal, onde as alterações de PAM e FC foram registradas. Após 10 minutos, era microinjetado bilateralmente nos NA um bloqueador dos receptores nicotínicos, a α -

bungarotoxina na dose de 1 μ M. A estimulação do barorreflexo era repetida por três vezes após o bloqueio, com intervalo de tempo de 15 minutos para cada administração. Ao final destes protocolos foram feitas microinjeções de corante azul de Evans bilateralmente no NA para permitir posterior análise histológica dos sítios das microinjeções.

3.12.5 - Respostas cardiovasculares promovidas pela ativação do reflexo Bezold-Jarisch antes e após a microinjeção bilateral de α -bungarotoxina no NA

Inicialmente foi feito no NA uma microinjeção de L-Glu na dose de 5 nmol/50 nL para a localização dos neurônios do NA. Após 10 minutos, foi feita a estimulação do reflexo Bezold-Jarisch, injetando-se fenilbiguanida e as alterações de PAM e FC foram registradas. Após 10 minutos, foram microinjetados bilateralmente a α -bungarotoxina na dose de 1 μ M no NA. O reflexo Bezold-Jarisch foi repetido três vezes após o bloqueio bilateral, com intervalo de 15 min. entre cada administração. Ao final dos experimentos eram feitas microinjeções de corante azul de Evans bilateralmente no NA para permitir posterior análise histológica.

3.12.6 - Respostas cardiovasculares promovidas pela ativação do reflexo Bezold-Jarisch e barorreflexo antes e após a microinjeção bilateral de solução fisiológica no NA

Foram feitos dois grupos controle, para avaliar o reflexo Bezold-Jarisch (n=4) e o barorreflexo (n=4) após as microinjeções bilaterais de salina no NA. Para tanto, seguiu-se os mesmos procedimentos descritos nos itens 3.12.5 e 3.12.4, respectivamente.

RESULTADOS

RESULTADOS

4.1 – EFEITOS CARDIOVASCULARES DAS MICROINJEÇÕES DE L-GLUTAMATO NO NA

Na tabela 1 apresentamos as alterações de PAM e FC de animais submetidos à microinjeções repetidas de L-Glu (5 nmol/50 nL; n=22) em grupos distintos de animais, os quais foram posteriormente utilizados para avaliar os efeitos cardiovasculares da nicotina em diferentes doses. As respostas bradicárdicas promovidas pelas microinjeções de L-Glu são utilizadas como um índice de localização dos neurônios cárdio-vagais do NA. Como podemos observar, a primeira microinjeção de L-Glu promoveu uma discreta resposta hipotensora em todos os grupos de nicotina (0,5; 1; 5; 10 mM) ($-28,1 \pm 10,5$; $-14,3 \pm 20,4$; $-4,5 \pm 14,1$; $-4,7 \pm 14,2$ mmHg, respectivamente) e resposta bradicárdica ($-158,7 \pm 15,3$; $-136,6 \pm 15,2$; $-111,4 \pm 12,4$; $-132,6 \pm 13,4$ bpm, respectivamente). Podemos observar ainda, que a segunda microinjeção de L-Glu promoveu resposta de PA diferentes entre os grupos estudados, que variaram desde uma discreta resposta hipotensora até respostas pressoras. Apesar destas variações nas respostas de PA, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes. Em relação à FC, em todos os grupos de nicotina (0,5; 1; 5; 10 mM) foram observadas respostas bradicárdicas consistentes à segunda microinjeção de L-Glu ($-156,7 \pm 28,7$; $-123,7 \pm 14,5$; $-95,9 \pm 15,7$; $-138,7 \pm 29,7$ bpm, respectivamente).

Nota: Uma terceira microinjeção de L-Glu foi feita após a microinjeção de nicotina nos diferentes grupos. Os efeitos produzidos pela nicotina sobre as respostas do L-Glu serão mostrados posteriormente na Figura 9, juntamente com os valores destas duas primeiras microinjeções.

Tabela 1 – Alterações de pressão arterial média (Δ PAM) e frequência cardíaca (Δ FC) em resposta às microinjeções de L-Glutamato 5 nmol/50 nL (n=22) antes e após as diferentes doses de Nicotina (0,5 mM; 1 mM; 5 mM; 10 mM) no NA. Os dados foram coletados de grupos diferentes.

Microinjeções de L-Glutamato no NA					
Grupo	N	1ª Dose		2ª Dose	
		Δ PAM	Δ FC	Δ PAM	Δ FC
Nicotina 0,5	5	-14,3 \pm 20,4	-136,6 \pm 15,2	10,7 \pm 18,9	-123,7 \pm 14,5
Nicotina 1	6	-28,1 \pm 10,5	-158,7 \pm 15,3	-9,4 \pm 16,4	-156,7 \pm 28,7
Nicotina 5	7	-4,5 \pm 14,1	-111,4 \pm 12,4	15,8 \pm 9,2	-95,9 \pm 15,7
Nicotina 10	4	-4,7 \pm 14,2	-132,6 \pm 13,4	14,1 \pm 3,2	-138,7 \pm 29,7

4.2 – EFEITOS CARDIOVASCULARES DAS MICROINJEÇÕES DE NICOTINA EM DIFERENTES DOSES NO NA

A figura 6 mostra as alterações da PAM e FC promovidas pela microinjeção no NA de grupos distintos de animais de nicotina em diversas doses: 0,5 mM (n=5); 1 mM (n=6); 5 mM (n=7) e 10 mM (n=4) e salina (n=5). As microinjeções de nicotina foram feitas em duplicata para observarmos se as mesmas apresentavam-se consistentes. Podemos observar que as microinjeções de nicotina promoveram discretas, porém não significativas alterações de PA, tanto na 1ª como na 2ª microinjeção em relação a microinjeção de salina. Respostas hipotensoras discretas foram observadas nas doses de 0,5 e 10 mM na primeira ($-6,9 \pm 12,2$; $-4,6 \pm 18,1$ mmHg, respectivamente) e segunda microinjeção ($-2,8 \pm 7$; $-13,6 \pm 15,8$ mmHg, respectivamente). Respostas pressoras foram observadas nas doses de 1 e 5 mM na primeira ($31,6 \pm 8,1$; $27 \pm 6,6$ mmHg, respectivamente) e segunda microinjeção ($10,5 \pm 10,9$; $23,1 \pm 9,9$ mmHg, respectivamente).

Em relação à FC, observamos na figura 6 que as microinjeções de nicotina promoveram respostas bradicárdicas, sendo que nas doses de 0,5 e 10 mM não houveram diferenças significativas para a primeira ($-7,3 \pm 13,3$ e $-7,8 \pm 9,7$ bpm, respectivamente) e a segunda microinjeções de nicotina ($-1,7 \pm 6,5$ e $-21,4 \pm 1,8$ bpm, respectivamente) em relação ao grupo controle ($-2,5 \pm 5,8$ bpm). Diferenças significativas foram observadas nas doses de 1 e 5 mM para a primeira ($-45,9 \pm 10,4^{**}$ e $-59,6 \pm 10,1^{**}$ bpm, respectivamente. $^{**}p < 0,01$) e segunda microinjeções de nicotina ($-34,7 \pm 5,9^*$ e $-70,4 \pm 24,4^{**}$ bpm, respectivamente. $^*p < 0,05$ e $^{**}p < 0,01$) quando comparadas ao grupo controle ($-2,5 \pm 5,8$ bpm).

A figura 7 mostra a duração das bradicardias promovidas pelas microinjeções de nicotina nas diferentes doses citadas. Embora o tempo da bradicardia observado nas diferentes doses de nicotina (0,5; 1; 5; 10 mM) tenha aumentado de forma crescente ($33 \pm 3,9$; $99,3 \pm 21,6$; $117,2 \pm 45,6$; $147,7 \pm 116,5$ segundos, respectivamente), não apresentaram diferenças estatísticas.

Na figura 8 mostramos as alterações nas respostas bradicárdicas e pressoras a duas microinjeções de nicotina (1 mM) em diferentes intervalos de tempo entre as

microinjeções (15 e 30 minutos). Em relação à resposta pressora inicialmente, no intervalo de 15 minutos, apesar de haver uma tendência à atenuação, estas não foram significativas (1ª microinjeção: $16,7 \pm 8$ e 2ª microinjeção: $6,9 \pm 6,1$ mmHg). O mesmo foi observado no intervalo de 30 minutos (1ª microinjeção: $31,6 \pm 8,1$ e 2ª microinjeção: $10,5 \pm 10,9$ mmHg). Em relação às respostas bradicárdicas, também não foram observadas diferenças significativas entre a 1ª e 2ª microinjeções, tanto no intervalo de 15 minutos ($-39,9 \pm 6,2$ e $-22,4 \pm 3,6$ bpm, respectivamente) como no de 30 minutos ($-45,9 \pm 10,4$ e $-34,7 \pm 5,9$ bpm, respectivamente).

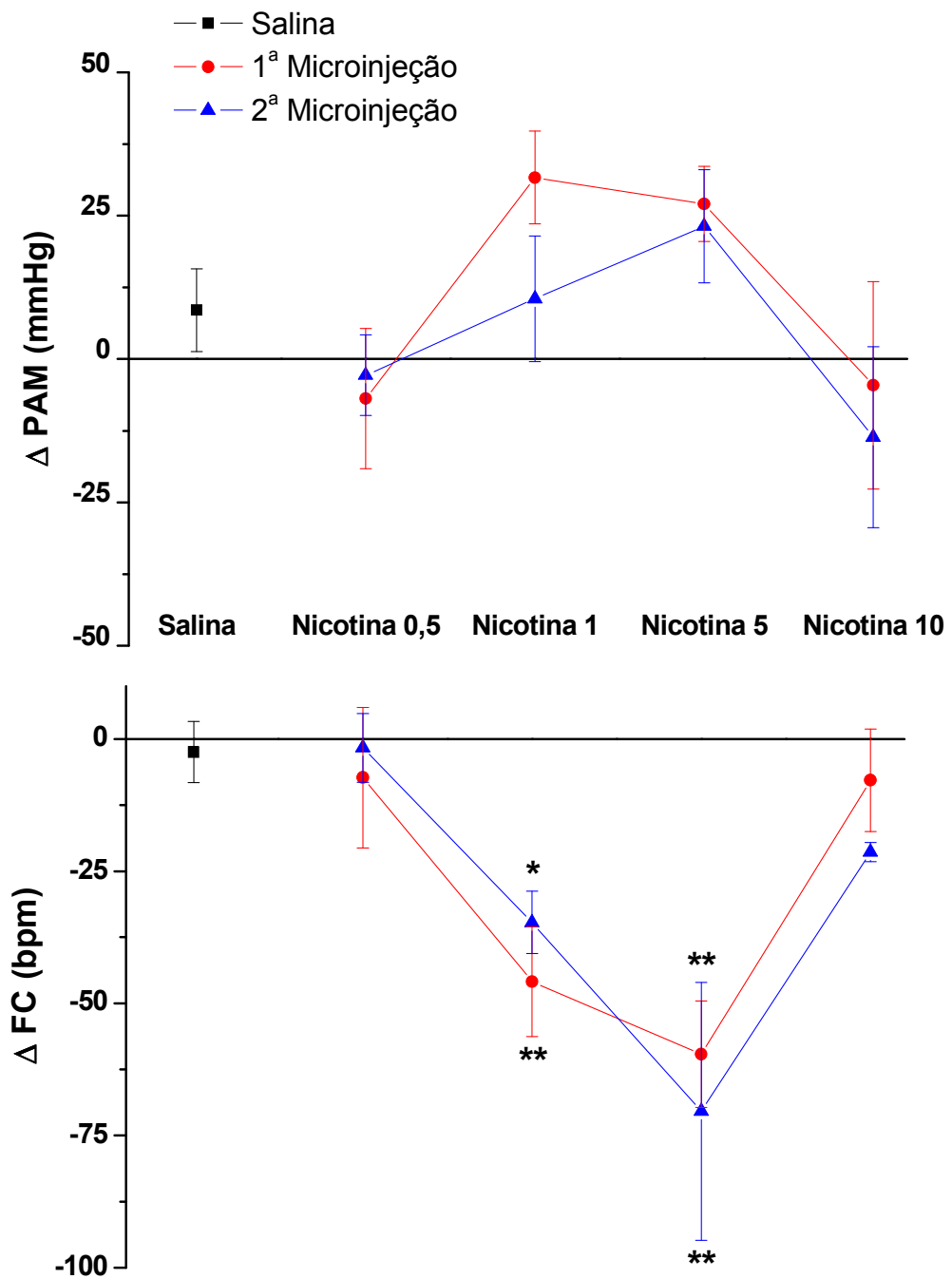


Figura 6 – Alterações da pressão arterial média (Δ PAM) e frequência cardíaca (Δ FC) em respostas às microinjeções unilaterais de nicotina nas doses de 0,5 mM (n=5); 1 mM (n=6); 5 mM (n=7); 10 mM (n=4) no NA. Os dados foram coletados de grupos diferentes. *p<0,05 e **p<0,01 representam diferenças estatísticas em relação ao grupo salina (n=5). ANOVA, medidas repetidas com post hoc de Fisher's LSD.

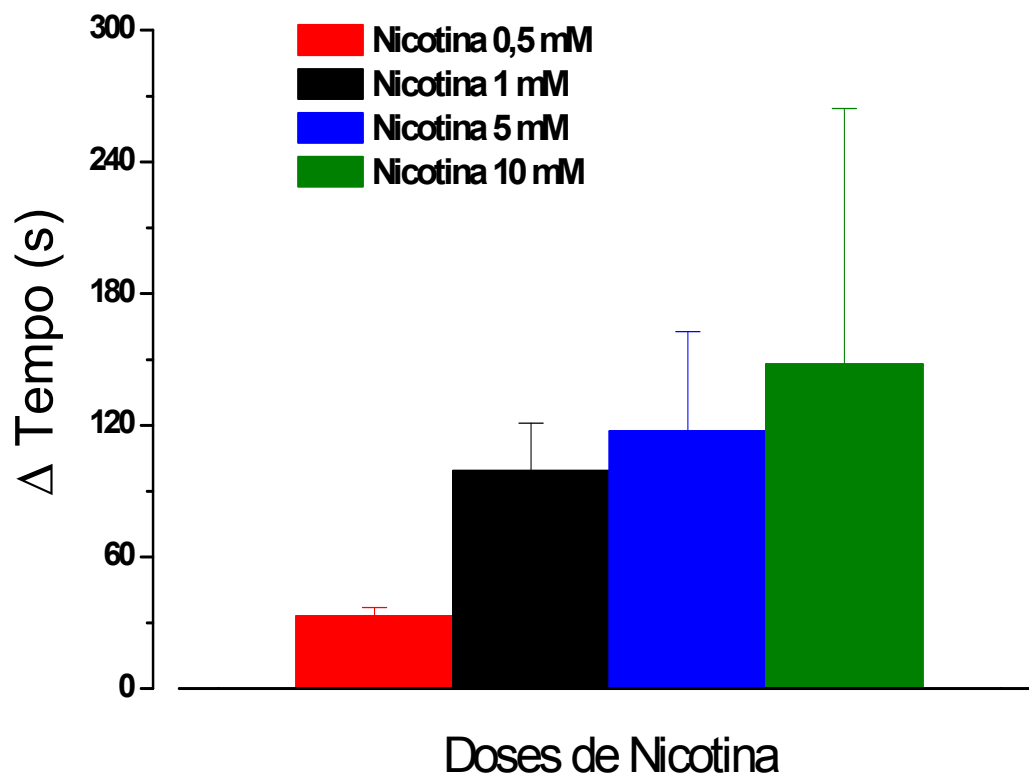


Figura 7 – Duração da bradicardia após microinjeções unilaterais de nicotina nas doses de 0,5 mM (n=5); 1 mM (n=6); 5 mM (n=7); 10 mM (n=4) no NA. Os dados foram coletados de grupos diferentes. ANOVA, medidas repetidas com post hoc de Fisher's LSD.

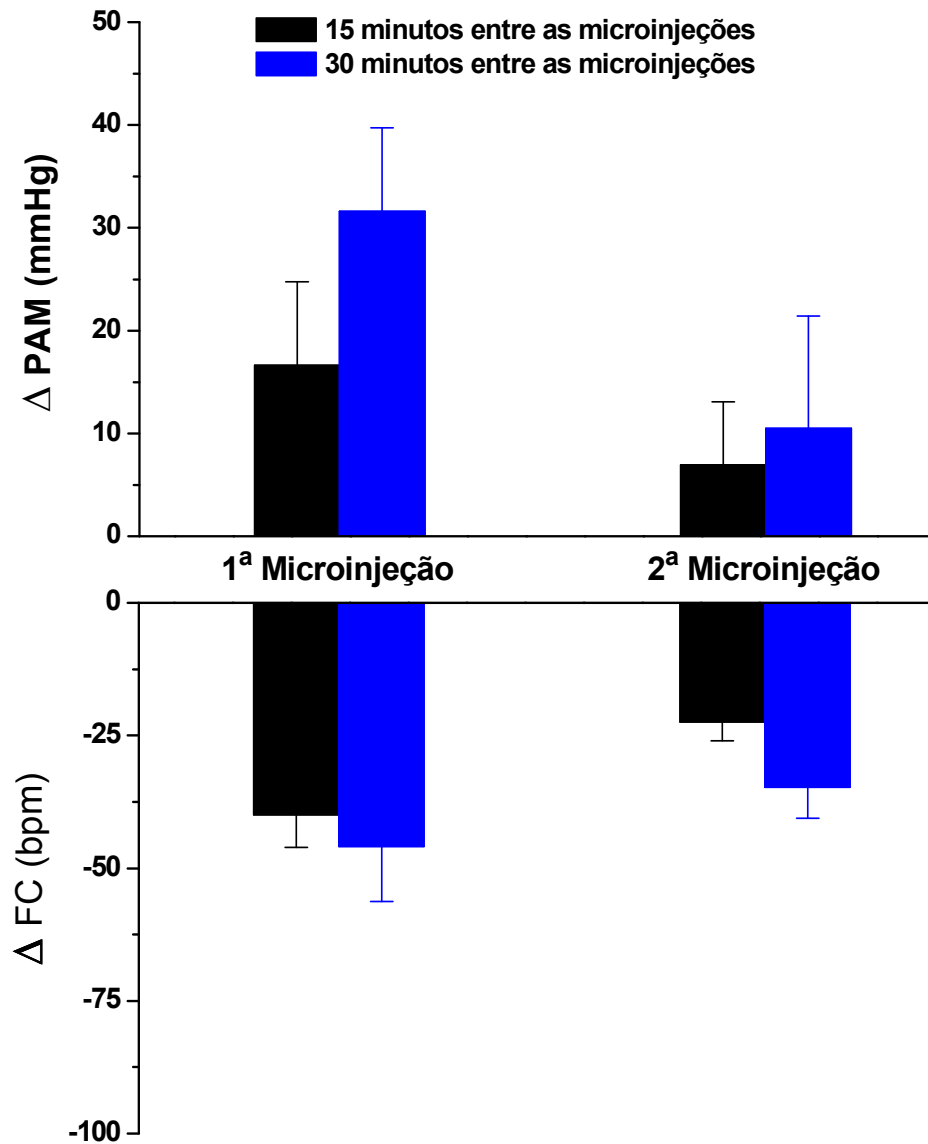


Figura 8 – Alterações de pressão arterial média (Δ PAM) e frequência cardíaca (Δ FC) em resposta às microinjeções unilaterais no NA de nicotina 1 mM em diferentes tempos, 15 (n=10) e 30 minutos (n=6) entre as doses. Os dados foram coletados de grupos diferentes. Teste *t* pareado.

4.3 – EFEITOS DA MICROINJEÇÃO DE NICOTINA SOBRE AS RESPOSTAS CARDIOVASCULARES PROMOVIDAS PELA MICROINJEÇÃO DE L-GLUTAMATO NO NA

Na figura 9, apresentamos as alterações de PAM e FC a 2 microinjeções de L-Glu 5 nmol/50 nL e à microinjeção de L-Glu após a microinjeção de nicotina em diferentes doses (0,5, 1, 5 e 10 mM) e em grupos distintos de animais. As 2 microinjeções iniciais de L-Glu já foram apresentadas anteriormente no ítem 4.1. Inicialmente, podemos observar em relação às repostas pressoras, que após as microinjeções de nicotina, a microinjeção de L-Glu promoveu discretas repostas pressoras. Quando comparada à primeira microinjeção de L-Glu, ocorreu uma diferença estatística nos grupos de nicotina nas doses de 0,5 Mm ($36,2 \pm 16,5^{**}$ vs $-14,3 \pm 20,7$ mmHg, respectivamente. $**p < 0,01$) e 5 mM ($39,9 \pm 3,8^*$ mmHg vs $-4,5 \pm 14,1$ mmHg, respectivamente. $*p < 0,05$). Em relação às repostas de FC, observamos que as microinjeções de L-Glu promoveram repostas bradicárdicas, as quais não foram estatisticamente diferentes após a microinjeção de diferentes doses de nicotina.

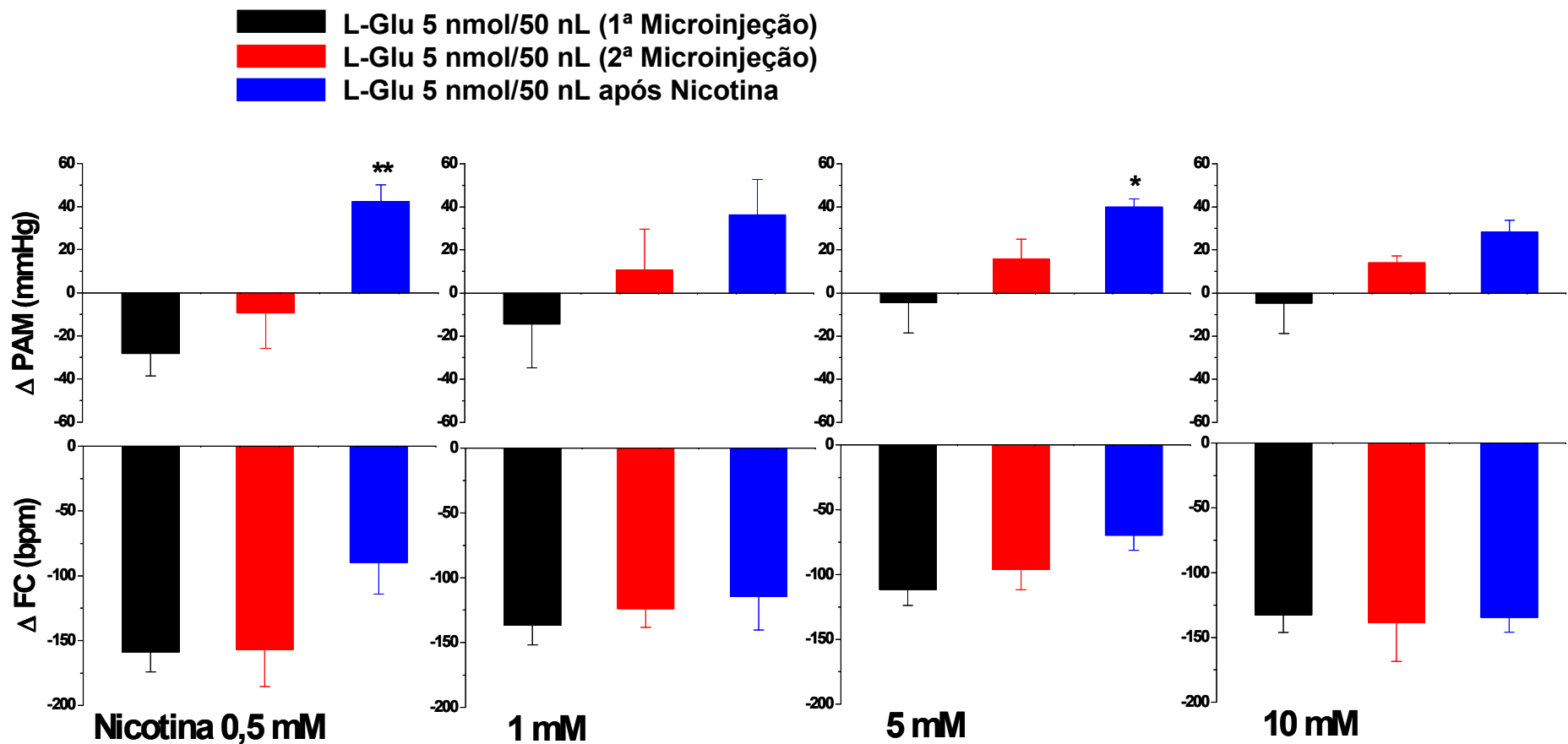


Figura 9 – Alterações de pressão arterial média (Δ PAM) e frequência cardíaca (Δ FC) em resposta às microinjeções de L-Glu (5 nmol/50 nL, n=21) antes a após as diferentes doses de Nicotina (0,5 mM, n=5; 1 mM, n=6; 5 mM, n=7; 10 mM, n=4) no NA. Os dados foram coletados de grupos diferentes. **p<0,01 e *p<0,05 representam diferenças estatísticas em relação à primeira microinjeção de L-Glu. Teste *t* pareado.

4.4 – EFEITOS DA MICROINJEÇÃO DE SALINA NO NA SOBRE AS RESPOSTAS CARDIOVASCULARES INDUZIDAS PELO L-GLUTAMATO E NICOTINA

Na figura 10 podemos observar as alterações de PAM e FC provocadas pelas microinjeções de L-Glu na dose de 5 nmol/50 nL (n=6) antes e após a microinjeção de salina (NaCl 0,9%) no NA. Após a microinjeção de salina, foram realizadas três doses de L-Glu nos tempos de 30, 60 e 90 minutos. Observamos uma inversão das respostas de PAM ($19,6 \pm 6,8^*$, $40 \pm 3,6^{**}$; $34,5 \pm 3,7^{**}$ mmHg, respectivamente. $*p < 0,05$ e $**p < 0,01$) em relação a microinjeção controle de L-Glu ($-10,5 \pm 10,6$ mmHg). Em relação a resposta bradicárdica, não houveram diferenças estatísticas entre as microinjeções de L-Glu aos 30, 60 e 90 minutos ($-160,2 \pm 26,2$; $-148,3 \pm 23,4$; $-155 \pm 34,6$ bpm, respectivamente) quando comparadas com a microinjeção controle de L-Glu ($-145,8 \pm 6,3$ bpm).

A figura 11 mostra as alterações de PAM e FC promovidas pelas microinjeções de nicotina na dose de 5 mM (n=6) antes e após 15, 45 e 75 minutos da microinjeção de salina (NaCl 0,9%) no NA. Observamos que as respostas de pressão arterial antes ($11,5 \pm 10$ mmHg) e após 15, 45 e 75 minutos ($6,6 \pm 7,2$; $4,1 \pm 8,2$; $-3,6 \pm 9,5$ mmHg, respectivamente) a microinjeção de salina não apresentaram diferenças estatísticas. O mesmo foi observado em relação as respostas de FC à microinjeção de nicotina antes ($-54,1 \pm 19$ bpm) e após 15, 45 e 75 minutos ($-69,8 \pm 23,7$; $-49,8 \pm 16,4$; $-59,7 \pm 19,3$ bpm, respectivamente) da microinjeção de salina no NA.

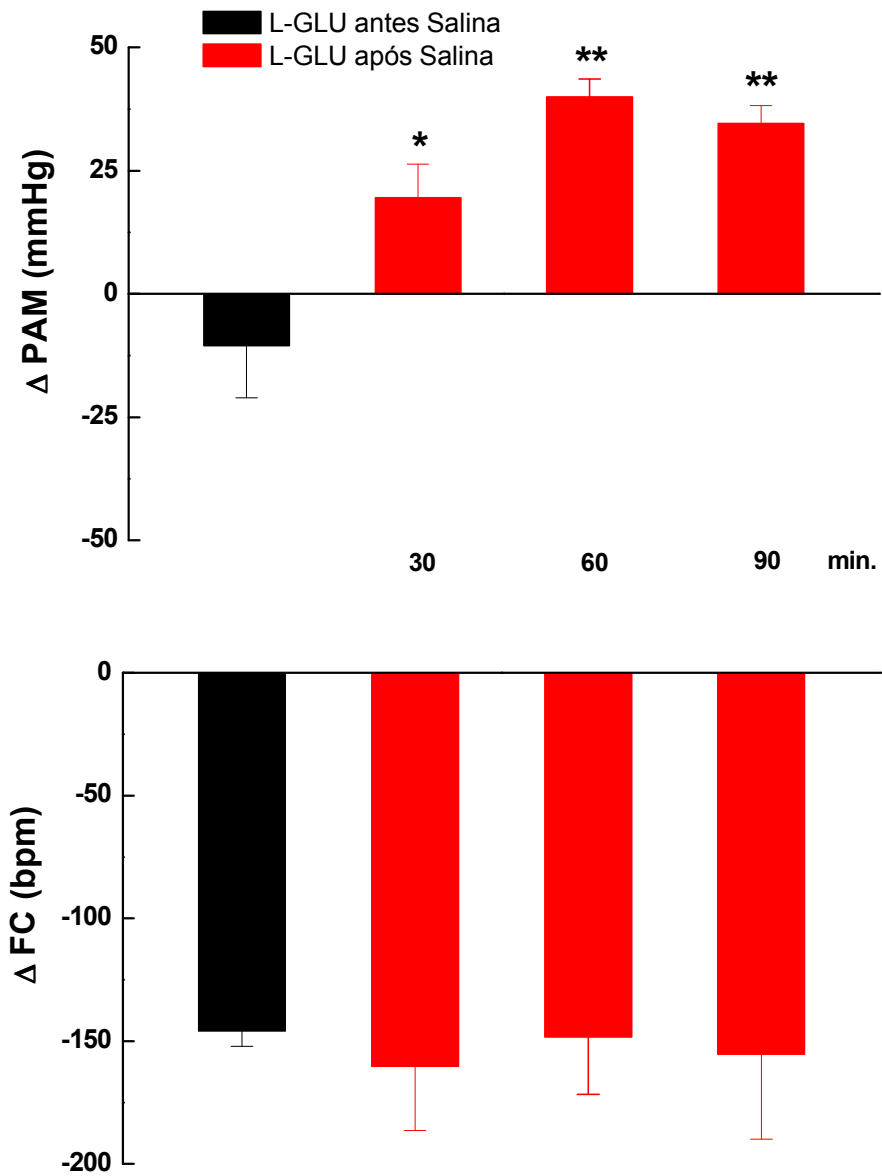


Figura 10 – Alterações de pressão arterial média (Δ PAM) e frequência cardíaca (Δ FC) em resposta às microinjeções unilaterais de L-Glutamato 5 nmol/50 nL (n=6) antes e após 30, 60 e 90 minutos à microinjeção de salina (NaCl 0,9%). *p<0,05 e **p<0,01 representam diferenças estatísticas em relação ao grupo antes da microinjeção de salina. ANOVA, medidas repetidas com post hoc de Dunnett's.

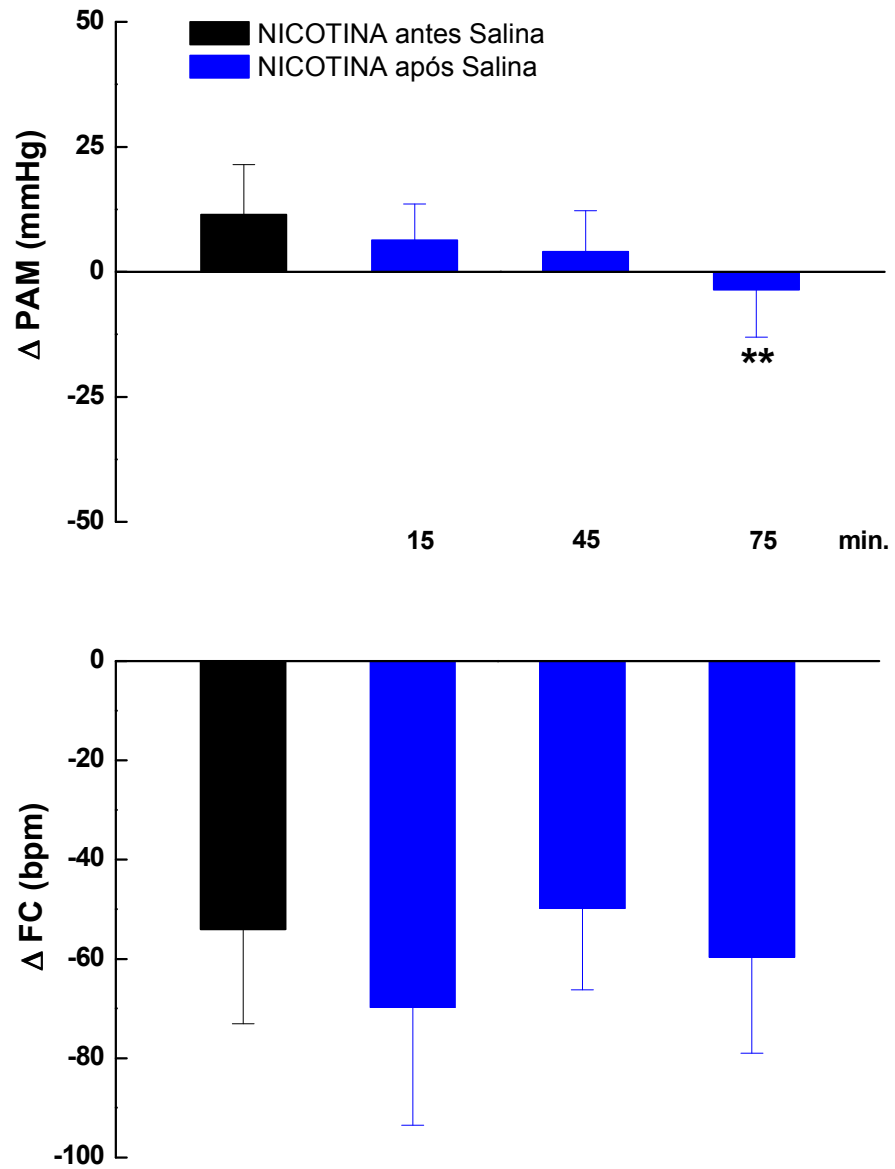


Figura 11 – Alterações de pressão arterial média (Δ PAM) e frequência cardíaca (Δ FC) em resposta às microinjeções de nicotina 5 mM (n=6) antes e após 15, 45 e 75 minutos à microinjeção unilateral de salina (NaCl 0,9%). **p<0,01 representa diferença estatística em relação ao grupo antes da microinjeção de salina. ANOVA, medidas repetidas com post hoc de Dunnett's.

4.5 – EFEITOS DA MICROINJEÇÃO DO ANTAGONISTA NICOTÍNICO DH-β-E SOBRE AS RESPOSTAS CARDIOVASCULARES PROMOVIDAS PELA MICROINJEÇÃO DE GLUTAMATO E NICOTINA NO NA

A figura 12 mostra as alterações de PAM e FC à microinjeção de L-Glu na dose de 5 nmol/50 nL (n=6) antes e 30, 60 e 90 minutos após a microinjeção unilateral do antagonista dos receptores nicotínicos insensíveis à α -bungarotoxina, DH-β-E (100 μ M), no NA. Não houveram diferenças estatísticas quando comparadas as microinjeções de L-Glu de antes e após 30, 60 e 90 min. a microinjeção de DH-β-E, tanto na resposta pressora ($2,8 \pm 7,3$ vs $16,2 \pm 13,1$; $29 \pm 11,1$; $21,5 \pm 5,8$ mmHg, respectivamente) quanto bradicárdica ($-144,8 \pm 23,6$ vs $-144,8 \pm 27$; $-139,2 \pm 34,5$; $-92,5 \pm 31,3$ bpm, respectivamente).

Na figura 13 apresentamos as alterações de PAM e FC promovidas pelas microinjeções de nicotina na dose de 5 mM antes (controle) e 15, 45 e 75 minutos após a microinjeção unilateral de DH-β-E no NA. Podemos observar inicialmente, que não houve diferenças estatísticas nas respostas de PAM antes ($16,6 \pm 8,4$ mmHg) e após a microinjeção de DH-β-E ($-15 \pm 11,1$; $-2,9 \pm 10,2$; $-14,5 \pm 14,8$ mmHg, respectivamente). Em relação à FC, foi observada uma atenuação significativa na resposta bradicárdica à nicotina apenas no tempo de 75 minutos após o bloqueio se comparado a resposta do grupo controle ($-39,8 \pm 11$ vs $-81,8 \pm 10,3$ bpm, respectivamente).

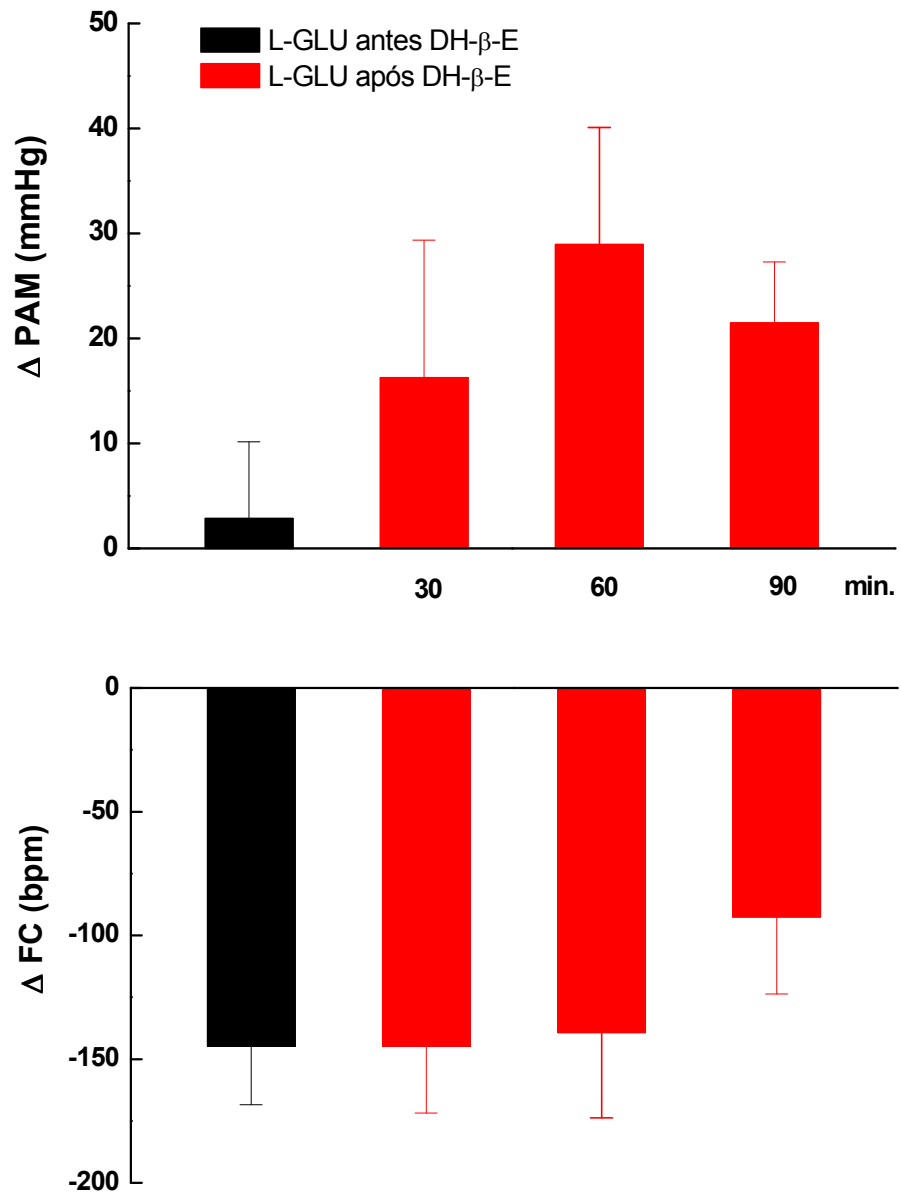


Figura 12 – Alterações de pressão arterial média (Δ PAM) e frequência cardíaca (Δ FC) em resposta às microinjeções de L-Glutamato 5 nmol/50 nL (n=5) antes e após 30, 60 e 90 minutos à microinjeção de DH- β -E (100 μ M) no NA. ANOVA, medidas repetidas com post hoc de Dunnett's.

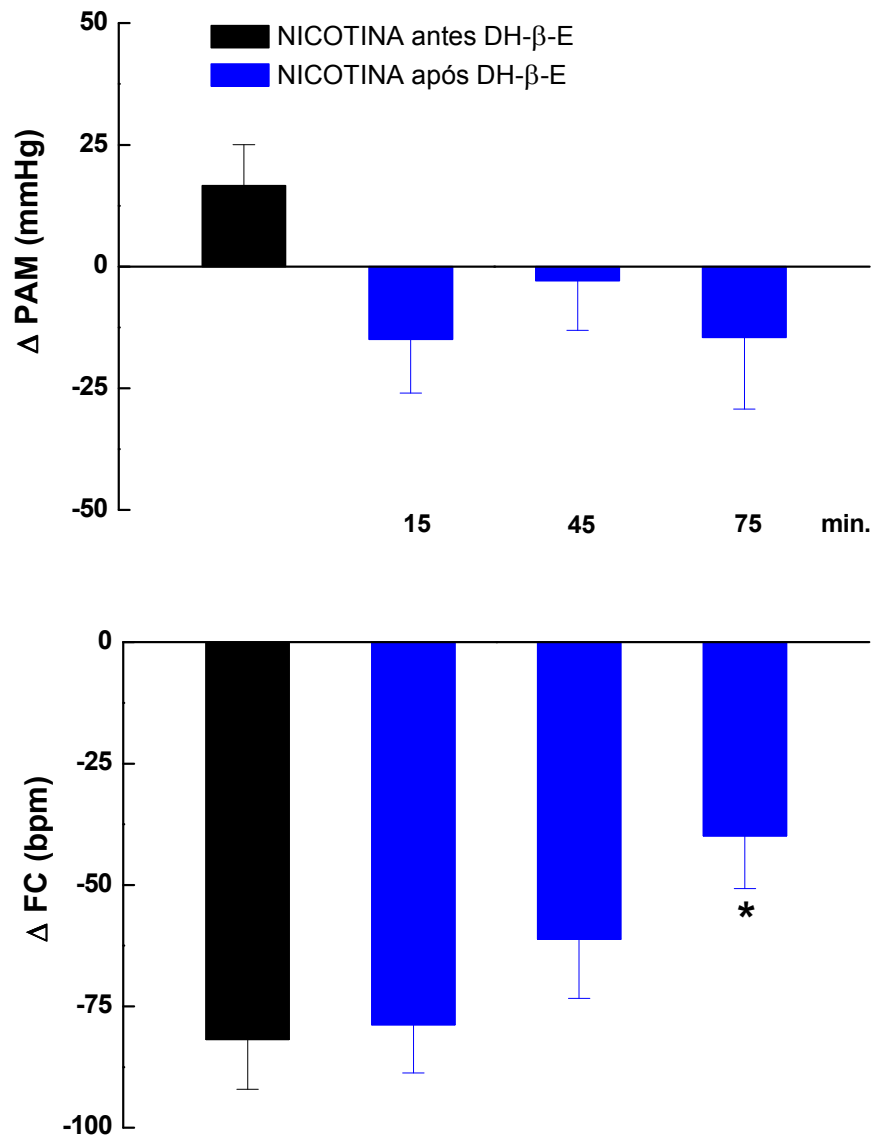


Figura 13 – Alterações de pressão arterial média (Δ PAM) e frequência cardíaca (Δ FC) em resposta às microinjeções unilaterais de nicotina 5 mM (n=5) antes e após 15, 45 e 75 minutos à microinjeção de DH- β -E (100 μ M) no NA. * $p < 0,05$, representa diferença estatística em relação ao grupo antes da microinjeção de DH- β -E. ANOVA, medidas repetidas com post hoc de Dunnett's.

4.6 – EFETIVIDADE DO BLOQUEIO COM α -BUNGAROTOXINA SOBRE AS RESPOSTAS CARDIOVASCULARES PROMOVIDAS PELA MICROINJEÇÃO DE GLUTAMATO E NICOTINA NO NA

Na figura 14 apresentamos as alterações de PAM e FC à microinjeção de L-Glu na dose de 5 nmol/50 nL (n=5) antes e 30, 60 e 90 minutos após a microinjeção de α -bungarotoxina (1 μ M) no NA. Observamos uma inversão da resposta de hipotensora promovida pelo L-Glu antes (-23,7 \pm 15,1 mmHg) se comparada as respostas após o bloqueio (23,4 \pm 9,7*; 25,9 \pm 5,5*; 17,8 \pm 7,9, respectivamente. *p<0,05). Em relação à FC, observamos uma atenuação significativa das respostas bradicárdicas ao L-Glu após 60 minutos (-188 \pm 13,7 vs -72,4 \pm 24* bpm, p<0,05) e 90 minutos do bloqueio (-188 \pm 13,7 vs -71,1 \pm 31,2* bpm, *p<0,05).

A figura 15 apresenta as alterações da PAM e FC promovidas pela microinjeção de nicotina na dose de 5 mM (n=5) antes e 15, 45 e 75 minutos após a microinjeção de α -bungarotoxina (1 μ M) no NA. Podemos observar inicialmente, que a microinjeção de nicotina promoveu resposta pressora (22,9 \pm 10,3 mmHg) que, apesar da grande tendência a atenuação, não foi significativamente atenuada após o bloqueio (2,1 \pm 3,9; 4,6 \pm 3,9; 9,9 \pm 7 mmHg, respectivamente). Em relação a FC, observamos que a resposta bradicárdica foi significativamente atenuada após de 15, 45 e 75 minutos (-9,9 \pm 3,9**; -12,4 \pm 4,7**; -19,2 \pm 8,3** bpm, respectivamente. **p<0,01) do bloqueio se comparada a microinjeção controle de nicotina (-44,3 \pm 6 bpm).

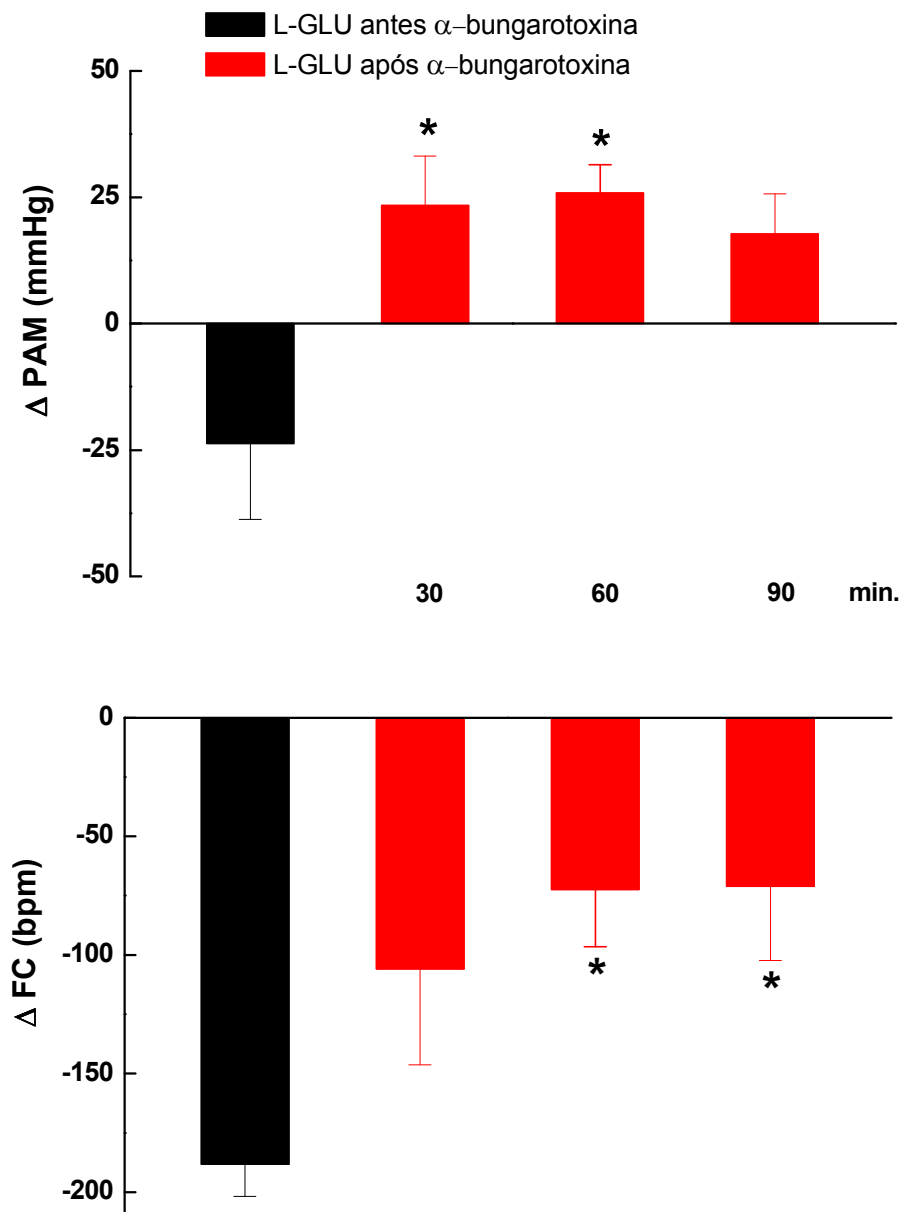


Figura 14 – Alterações de pressão arterial média (Δ PAM) e freqüência cardíaca (Δ FC) em resposta às microinjeções de L-Glutamato 5 nmol/50 nL (n=5) antes e após 30, 60 e 90 minutos à microinjeção de α -bungarotoxina (1 μ M) no NA. * $p < 0,05$ representa diferença estatística em relação ao grupo antes da microinjeção de α -bungarotoxina. ANOVA, medidas repetidas com post hoc de Dunnett's.

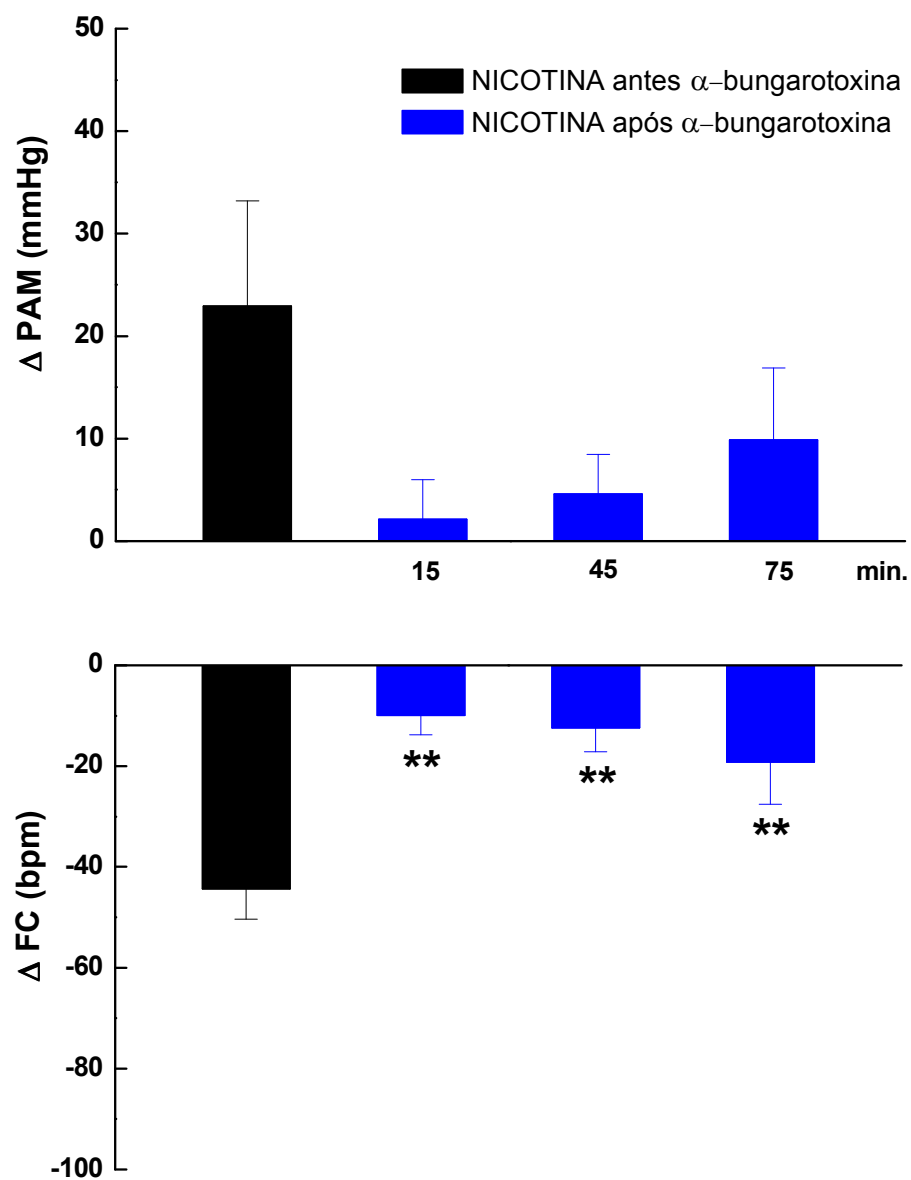


Figura 15 – Alterações de pressão arterial média (Δ PAM) e frequência cardíaca (Δ FC) em resposta às microinjeções de nicotina 5 mM (n=5) antes e após 15, 45 e 75 minutos à microinjeção de α -bungarotoxina (1 μ M) no NA. **p<0,01, representa diferença estatística em relação ao grupo antes da microinjeção de α -bungarotoxina. ANOVA, medidas repetidas com post hoc de Dunnett's.

4.7 – EFEITOS DAS MICROINJEÇÕES DE SALINA E α -BUNGAROTOXINA BILATERALMENTE NO NA SOBRE AS RESPOSTAS PRESSÓRICAS E BRADICÁRDICAS DO BARORREFLEXO INDUZIDA PELA FENILEFRINA

Na figura 16 apresentamos as alterações de PAM e FC em resposta à infusão contínua de fenilefrina na dose de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}/\text{min}$ (IV) antes e 15, 30 e 45 minutos após a microinjeção bilateral de salina (NaCl 0,9%) no NA ($n=4$). Não foram observadas diferenças estatísticas nas respostas pressoras induzida pela fenilefrina antes (56,3 \pm 4,2 mmHg) e após 15, 30 e 45 minutos (52,4 \pm 2,2; 56,9 \pm 3,3; 57,9 \pm 5,3 mmHg, respectivamente) da microinjeção bilateral de salina. O mesmo acontecendo com as respostas bradicárdicas antes (-61,7 \pm 6,8 bpm) e após (-56,8 \pm 7,4; -53,8 \pm 6,8; -68 \pm 15,6 bpm, respectivamente) a microinjeção de salina.

A figura 17 mostra as variações de PAM e FC em resposta à infusão contínua de fenilefrina (50 $\mu\text{g}/\text{mL}/\text{min}$ IV) antes e após 15, 30 e 45 minutos da microinjeção bilateral de α -bungarotoxina (100 μM) no NA ($n=6$). Podemos observar que as respostas pressoras não apresentaram diferenças estatísticas após 15, 30 e 45 minutos (54,7 \pm 3,1; 52,1 \pm 2,8; 55,6 \pm 2,7 mmHg, respectivamente) quando comparadas aos valores anteriores ao bloqueio (57 \pm 1,7 mmHg). Em relação à bradicardia, observamos que esta resposta no tempo de 15 minutos após o bloqueio bilateral com α -bungarotoxina apresentou diferença estatística quando comparada com o controle (-19,7 \pm 2,5* vs -44,6 \pm 3,6 bpm, respectivamente). Esta redução foi de 55,8%.

Na figura 18 apresentamos as regressões lineares do barorreflexo antes (linha preta) e 15, 30 e 45 minutos após o bloqueio com α -bungarotoxina no NA (linha vermelha nos respectivos gráficos). As inclinações destas regressões representam o ganho barorreflexo. Como podemos observar, houve uma atenuação estatisticamente significativa apenas aos 15 minutos após o bloqueio em relação ao controle.

Na tabela 2 apresentamos os valores basais de PAM e FC antes e após o bloqueio bilateral com α -bungarotoxina no NA no grupo onde foi feita a avaliação do barorreflexo. Podemos observar que o bloqueio não promoveu alterações estatisticamente significativas sobre estes parâmetros.

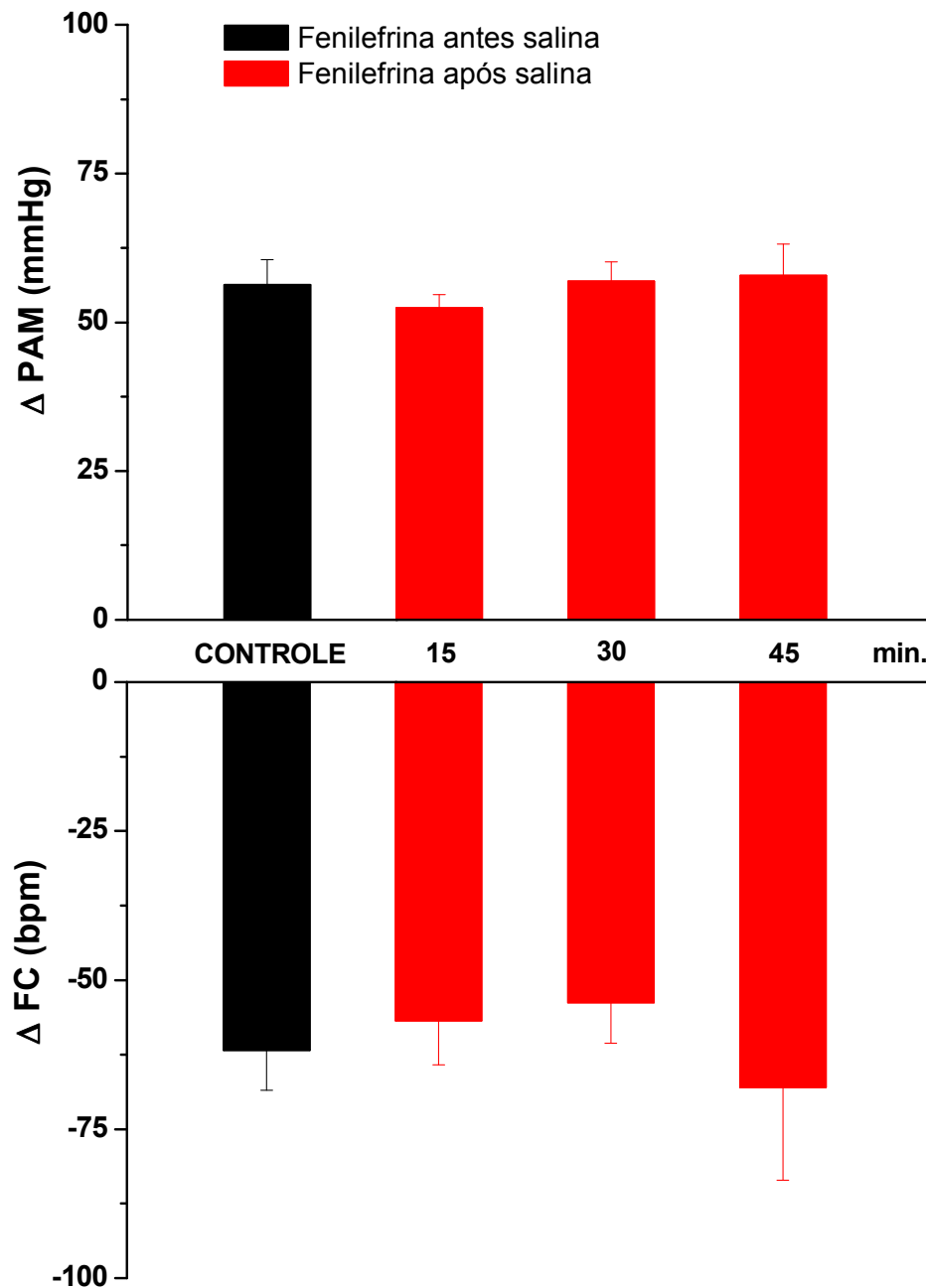


Figura 16 – Alterações de pressão arterial média (Δ PAM) e frequência cardíaca (Δ FC) em resposta à infusão contínua de fenilefrina (50 μ g/mL/min iv) antes e após 15, 30 e 45 minutos à microinjeção bilateral de salina (NaCl 0,9%) no NA (n=4). ANOVA, medidas repetidas com post hoc de Dunnett's.

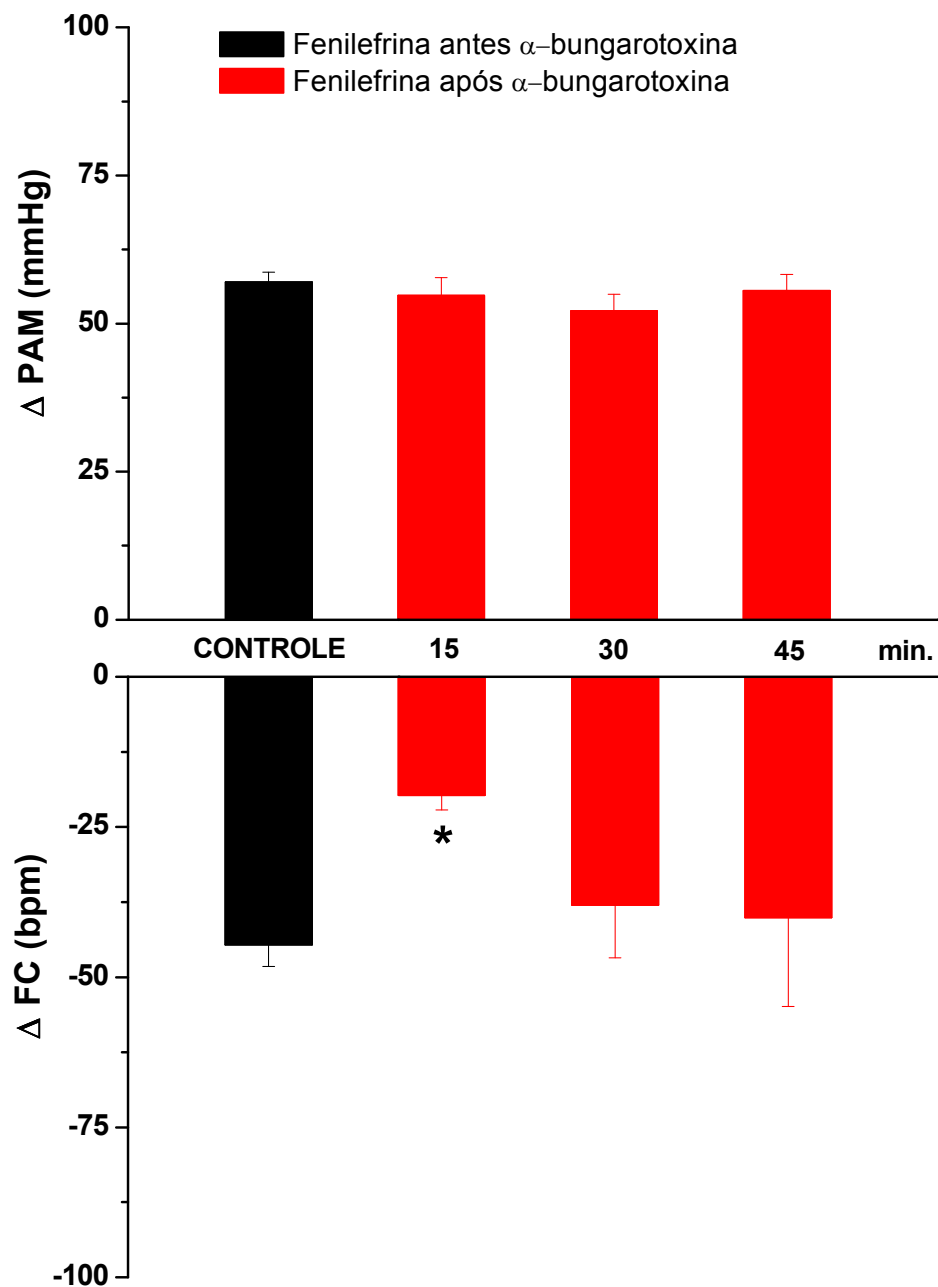


Figura 17 – Alterações de pressão arterial média (Δ PAM) e frequência cardíaca (Δ FC) em resposta à infusão contínua de fenilefrina (50 μ g/mL/min iv) antes e após 15, 30 e 45 minutos à microinjeção bilateral de α -bungarotoxina (1 μ M) no NA (n=6). *p<0,05 representa diferença estatística em relação ao grupo antes da microinjeção de α -bungarotoxina. ANOVA, medidas repetidas com post hoc de Dunnett's.

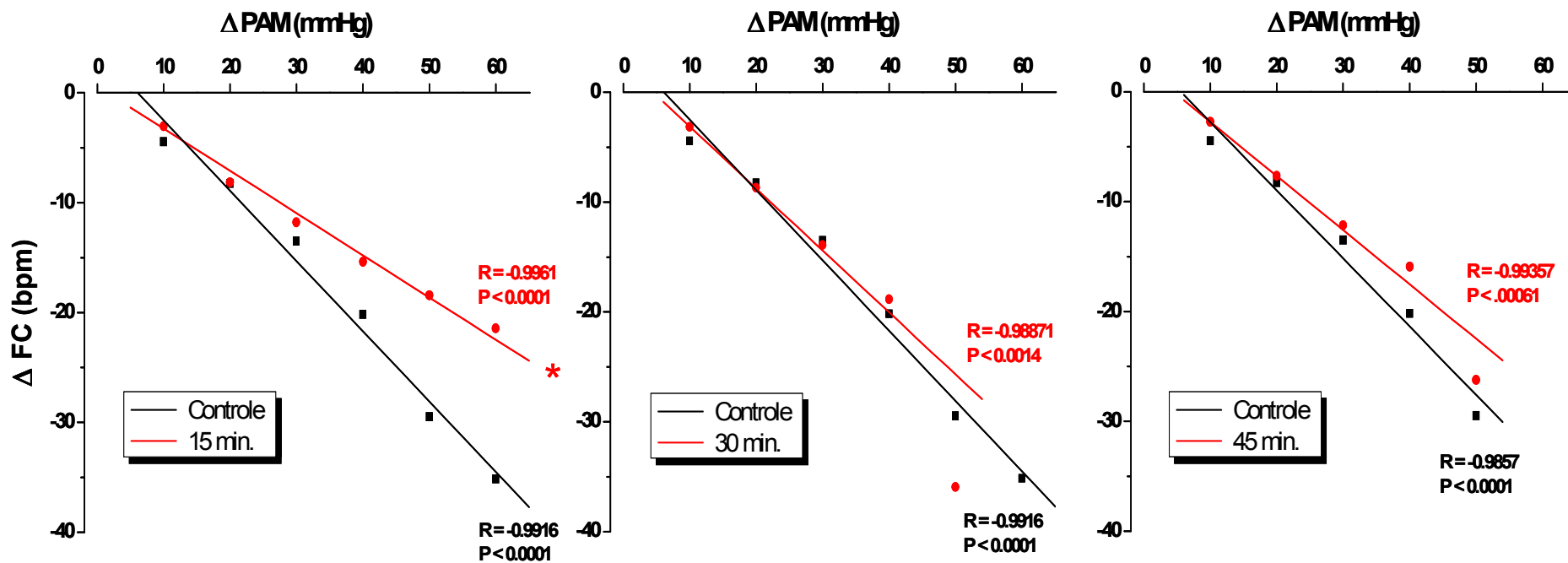


Figura 18 – Alterações de pressão arterial média (ΔPAM) e frequência cardíaca (ΔFC) em resposta à infusão contínua de fenilefrina (50 mg/mL/min IV) antes e após 15, 30 e 45 minutos à microinjeção bilateral de α -bungarotoxina (1 μM) no NA (n=6). * $p < 0,05$ representa diferença estatística em relação ao grupo antes da microinjeção de α -bungarotoxina (controle). ANOVA de 2 vias, medidas repetidas.

Tabela 2 – Valores basais da pressão arterial média e frequência cardíaca antes e após microinjeções de α -bungarotoxina (1 μ M) no NA. Os dados foram coletados de grupos diferentes. **p<0,01 representa diferença estatística em relação ao grupo antes da microinjeção bilateral de α -bungarotoxina.

BLOQUEIO BILATERAL COM α-BUNGAROTOXINA					
Grupos	N	Antes		Após	
		PAM	FC	PAM	FC
Barorreflexo	6	90,7 \pm 5,5	317 \pm 7,0	87,0 \pm 5,9	315,8 \pm 6,6
Reflexo B-J	5	69,4 \pm 6,9	269,4 \pm 8,7	90,0 \pm 7,2	240,8** \pm 10,2

4.8 – EFEITOS DA MICROINJEÇÃO BILATERAL DE SALINA E α -BUNGAROTOXINA NO NA SOBRE AS RESPOSTAS HIPOTENSORAS E BRADICÁRDICAS DO REFLEXO BEZOLD-JARISCH INDUZIDA PELA FENILBIGUANIDA

Na figura 19 mostramos as alterações de PAM e FC em resposta à injeção de fenilbiguanida na dose de 10 μ g/Kg (IV) antes e após 15, 30 e 45 minutos da microinjeção bilateral de salina (NaCl 0,9%) no NA (n=4). Observamos que as respostas hipotensoras antes ($-60 \pm 6,3$ mmHg) e após 15, 30 e 45 minutos ($-61,5 \pm 4,5$; $-57,6 \pm 2,6$; $-51,5 \pm 3,2$ mmHg, respectivamente) da microinjeção de salina não apresentaram alterações estatisticamente significativas. O mesmo ocorrendo com as respostas bradicárdicas quando comparamos o controle ($-109,2 \pm 8,7$ bpm) com as respostas após salina ($-83,5 \pm 17,8$; $-90,2 \pm 19,6$; $-120,8 \pm 24,2$ bpm, respectivamente).

Na figura 20 apresentamos as alterações de PAM e FC promovidas pelas injeções de fenilbiguanida (10 μ g/Kg IV) antes e após 15, 30 e 45 minutos da microinjeção bilateral de α -bungarotoxina (1 μ M) no NA (n=5). A hipotensão causada pela fenilbiguanida antes ($-39,8 \pm 11,2$ mmHg) e após 15, 30 e 45 minutos ($-30,9 \pm 3,5$; $-36,8 \pm 6,2$; $-30,6 \pm 8,1$ mmHg, respectivamente) não apresentaram diferenças estatísticas. Entretanto, em relação a resposta bradicárdica, observamos que no tempo de 15 minutos após o bloqueio esta apresentou uma diferença significativa quando comparada ao controle ($-56,4 \pm 3,7^*$ vs $-117,1 \pm 12,7$ bpm, respectivamente. $*p < 0,05$).

Como pode ser observado acima na tabela 2, a microinjeção bilateral de α -bungarotoxina no NA não promoveu alterações na PAM basal quando comparado ao controle antes do bloqueio. Porém, em relação à FC basal, observamos que esta foi significativamente atenuada.

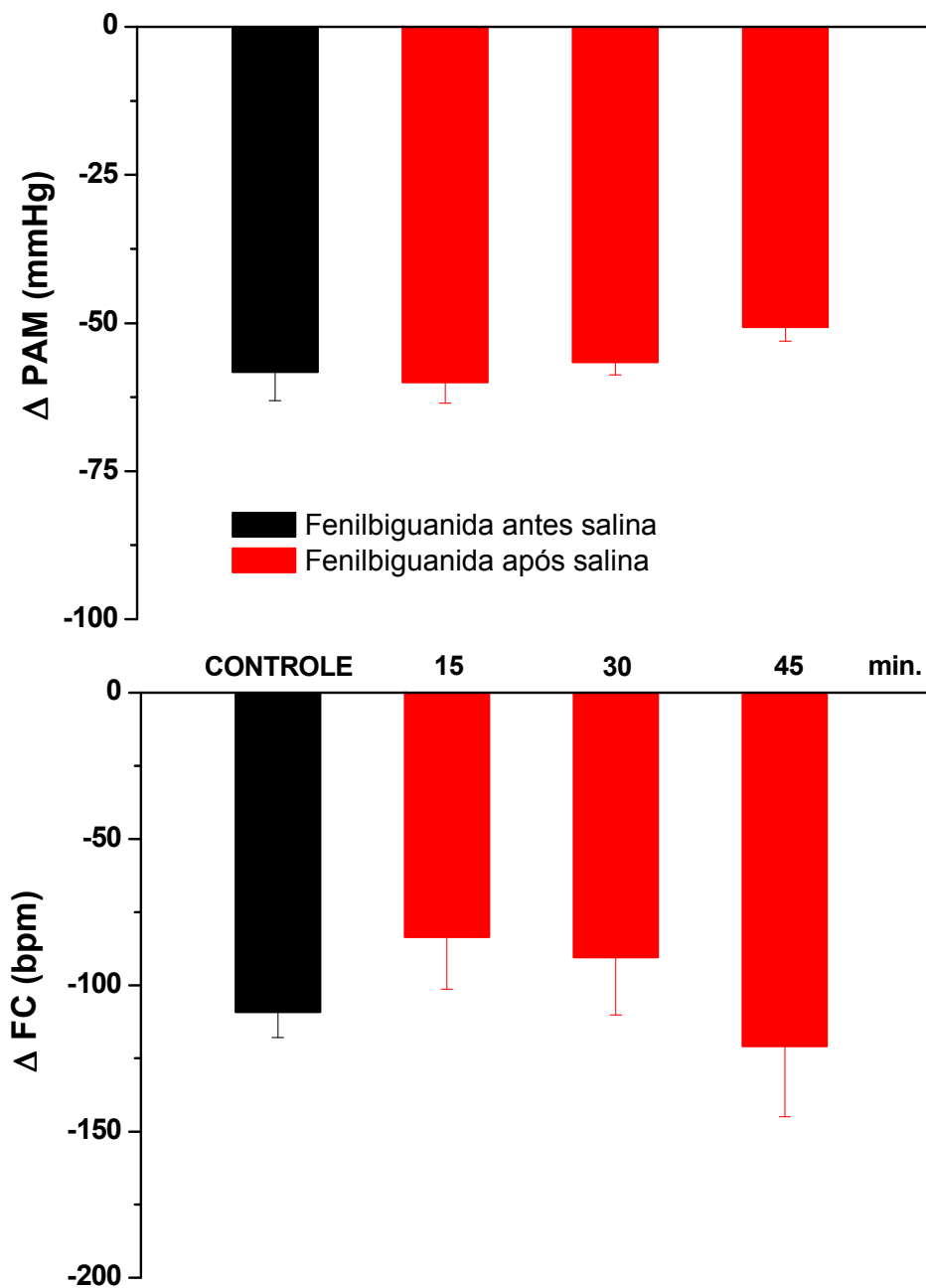


Figura 19 – Alterações de pressão arterial média (Δ PAM) e frequência cardíaca (Δ FC) em resposta à injeção de fenilbiguanida (10 μ g/kg IV) antes e após 15, 30 e 45 minutos à microinjeção bilateral de salina (NaCl 0,9%) no NA (n=4). ANOVA, medidas repetidas com post hoc de Dunnett's.

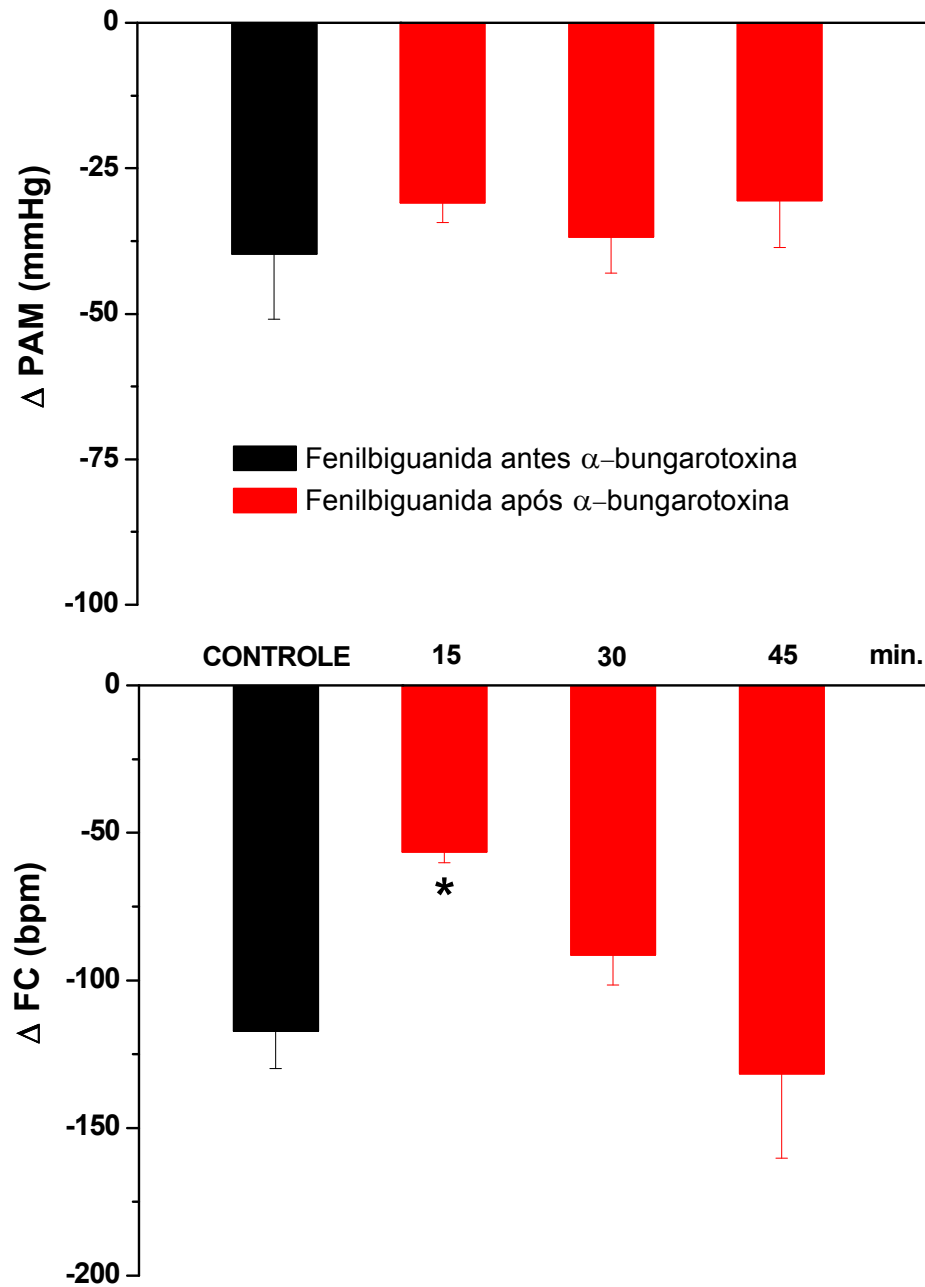


Figura 20 – Alterações de pressão arterial média (Δ PAM) e frequência cardíaca (Δ FC) em resposta à injeção de fenilbiguanida (10 μ g/kg IV) antes e após 15, 30 e 45 minutos à microinjeção bilateral de α -bungarotoxina (1 μ M) no NA (n=5). *p<0,05 representa diferença estatística em relação ao grupo antes da microinjeção bilateral de α -bungarotoxina. ANOVA, medidas repetidas com post hoc de Dunnett's.

4.9 – FOTOMICROGRAFIA E REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA

Na figura 21 apresentamos uma fotomicrografia de uma secção transversal do tronco cerebral de um animal, mostrando um sítio típico de microinjeção no NA. Na mesma figura temos uma representação esquemática do NA, mostrando sua localização em relação ao parâmetro rostro-caudal (-13,8 mm) em relação ao bregma.

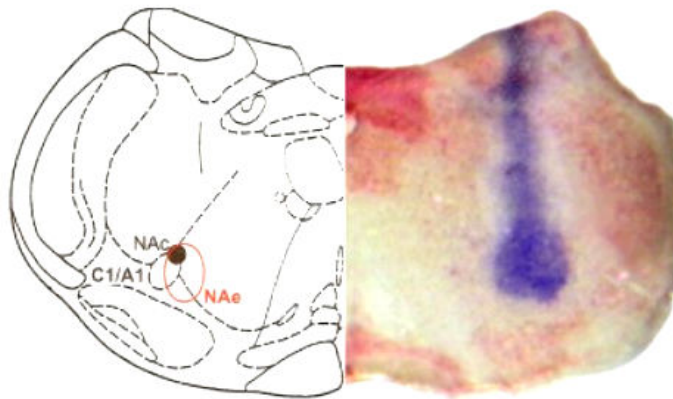


Figura 21 – Lado esquerdo: uma representação esquemática da NA num corte histológico na região -13,8 mm em relação ao bregma. Modificado do Atlas “The Rat Brain” de Paxinos e Watson (1998). Lado direito: fotomicrografia de uma secção transversal do tronco cerebral de um animal, mostrando o sítio da microinjeção no NA. Coloração pelo vermelho neutro e aumento na lente de 30,7x.

Na figura 22 podemos observar uma fotomicrografia de uma secção transversal do tronco cerebral de um animal, mostrando a marcação bilateral do NA com azul de Evans e os respectivos trajetos.

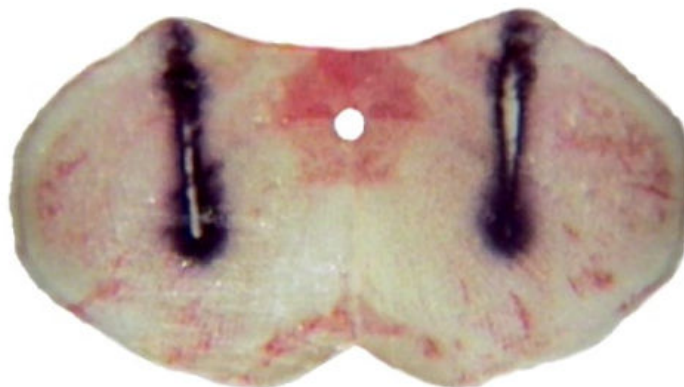


Figura 22 – Fotomicrografia de uma secção transversal do tronco cerebral de um animal, mostrando os sítios das microinjeções nos núcleos ambíguos. Coloração pelo vermelho neutro e aumento na lente de 30,7x.

DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

5.1 – EFEITOS CARDIOVASCULARES DAS MICROINJEÇÕES DE L-GLUTAMATO NO NA

Estudos realizados por Massari et al (1995) mostraram a existência de uma organização cardiotópica no NA em gatos. Respostas cronotrópicas negativas à microinjeção de L-glu foram observadas principalmente ao nível do óbex e +0,5 mm, enquanto que respostas dromotrópicas negativas foram observadas principalmente ao nível +1,0 mm. A possível existência de uma organização cardiotópica em outras espécies, como em ratos, tem sido considerada. Estudos anteriores do nosso laboratório realizados por Brandão (2000) e Amaral et al (2000) mostraram que microinjeções de L-glu na porção caudal e intermediária do NA promovem respostas cronotrópicas negativas consistentes. Utilizando a técnica de tronco cerebral-coração, estudos de Sampaio (2001) corroboram estes achados, onde as respostas cronotrópicas negativas à microinjeção de L-Glu foram observadas principalmente ao nível do óbex e +0,5 mm, enquanto que respostas dromotrópicas negativas foram observadas desde o óbex até +1,0 mm. Estes estudos sugerem que em ratos também existe certa organização dos neurônios cronotrópicos e dromotrópicos ao longo do eixo rostro-caudal do NA, de forma semelhante à dos gatos.

No presente estudo, as microinjeções de L-glu no NA ao nível do óbex, também promoveram respostas bradicárdicas, as quais foram semelhantes em sua magnitude, mesmo quando estas foram repetidas em cada animal. Além disso, a magnitude das bradicardias observadas estão de acordo com estudos de Marchenko & Sapru (2003), que mapearam a área ventrolateral bulbar de ratos, através da microinjeção de L-Glu. Estes autores mostraram que ao nível do NA (+0,4 a +0,8 mm, rostro-caudal), as respostas bradicárdicas à estimulação do NA foram da ordem de 100 a 150 bpm. De acordo com estes resultados, como índice de localização do NA, utilizamos valores de bradicardia ao L-Glu de magnitude maiores que 100 bpm.

Os receptores de aminoácidos excitatórios (RAE) envolvidos na resposta ao L-Glu foi estudado por Amaral et al (2000). Estes autores mostraram que a bradicardia promovida pelo L-Glu foi bloqueada pela microinjeção de ácido kinurênico, um antagonista não seletivo dos RAE, no NA, sugerindo que estes receptores ionotrópicos participam da mediação destas respostas. Por outro lado, as microinjeções de L-Glu no NA promoveram discretas alterações na PAM. Observamos que as primeiras microinjeções de L-Glu promoveram respostas depressoras em todos os grupos de nicotina. Porém, na segunda microinjeção, algumas destas respostas foram invertidas para resposta pressora. Em outros estudos, também não foram observadas significativas alterações na PAM (Brandão, 2000; Amaral et al, 2000; Secondi, 2004). No mapeamento das respostas cardiovasculares ao L-Glu realizado por Marchenko & Sapru (2003) também foram observadas discretas alterações na PAM, tanto respostas pressoras como hipotensoras, semelhantes às observadas neste estudo, ao longo do eixo rostro-caudal do NA. Em uma primeira análise, poderíamos supor que as discretas respostas hipotensoras seriam decorrentes da bradicardia que ocorre concomitantemente. Entretanto, os estudos realizados por Marchenko & Sapru (2003) mostraram que o sítio do NA que promoveu maior bradicardia também foi acompanhado por uma discreta resposta pressora. Uma hipótese para explicarmos estas discretas respostas pressoras, seria a ativação do núcleo tegumentar lateral (LTF), situado dorsalmente ao NA, cuja estimulação com L-Glu promove respostas pressoras. Desta forma, um possível espraiamento de L-Glu para este núcleo poderia estar promovendo a resposta pressora observada. Ainda nos estudos de Marchenko & Sapru (2003), a maior resposta pressora foi observada ao nível +0,6 mm do NA, que está próximo do sítio do NA que fizemos as microinjeções deste estudo. Além disso, as respostas pressoras encontradas na maioria das segundas microinjeções de L-Glu poderiam ter sido ocasionadas por um efeito do volume da microinjeção anterior. Ou seja, na segunda microinjeção, este volume tenderia a ser acomodado no tecido neuronal em uma área maior, o que poderia atingir o LTF.

5.2 – EFEITOS CARDIOVASCULARES DAS MICROINJEÇÕES DE NICOTINA NO NA

Os receptores nicotínicos estão presentes em várias regiões do SNC, tais como, hipocampo, córtex cerebral, tálamo, hipotálamo, colículo superior e tronco cerebral. Os receptores de nicotina são ativados por baixas concentrações de nicotina. Altas concentrações bloqueiam estes receptores (Halbach & Dermietzel, 2002).

Não existem trabalhos na literatura que mostrem os efeitos da microinjeção de nicotina no NA, porém em outros núcleos, como o NTS e CVLM, foram observadas respostas hipotensoras e bradicárdicas (Dhar et al, 2000; Aberger et al, 2001). Estes resultados indicam a presença destes receptores ao nível do NTS e CVLM, entretanto, os seus papéis funcionais nos mecanismos de regulação da PA permanecem por serem estabelecidos.

Neste estudo, observamos que as respostas cardiovasculares às microinjeções de nicotina no NA variaram significativamente, conforme a dose administrada. As menores doses de nicotina (0,5, 1 e 5 mM) promoveram respostas bradicárdicas de forma dose-dependente, enquanto que na maior dose (10 mM) esta resposta foi muito discreta.

Em contraste com os receptores muscarínicos, que quando ativados envolvem participação de segundos-mensageiros intracelulares, a estimulação dos receptores nicotínicos em baixas doses resultam na abertura de canais iônicos. Conseqüentemente, ocorre o influxo de íons resultando na despolarização no neurônio. Tem sido demonstrado que os receptores nicotínicos presentes nas junções neuromusculares e nos gânglios autonômicos, quando despolarizados, apresentam influxo de Na^+ , enquanto aqueles receptores nicotínicos que possuem a subunidade $\alpha 7$ permeiam o Ca^{++} (Halbach & Dermietzel, 2002). Desta forma, as respostas bradicárdicas à nicotina observada no presente estudo poderiam ser devido a ativação de receptores nicotínicos presentes no corpo celular dos neurônios pré-ganglionares presentes no NA. Além disso, em face do bloqueio observado pela α -bungarotoxina, que é um antagonista das subunidades nicotínicas $\alpha 7$, estes seriam os receptores que estariam mediando estas bradicardias.

Em relação ao efeito bloqueador da nicotina, a habilidade do receptor nicotínico em induzir dessensibilização foi demonstrada pela primeira vez há 50 anos atrás em junções neuromusculares (Katz & Thesleff, 1957). Outros estudos também observaram esta dessensibilização em receptores nicotínicos cerebrais (Marks et al, 1983; Ochoa et al, 1989; Robinson et al, 2006). Conforme Ochoa et al (1989) a nicotina pode agir como um “antagonista funcional”, isto é, liga-se ao sítio ligante do receptor, abre o canal iônico permitindo o influxo de cátions pela membrana pós-sináptica, e em seguida, permanece ligado ao receptor, enquanto que a membrana se repolariza, causando o seu bloqueio. Alguns autores consideram este bloqueio como sendo um “estado de dessensibilização” dos receptores nicotínicos.

O efeito da nicotina neste estudo também foi avaliado pela duração da resposta e pelos efeitos cardiovasculares promovidos pela repetição das microinjeções em diferentes intervalos de tempo (taquifilaxia). Em relação à duração da resposta, observamos que houve uma relação tempo-dependente, isto é, maior duração nas maiores doses. Isto poderia ser um efeito das maiores concentrações de nicotina, que estimulariam tanto uma quantidade maior de neurônios, quanto estes por mais tempo. Já na dose de 10 mM, os discretos efeitos excitatórios observados, isto é, a discreta bradicardia, as quais duraram um tempo maior que as demais doses de nicotina, poderia ser decorrente de um possível efeito facilitador da nicotina sobre a liberação de L-Glu ao nível pré-sináptico (Neff et al, 1998b; Wang et al, 2001a) (Este aspecto será discutido em detalhes adiante).

A taquifilaxia, por sua vez, foi avaliada pela microinjeção de nicotina em duplicata, em intervalos de tempo de 15 e 30 min. Não observamos alterações estatisticamente significativas entre as bradicardias à nicotina nos dois intervalos de tempo, embora no intervalo de tempo menor, tenha sido observada uma maior tendência à atenuação (45%). A atenuação no intervalo de 30 min. foi de 24%. Isto sugere que as microinjeções de nicotina na dose de 1 mM não promove a dessensibilização dos receptores nicotínicos do NA. Contudo, o intervalo de tempo adotado neste estudo para as microinjeções sucessivas de nicotina não foi menor que 30 minutos.

As doses de nicotina utilizadas neste estudo foram baseadas em estudos anteriores de Aberger et al (2001), que microinjetaram nicotina no CVLM, nas doses de 250 μ M a 10 mM, sendo que as doses que autores estes obtiveram maiores respostas foram as de 1 e 5 mM.

5.3 – EFEITOS DA MICROINJEÇÃO DE NICOTINA SOBRE AS RESPOSTAS CARDIOVASCULARES PROMOVIDAS PELA MICROINJEÇÃO DE L-GLUTAMATO NO NA

A interação entre os receptores nicotínicos e outros receptores tem sido estudada por vários autores (Neff et al, 1998b; Wang et al, 2001a; Huang et al, 2004). Halbach & Dermiezel (2002) tem relatado em seus estudos que a ativação dos receptores nicotínicos pode facilitar a liberação de vários outros neurotransmissores no SNC, dentre eles o Glutamato, a Serotonina, o GABA e a Dopamina. Além disso, via autoreceptores nicotínicos, aumentariam inclusive a liberação da própria acetilcolina. Um dos mecanismos propostos seria que a acetilcolina promoveria a liberação de Dopamina, Glutamato e Serotonina através da ativação de receptores nicotínicos. Para tanto, tem sido evidenciado a presença de receptores nicotínicos pré-sinápticos localizados no Hipocampo (noradrenalina, GABA e serotonina), núcleo estriado e núcleo acumbens (dopamina) e NA (receptores de aminoácidos excitatórios)(Neff et al, 1998; Wang et al, 2001a; Huang et al, 2004).

Neste estudo avaliamos as respostas cardiovasculares promovidas pelo L-Glu antes e após a microinjeção de diferentes doses de nicotina no NA. Não foram observadas alterações significativas nas respostas bradicárdicas ao L-Glu nas doses de nicotina utilizadas. Uma hipótese para explicar estes achados seria o fato de que o tempo decorrido entre as duas microinjeções, isto é de L-Glu e nicotina, foi muito elevado. No entanto, em relação às respostas de PA, observamos inversão das respostas (de hipotensão para hipertensão) e resposta pressora mais acentuada após a microinjeção de nicotina.

As respostas promovidas pelo L-Glu também foram avaliadas antes e após o bloqueio seletivo dos receptores nicotínicos insensíveis à α -bungarotoxina com DH- β -E e das subunidades $\alpha 7$ com α -Bungarotoxina. Observamos que as respostas pressora e bradicárdica do L-Glu não foram significativamente alteradas após o bloqueio com DH- β -E, porém, após o bloqueio com α -Bungarotoxina, a resposta hipotensora foi invertida, enquanto que a bradicardia foi atenuada significativamente. Estes resultados sugerem que os receptores nicotínicos $\alpha 7$ podem desempenhar um importante papel neuromodulador das respostas induzidas pelo L-Glu. Parte desta

atenuação poderia ser decorrente da perda do mecanismo facilitador pré-sináptico, e parte seria decorrente da perda deste mecanismo ao nível pós-sináptico. Contudo, não pode ser descartado o fato da α -bungarotoxina ter causado estes efeitos devido ao bloqueio de estruturas adjacentes ao NA, como por exemplo, o LTF. Esta proposição deve-se ao fato de que as respostas pressoras ao L-Glu foram mais pronunciadas após o bloqueio, provavelmente devido a um aumento da atividade eferente simpática, que sobre o coração competiria com a bradicardia promovida pela ativação do NA, causando uma bradicardia menor ou atenuada. No entanto, estas mesmas hipóteses não poderiam ser sugeridas em relação ao bloqueio dos receptores nicotínicos $\alpha 4\beta 2$, uma vez que as respostas ao L-Glu não foram significativamente atenuadas. Poderia ser considerada, entretanto, a utilização de uma dose maior deste antagonista, desde que não implique na perda de seletividade do bloqueio destes receptores. Estudos de Alkondon & Albuquerque (1993) utilizando técnicas eletrofisiológicas de registro neuronal mostraram que doses acima de 100 μ M de DH- β -E bloqueia todos receptores nicotínicos.

5.4 - EFEITOS CARDIOVASCULARES DO BLOQUEIO DOS RECEPTORES NICOTÍNICOS INSENSÍVEIS À α -BUNGAROTOXINA COM DH- β -E NO NA

Os receptores nicotínicos insensíveis à α -bungarotoxina no SNC são formados por diferentes subunidades: $\alpha 4\beta 2$, $\alpha 3\beta 4$ e $\alpha 6\beta 2\beta 3$. Estes receptores possuem propriedades farmacológicas distintas e apresentam afinidades com os seguintes agonistas: citizina > nicotina > ACh > dimetil-fenil-piperizinium. (Decker et al, 1995; Changeux et al, 1998). As subunidades $\alpha 4\beta 2$ predominam no SNC (Damaj et al, 1999).

Os antagonistas competitivos destes receptores são: Dihidro- β -Eritroidina (DH- β -E), um alcalóide isolado da semente da erythrina, mecamilamina e α -conotoxina (Decker et al, 1995; Buisson & Bertrand, 2002; Apêndice I).

Estudos farmacológicos têm indicado que o tratamento crônico tanto com DH- β -E como com d-tubocurarina e metillicaconitina leva a um *up-regulation* dos receptores nicotínicos $\alpha 4\beta 2$ (Gopalakrishnan et al, 1997), cujos efeitos também foram observados com ácido kinurênico (Hilmas et al, 2001). Este aumento da expressão pode ser afetado por múltiplos fatores, como por exemplo, a exposição crônica de nicotina em animais ou em humanos fumantes (Huang et al, 2004; Dehkordi et al, 2006). Com isso, observa-se um aumento da resposta deste receptor para um determinado agonista (Matsubayashi et al, 2004; Dehkordi et al, 2006).

Esta resposta dos receptores e seus respectivos fatores desencadeantes têm apresentado um importante significado clínico, como por exemplo, o envolvimento destes receptores na mediação de arritmias cardiorrespiratórias e incidência da Síndrome da Morte Súbita do Recém-Nascido (SMSRN). Neste último caso, tem sido mostrado por alguns autores que a exposição pré-natal com nicotina é um dos fatores determinantes para o aumento dos fatores de risco (Taylor & Sanderson, 1995; Huang et al, 2004). Ainda em relação a SMSRN, estudos de Neff et al (2003) mostraram que a exposição pré-natal de nicotina aumenta a inibição dos neurônios cardíacos vagais. O mecanismo sugerido seria uma possível modulação da neurotransmissão GABAérgica causada pela nicotina. Isto poderia explicar FC

aumentada observada em vítimas de SMSRN, que seria uma das causas mortis desta doença.

Em estudos experimentais, tem sido mostrado que microinjeções de DH- β -E no CVLM não atenuou as respostas do L-Glu (Aberger, 2001). Além disso, o bloqueio bilateral de outras subunidades de receptores nicotínicos insensíveis à α -bungarotoxina com mecamilamina no NTS também não alterou os valores de FC e PAM basal, sugerindo que estes receptores não estariam envolvidos na regulação tônica destas variáveis neste núcleo (Dhar et al, 2000). No presente estudo não foi realizado o bloqueio bilateral com DH- β -E no NA para avaliarmos o papel tônico destes receptores, porém foi avaliada a resposta da nicotina antes e após a microinjeção unilateral deste antagonista no NA. Observamos que não houve alterações significativas das respostas bradicárdicas induzidas pela nicotina até 45 min. após o bloqueio. Se considerarmos que as subunidades $\alpha 4\beta 2$ dos receptores nicotínicos insensíveis à α -bungarotoxina no SNC predominam em relação as outras subunidades, estes resultados poderiam sugerir que estes receptores não participam da modulação das respostas de PA e FC ao nível do NA. A realização de experimentos adicionais com uma dose maior de DH- β -E deve ser considerada, desde que não seja afetada a seletividade do bloqueio dos receptores nicotínicos. Como mencionado acima, estudos de Alkondon & Albuquerque (1993) mostraram que doses acima de 100 μ M de DH- β -E bloqueia todos receptores nicotínicos insensíveis à α -bungarotoxina. Desta forma, estudos adicionais se fazem necessários, inclusive com outros antagonistas seletivos.

Estudos anteriores realizados por Damaj et al (1997) em camundongos estudaram a efetividade de alguns antagonistas da subunidade $\alpha 4\beta 2$ dos receptores nicotínicos em antagonizar os efeitos de crises convulsivas clônicas induzidas por nicotina e outros agonistas envolvendo estes receptores. Estes autores também relatam à dificuldade de bloquear estas subunidades e, conseqüentemente, estas crises utilizando doses de até 5 mg/kg de DH- β -E.

5.5 – EFETIVIDADE DO BLOQUEIO DAS SUBUNIDADES $\alpha 7$ DOS RECEPTORES NICOTÍNICOS PELA α -BUNGAROTOXINA NO NA

Os receptores nicotínicos sensíveis à α -bungarotoxina presentes no SNC e Sistema Nervoso Autônomo (SNA) são formados pelas seguintes subunidades: $\alpha 7$, $\alpha 8$, $\alpha 7\alpha 8$, $\alpha 9$ e $\alpha 9\alpha 10$, havendo predominância para os receptores formados pelas subunidades $\alpha 7$. Alguns autores têm mostrado certa afinidade para os seguintes agonista: nicotina > citizina > dimetil-fenyl-piperizinium (DMPP) > ACh (Decker et al, 1995; Changeux et al, 1998).

O antagonismo das subunidades $\alpha 7$ dos receptores nicotínicos tem sido relacionado com algumas toxinas, tal como a α -bungarotoxina isolada do veneno da cobra *Bungarus multicinctus*. Antes da disponibilidade destas toxinas, várias substâncias químicas eram utilizadas como bloqueadores destes receptores, como a mecamilamina, que atualmente sabemos ser um antagonista mais seletivo para os receptores nicotínicos insensíveis à α -bungarotoxina (Cachelin & Rust, 1995; Dhar et al, 2000). Outros antagonistas bloqueiam estes receptores, tais como a metillicaconitina. (ver Apêndice I).

Em estudos experimentais, o bloqueio combinado de receptores sensíveis e insensíveis à α -bungarotoxina no NTS e no CVLM não atenuaram as respostas (bradicardia e hipotensão) para o L-Glu (Dhar et al, 2000; Aberger et al, 2001). Estes resultados diferem dos observados neste estudo, os quais mostraram uma significativa atenuação das respostas bradicárdicas e hipotensora ao L-Glu microinjetado no NA após o bloqueio com α -bungarotoxina. Em relação as respostas cardiovasculares promovidas pela nicotina no NA, isto é, resposta pressora e bradicardia, o bloqueio com α -bungarotoxina atenuou significativamente a resposta bradicárdica. Estes resultados indicam que as subunidades $\alpha 7$ dos receptores nicotínicos participam da neuromodulação do componente cárdio-vagal ao nível do NA.

Uma hipótese para explicar este efeito neuromodulador dos receptores nicotínicos seria a existência de um mecanismo facilitador sobre a neurotransmissão

glutamatérgica, tanto em neurônios pré- como pós-sinápticos, conforme ilustrado na figura abaixo (Figura 23).

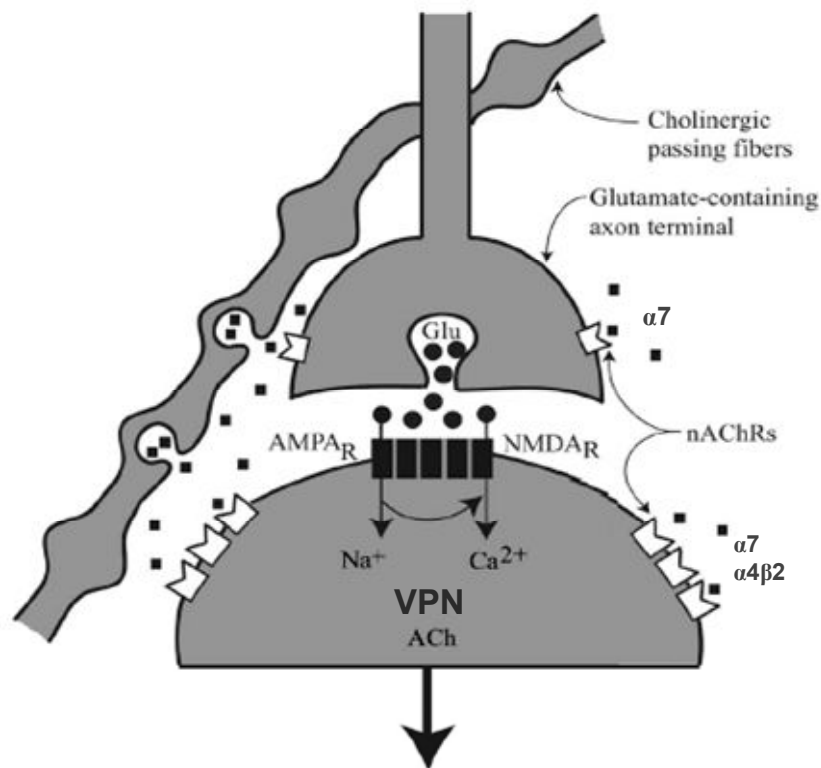


Figura 23 – Esquema representativo do mecanismo facilitador envolvendo os receptores colinérgicos nicotínicos (nAChRs) em neurônios glutamatérgicos e neurônios pré-ganglionares vagais no NA (Modificado de Dehkordi et al, 2006).

Segundo estudos de Dehkordi et al (2006), substâncias endógenas e exógenas podem ativar receptores nicotínicos neuronais presentes nos neurônios do NA e/ou localizados nos terminais dos axônios glutamatérgicos. Esta ativação resultaria na despolarização neuronal (ação pós-sináptica) e/ou ativação de receptores pré-sinápticos facilitando a neurotransmissão excitatória. Pré-sinápticamente, a ação da nicotina poderia facilitar a liberação do Glutamato através do influxo de Ca^{++} gerado pela ativação dos receptores nicotínicos formados pelas $\alpha 7$ subunidades. O aumento do Ca^{++} por sua vez, promoveria uma maior fusão das vesículas contendo Glutamato na membrana pré-sináptica que resultaria em uma maior liberação de Glutamato na fenda sináptica. Este seria o mecanismo proposto para a “facilitação nicotínica da neurotransmissão glutamatérgica”.

Por outro lado, pós-sinapticamente, o influxo de Ca^{++} causado pela ativação das subunidades $\alpha 7$ e de influxo de Na^+ pela ativação das subunidades $\alpha 4\beta 2$ promoveriam a despolarização direta dos neurônios pré-ganglionares parassimpáticos no NA, que resultará em bradicardia. Endogenamente, ambas as subunidades $\alpha 7$ e $\alpha 4\beta 2$ seriam ativadas pela acetilcolina. Entretanto, não pode ser descartado um possível mecanismo facilitador pós-sináptico, uma vez que os neurônios pré-ganglionares parassimpáticos podem ser estimulados tanto pelo Glutamato como pela acetilcolina.

Este mecanismo tem sido proposto por vários autores (Mendelowitz 1998, 1999; Neff et al, 1998, 2003; Wang et al, 2001a,b, 2003b; Huang et al, 2004). De acordo com Huang et al (2004), a exposição pré-natal de nicotina em ratos aumenta a atividade endógena destes receptores nicotínicos cárdio-vagais, cuja atividade pode ser bloqueada pela α -bungarotoxina (Dhar et al, 2000).

5.6 – EFEITOS DA MICROINJEÇÃO BILATERAL DE α -BUNGAROTOXINA NO NA SOBRE AS RESPOSTAS CARDIOVASCULARES DO BARORREFLEXO E DO REFLEXO BEZOLD-JARISCH

Estudos anteriores de Haibara et al (1995) e de Colombari et al (1994, 1997) sugeriram que os reflexos cardiovasculares promovem a ativação de 2 vias independentes para a modulação das respostas simpática e cárdio-vagal no NTS. Tem sido sugerido que os neurônios que iniciam a conexão NTS-NA são ativados pelo glutamato, que por sua vez, tem sido considerado ser o neurotransmissor liberado pelas aferências dos reflexos cardiovasculares. Assim, a ativação desta via levaria a resposta bradicárdica reflexa, que é comum para o barorreflexo, reflexo Bezold-Jarsich e quimiorreflexo. Estudos realizados em animais não-anestesiados têm sugerido ainda que esta bradicardia reflexa ao nível do NTS seria ativada principalmente por receptores NMDA (Haibara et al, 1995; Chianca & Machado, 1996; Machado et al, 2000; Frigero et al, 2000).

Ao nível do NA, a neurotransmissão glutamatérgica foi anteriormente estudada em nosso laboratório. Neste e em outros estudos, foi mostrado que a microinjeção de L-Glu no NA promove uma bradicardia de início rápido e curta duração, com poucas alterações de PA (Brandão, 2000; Sampaio, 2001; Marchenko & Sapru, 2003). Foi demonstrado também que esta bradicardia é significativamente atenuada pelo bloqueio bilateral com o ácido kinurênico (antagonista não seletivo dos RAEs) microinjetado no NA de ratos anestesiados (Amaral et al, 2000). Este estudo demonstrou ainda, que a bradicardia induzida pela estimulação tanto do baroreflexo como do RBJ foi significativamente atenuadas (88% e 99,6%, respectivamente) após o bloqueio, sugerindo que os RAEs do NA desempenham um importante papel na mediação destas respostas.

Por outro lado, recentes estudos utilizando a técnica de patch-clamp têm sugerido que a neurotransmissão glutamatérgica no NA pode ser modulada por outros receptores, tal como os colinérgicos nicotínicos. Estes receptores modulariam a atividade dos neurônios pré-ganglionares vagais cardíacos (Mendelowitz, 1998, 1999; Neff et al, 1998b, 2003; Wang et al, 2001a,b, 2003b). Apesar dos estudos já realizados, o papel destes receptores sobre as respostas bradicárdicas promovidas

pelo L-Glu, assim como sobre as respostas bradicárdicas reflexas assim não haviam sido avaliadas em animais *in vivo*.

Os resultados do presente estudo mostraram que o bloqueio bilateral das subunidades $\alpha 7$ dos receptores nicotínicos no NA com α -bungarotoxina atenuou significativamente tanto a bradicardia barorreflexa, como a induzida pela estimulação do RBJ. Esta atenuação pode estar relacionada a menor liberação de L-Glu pelo terminal pré-sináptico, devido ao bloqueio das subunidades $\alpha 7$, ou seja, com o bloqueio deste receptor, o menor influxo de Ca^{++} acarretaria em um prejuízo da fusão das vesículas contendo L-Glu, diminuindo conseqüentemente sua liberação (Vide figura 23). Outros estudos, utilizando a mesma técnica de microinjeção com micropipetas de vidro, falharam em mostrar que o bloqueio com α -bungarotoxina no NTS e CVLM interfere na neurotransmissão glutamatérgica. Uma possível diferença em relação aos nossos estudos seria a área bulbar estudada e/ou a concentração do antagonista utilizada (Dhar et al, 2000; Aberger et al, 2001).

Uma outra possibilidade a ser considerada, seria o bloqueio concomitante das subunidades $\alpha 7$ localizadas pós-sinápticamente no NA. Como anteriormente descrito, estas subunidades estariam relacionadas com um possível mecanismo ativador/facilitador dos neurônios pós-sinápticos. Ou seja, o bloqueio destas subunidades, impediria o influxo de Ca^{++} pelos receptores nicotínicos, diminuindo o potencial de repouso dos neurônios pós-sinápticos do NA e a excitabilidade do neurônio. Conseqüentemente, o influxo de Na^+ e Ca^{++} pelos RAEs necessitariam ser mais intensos para despolarizar a membrana pós-sináptica (Vide figura 23).

Por outro lado, o fato das respostas bradicárdicas ao L-Glu e à nicotina permanecerem bloqueadas por um tempo significativamente maior do que as respostas dos reflexos cardiovasculares poderiam estar relacionadas à área do NA estimulada pelo volume da microinjeção, ou seja, a microinjeção exógena abrange uma área equivalente à bloqueada pelo antagonista, enquanto que a estimulação dos reflexos cardiovasculares ativariam no NA, uma área maior do que a bloqueada. Em outras palavras, a área do NA ativada pelos reflexos cardiovasculares pode se estender além da área bloqueada pelo antagonista. Os neurônios cárdio-vagais

cronotrópicos se localizam principalmente no NA na região da área postrema, onde efetuamos o bloqueio, mas poderiam ser encontrados em uma porção um pouco mais rostral ou caudal, fora do raio de ação do antagonista (Stuesse, 1982; Hsieh et al, 1998; Brandão, 2000, Sampaio, 2001). Outra possibilidade para uma resposta reflexa remanescente poderia ser a existência de outros receptores e/ou neurotransmissores além da acetilcolina, que modulariam a via barorreflexa.

Em relação às injeções de FBG administradas sistemicamente, alguns autores tem relatado o fato desta causar uma rápida dessensibilização dos receptores cardiopulmonares (Whalen et al, 2000). Estes autores aplicaram cinco injeções repetidas de FBG ou 5-HT₃ em ratos acordados, na dose de 100 µg/kg IV, em intervalos de 5 a 7 minutos e observaram que as respostas foram significativamente menores. Esta forma de estimulação do RBJ não foi a adotada em nosso estudo, uma vez que a dose utilizada de FBG foi muito menor (10 µg/kg) e o intervalo entre as doses foi maior (pelo menos 15 minutos). Em outros estudos, as doses de FBG utilizadas têm variado entre 5 e 40 µg/kg, sem relatos de taquifilaxia (Verberne & Guynet, 1992; Vardhan et al, 1993b; Vayssettes-Courchay et al, 1997; Pires et al, 1998).

Uma outra questão importante refere-se ao uso de anestésicos nas preparações experimentais. A uretana é amplamente utilizada nos trabalhos experimentais por ter um efeito anestésico duradouro, com mínimas alterações nos sistemas cardiovascular e nervoso autônomo (Hara & Harris, 2002). Machado e Bonagamba (1992) mostraram que a resposta pressora observada à microinjeção de L-Glu no NTS de ratos acordados foi invertida à resposta hipotensora após a anestesia geral com cloralose ou uretana. Um estudo de Bouairi et al (2004) mostrou que a uretana inverteu o padrão de arritmia respiratória sinusal, mediada pela atividade parassimpática vagal cardíaca, observada em ratos não-anestesiados, enquanto os outros anestésicos atenuaram ou aboliram esta arritmia. No presente estudo todos os procedimentos foram feitos sob efeito da uretana, mantendo as mesmas condições durante todo o protocolo experimental. As respostas observadas são comparáveis entre si, mas estudos adicionais são necessários em animais não-anestesiados para avaliarmos a influência dos anestésicos sobre a

neurotransmissão no NA. Em estudos anteriores mostramos que a microinjeção de L-Glu no NA de animais não-anestesiados promoveu respostas bradicárdicas, similares às observadas em animais anestesiados. Isso poderia sugerir que os anestésicos não afetariam drasticamente a neurotransmissão glutamatérgica, mas não se pode dizer o mesmo sobre a neurotransmissão colinérgica.

Quanto à FC basal, observamos uma diminuição significativa deste parâmetro no grupo onde foi avaliado o RBJ após o bloqueio com α -bungarotoxina bilateralmente no NA, enquanto que no grupo submetido à avaliação do barorreflexo o mesmo não foi observado. O possível papel tônico dos neurônios do NA tem sido considerado um aspecto de difícil avaliação. Em outros estudos, o bloqueio bilateral dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos no NA com o ácido kinurênico não alterou a FC basal, sugerindo que estes receptores não participariam no controle tônico da FC (Amaral et al, 2000). Uma lesão elétrica bilateral no NA também não causou alterações significativas neste parâmetro (Machado & Brody, 1988). Por outro lado, uma destruição bilateral permanente dos neurônios glutamatérgicos do NA com o ácido domóico promoveu convulsões e levou todos os ratos ao óbito, enquanto uma lesão unilateral não promoveu alterações nos níveis basais de PAM e FC, apesar de ter atenuado a resposta barorreflexa (Cheng et al, 2004). O bloqueio seletivo dos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA com AP-5 também falhou em mostrar um efeito tônico, pois ao contrário de uma taquicardia basal, foi observada diminuição da FC. O bloqueio dos receptores glutamatérgicos do tipo não-NMDA com DNQX também não alterou os valores basais de FC (Secomandi, 2004). Estudos adicionais são necessários para elucidar esta intrigante questão.

5.7 – PERSPECTIVAS PARA O ESTUDO DA NEUROTRANSMISSÃO DO NA

O estudo da co-transmissão glutamatérgica e colinérgica ao nível da área bulbar apresenta várias questões para serem esclarecidas, como por exemplo, a necessidade da co-ativação dos receptores nicotínicos e de RAEs para a gênese dos níveis basais de FC no NA e o envolvimento do ácido kinurênico endógeno na modulação da FC basal e reflexa.

Estudos de Hilmas et al (2001) demonstraram que o ácido kinurênico, que tem uma ação bloqueadora não competitiva sobre os RAEs, também age nos receptores nicotínicos que contém a subunidade $\alpha 7$. Além disso, demonstraram que o tratamento com nicotina afeta os níveis endógenos de ácido kinurênico cerebral. Estas observações levantaram a hipótese de que a atenuação das respostas cardiovasculares do L-Glu pelo ácido kinurênico *in vivo*, poderia ser o resultado da inibição pré-sináptica dos receptores nicotínicos $\alpha 7$ subunidades localizados nos terminais glutamatérgicos (Schwarcz et al, 1999; Hilmas et al, 2001).

CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

- As microinjeções repetidas de L-Glu na dose de 5 nmol/50 nL no NA, ao nível do CS, promoveram respostas cronotrópicas negativas de similar magnitude acompanhadas de discretas alterações de PA.
- As microinjeções de nicotina nas doses de 0,5, 1 e 5 mM no NA promoveram respostas cronotrópicas negativas e um aumento do tempo de bradicardia de forma dose-dependente. A dose de 10 mM promoveu discreta bradicardia, o que sugere uma dessensibilização/bloqueio dos receptores nicotínicos.
- As microinjeções de L-Glu no NA antes a após a microinjeção de nicotina no mesmo sítio não sofreram alterações significativas.
- A microinjeção unilateral de α -bungarotoxina no NA atenuou as respostas bradicárdicas induzidas pelo L-glu e a nicotina no mesmo sítio.
- A microinjeção unilateral de DH- β -E no NA não causou alterações significativas nas respostas para o L-Glu e a nicotina.
- As microinjeções bilaterais de α -bungarotoxina no NA atenuou significativamente a resposta bradicárdica barorreflexa.
- As microinjeções bilaterais de α -bungarotoxina no NA atenuou significativamente a resposta bradicárdica do reflexo Bezold-Jarisch.
- As microinjeções bilaterais de α -bungarotoxina no NA não promoveu alterações consistentes sobre a FC basal.

Os resultados do presente estudo sugerem que o NA desempenha um importante papel na modulação das respostas cardiovasculares reflexas. Além disso, sugerem que os receptores nicotínicos do subtipo $\alpha 7$ no NA participam da neurotransmissão

da respostas bradicárdicas do barorreflexo e do reflexo Bezold-Jarisch em ratos anestesiados. No entanto, estudos adicionais são necessários para aprofundarmos o conhecimento sobre a neurotransmissão colinérgica nicotínica no NA, bem como seu papel na facilitação das respostas de neurotransmissores endógenos, tal como o Glutamato e seus receptores de aminoácidos excitatórios.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aberger K.; Chitravanshi, V.C.; Sapru, H.N.; Cardiovascular responses to microinjections of nicotine into the caudal ventrolateral medulla of the rat. **Brain Research**. 16; 892(1):138-46, 2001.

Agarwal, S.K.; Gelsema, A.J.; Calaresu, F.R. Neurons in rostral VLM are inhibited by chemical stimulation of caudal VLM in rats. **Am J Physiol**. 257:265-70, 1989.

Agarwal, S.K.; Gelsema, A.J.; Calaresu, F.R. Inhibition of rostral VLM by baroreceptor activation is relayed through caudal VLM. **Am J Physiol**. 258:1271-8, 1990.

Agarwal, S.K.; Calaresu, F.R.; Enkephalins, substance P and acetylcholine microinjected into the nucleus ambiguus elicit vagal bradycardia in rats. **Brain Res**. 563(1-2):203-8, 1991.

Agarwal, S.K.; Calaresu, F.R.; Electrical stimulation of nucleus tractus solitarius excites vagal preganglionic cardiomotor neurons of the nucleus ambiguus in rats. **Brain Res**. 574(1-2):320-4, 1992.

Alkondon, M.; Albuquerque, E.X.; Diversity of nicotinic acetylcholine receptors in rat hippocampal neurons. I. Pharmacological and functional evidence for distinct structural subtypes. **J Pharmacol Exp Ther**. 265(3):1455-73, 1993.

Amaral, F.T.; Meyrelles, S.S.; Mauad, H.; The role of excitatory aminoacid receptors in the nucleus ambiguus on the cardio-vagal responses of baroreflex and Bezold-Jarisch reflex. In: 30TH NEUROSCIENCE MEETING, NEW ORLEANS, LA, 2000. p. 1948.

Andresen, M.C.; Krauhs, J.M.; Brown, A.M.; Relationship of aortic wall and baroreceptor properties during development in normotensive and spontaneously hypertensive rats. **Circ Res**. 43(5):728-38, 1978.

Antunes, V.R.; Machado, B.H.; Antagonism of glutamatergic metabotropic receptors in the NTS of awake rats does not affect the gain of the baroreflex. **Auton Neurosci**. 103(1-2):65-71, 2003.

Araujo, M.T.; Barker, L.A.; Cabral, A.M.; Vasquez, E.C.; Inhibition of nitric oxide synthase causes profound enhancement of the Bezold-Jarisch reflex. **Am J Hypertens**. 11:66-72, 1998.

Aviado; Aviado; The Bezold-Jarisch reflex. A historical perspective of cardiopulmonary reflexes. **Annals of the New York Academy of Sciences**. 940: 48-58, 2001.

Bieger, D; Hopkins, D.A.; Viscerotopic representation of the upper alimentary tract in the medulla oblongata in the rat: the nucleus ambiguus. **J Comp Neurol**. 262(4):546-62, 1987.

Blinder, K.J.; Gatti, P.J.; Johnson, T.A.; Lauenstein, J.M.; Coleman, W.P.; Gray, A.L.; Massari, V.J.; Ultrastructural circuitry of cardiorespiratory reflexes: there is a monosynaptic path between the nucleus of the solitary tract and vagal preganglionic motoneurons controlling atrioventricular conduction in the cat. **Brain Res.** 785(1):143-57, 1998a.

Botsford, S.A.; Dean, C.; Hopp, F.A.; Seagard, J.L.; Presence of glutamate receptor subtypes on barosensitive neurons in the nucleus tractus solitarius of the dog. **Neurosci Lett.** 12;261(1-2):113-7, 1999.

Bouairi, E.; Neff, R.; Evans, C.; Gold, A.; Andresen, M. C.; Mendelowitz, D.; Respiratory sinus arrhythmia in freely moving and anesthetized rats. **Journal of Applied Physiology.** 97:1431–1436, 2004.

Brandão, C.A.L. **Efeitos cardiovasculares das microinjeções de L-glutamato no núcleo ambíguo de ratos anestesiados.** 2000. Tese de doutorado – Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2000.

Buisson, B.; Bertrand, D.; Chronic exposure to nicotine upregulates the human (alpha)4 (beta)2 nicotinic acetylcholine receptor function. **The Journal Neuroscience.** 21: 1819–1829, 2001.

Buisson, B.; Bertrand, D.; Nicotine addiction: the possible role of functional upregulation. **Trends in Pharmacological Sciences.** 23(3):130-136, 2002.

Cachelin, A.B.; Rust, G.; Beta subunits co-determine the sensitivity of rat neuronal nicotinic receptors to antagonists. **Pflü gers Arch.** 429: 449–451, 1995.

Changeux, J.P.; Bertrand, D.; Corringer, P.J.; Dehaene, S.; Edelstein, S.; Le´na, C.; Le Nove`re, N.; Marubio, L.; Picciotto, M.; Zoli, M.; Brain nicotinic receptors: structure and regulation, role in learning and reinforcement. **Brain Res Rev.** 26: 198–216, 1998.

Chapleau, M.W.; Cunningham, J.T.; Sullivan, M.J.; Wachtel, R.E.; Abboud, F.M.; Structural versus functional modulation of the arterial baroreflex. **Hypertension.** 26(2):341-7, 1995.

Chen, H.I. Interaction between the baroreceptor and Bezold-Jarisch reflexes. **Am J Physiol.** 237(6):655-61, 1979.

Cheng, Z.; Powley, T.L.; Schwaber, J.S.; Doyle, F.J.; 3rd. Projections of the dorsal motor nucleus of the vagus to cardiac ganglia of rat atria: an anterograde tracing study. **J Comp Neurol.** 410(2):320-41, 1999.

Cheng, Z.; Powley, T.L.; Nucleus ambiguus projections to cardiac ganglia of rat atria: an anterograde tracing study. **J Comp Neurol.** 424(4):588-606, 2000.

Cheng, Z.; Zhang, H.; YU, J.; Wurster, R.D.; Gozal, D.; Attenuation of baroreflex sensitivity after domoic acid lesion of the nucleus ambiguus of rats. **J Appl Physiol.** 96(3):1137-45, 2004.

Chianca, D.A. JR; Machado, B.H.; The sensitivity of the Bezold-Jarisch reflex is increased in rats with sinoaortic deafferentation. **Braz J Med Biol Res.** 27:775-781, 1994.

Chianca, D.A. JR; Machado, B.H.; Microinjection of NMDA antagonist into the NTS of conscious rats blocks the Bezold-Jarisch reflex. **Brain Res.** 718(1-2):185-8, 1996.

Chianca D.A. JR; Bonagamba, L.G.; Machado, B.H.; Neurotransmission of the Bezold-Jarisch reflex in the nucleus tractus solitarii of sino-aortic deafferentated rats. **Brain Res.** 756(1-2):46-51, 1997.

Chitravanshi, V.C.; Calaresu, F.R.; Dopamine microinjected into the nucleus ambiguus elicits vagal bradycardia in spinal rats. **Brain Res.** 583(1-2):308-11, 1992.

Bernard, C.; Gebber, G. L.; Central determinants of sympathetic nerve discharge. In: Loewy, A. D. & Spyer, K. M. Central Regulations of Autonomic Functions. **Ed. Oxford, New York.** 126-144, 1990.

Coleridge, H.M.; Coleridge, J.C.; Schultz, H.D.; Characteristics of C fibre baroreceptors in the carotid sinus of dogs. **J Physiol.** 394:291-313, 1987.

Colombari, E.; Bonagamba, L.G.; Machado, B.H.; Mechanisms of pressor and bradycardic responses to L-glutamate microinjected into the NTS of conscious rats. **Am J Physiol.** 266:730-8, 1994.

Colombari, E.; Bonagamba, L.G.; Machado, B.H.; NMDA receptor antagonist blocks the bradycardic but not the pressor response to L-glutamate microinjected into the nucleus tractus solitarius (NTS) of unanesthetized rats. **Brain Res.** 749(2):209-13, 1997.

Cooper, J.R.; Bloom, F.E.; Roth, R.H. The Biochemical Basis of Neuropharmacology. 8. ed. Oxford University Press: New York, 2003.

Corbett, E.K.; Saha, S.; Deuchars, J.; McWilliam, P.N.; Batten, T.F.; Ionotropic glutamate receptor subunit immunoreactivity of vagal preganglionic neurones projecting to the rat heart. **Auton Neurosci.**105(2):105-17, 2003.

Cravo, S.L.; Morrison, S.F. The caudal ventrolateral medulla is a source of tonic sympathoinhibition. **Brain Res.** 621(1):133-6, 1993.

Damaj, M.I.; Patrick, G.S.; Creasy, K.R.; Martin, B.R.; Self-association of the single-KH-domain family members Sam68, GRP33, GLD-1, and Qk1: role of the KH domain. **Mol Cell Biol.** 17(10):5707-18, 1997.

Damaj, M.I.; Glassco, W.; Dukat, M.; Martin, B.R.; Pharmacological characterization of nicotine-induced seizures in mice. **J Pharmacol Exp Ther.** 291(3):1284-91, 1999.

Dani, J.A.; De Biasi, M.; Cellular mechanisms of nicotine addiction. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**. 70:439-446, 2001.

Decker, M.W.; Brioni, J.D.; Bannon, A.W.; Americ, S.P.; Diversity of neuronal nicotinic acetylcholine receptors: lessons from behavior and implications for CNS therapeutics. **Life Sci**. 56: 545–570, 1995.

Dehkordi O.; Balan, K.V.; Haxhiu, M.A.; Airway-related vagal preganglionic neurons express multiple nicotinic acetylcholine receptor subunits. **Auton Neurosci**. 30;128(1-2):53-63, 2006.

Dhar, S.; Nagy, F.; McIntosh, J.M.; Sapru, H.N.; Receptor subtypes mediating depressor responses to microinjections of nicotine into medial NTS of the rat. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**. 279(1):132-40, 2000.

Dhruva, A.; Bhatnagar, T.; Sapru, H.N.; Cardiovascular responses to microinjections of glutamate into the nucleus tractus solitarii of unanesthetized supracollicular decerebrate rats. **Brain Res**. 801(1-2):88-100, 1998.

Donald, D.E.; shepherd, J.T.; Reflexes from the heart and lungs: physiological curiosities or important regulatory mechanisms. **Cardiovasc Res**. 12(8):446-69, 1978.

Duffin, J.; Ezure, K.; Lipski, J.; Breathing rhythm generation: focus on the rostral ventrolateral medulla. **News Physiol Sci**. 10:133-40, 1995.

Ellenberger, H.H.; Nucleus ambiguus and bulbospinal ventral respiratory group neurons in the neonatal rat. **Brain Res Bull**. 50(1):1-13, 1999.

Ennis, M.; Xu, S.J.; Rizvi, T.A.; Discrete subregions of the rat midbrain periaqueductal gray project to nucleus ambiguus and the periaqueductal region. **Neuroscience**. 80(3):829-45, 1997.

Evans, C.; Baxi, S.; Neff, R.; Venkatesan, P.; Mendelowitz, D.; Synaptic activation of cardiac vagal neurons by capsaicin sensitive and insensitive sensory neurons. **Brain Res**. 979(1-2):210-5, 2003.

Frigero, M.; Bonagamba, L.G.; Machado, B.H.; The gain of the baroreflex bradycardia is reduced by microinjection of NMDA receptor antagonists into the nucleus tractus solitarii of awake rats. **J Auton Nerv Syst**. 79(1):28-33, 2000.

Gatti, P.J.; Johnson, T.A.; Massarl, V.J.; Can neurons in the nucleus ambiguus selectively regulate cardiac rate and atrio-ventricular conduction? **J Auton Nerv Syst**. 57(1-2):123-7, 1996.

Gebber, G.L.; Central determinants of sympathetic nerve discharge. In: LOEWY, A.D. & SPYER, K.M. (Org.), **Central Regulation of Autonomic Functions**, Oxford University Press, Inc., New York, 1990. p. 126-144.

Gieroba, Z.J.; Mackenzie, L.; Willoughby, J.O.; Blessing, W.W.; Fos-determined distribution of neurons activated during the Bezold-Jarisch reflex in the medulla oblongata in conscious rabbits and rats. **Brain Res.** 683(1):43-50, 1995.

Gopalakrishnan, M.; Molinari, E.J.; Sullivan, J.P.; Regulation of human alpha4 beta2 neuronal nicotinic acetylcholine receptors by cholinergic channel ligands and second messenger pathways. **Mol Pharmacol.** 52:524–534, 1997.

Gordon, F.J.; Leone, C.; Non-NMDA receptors in the nucleus of the tractus solitarius play the predominant role in mediating aortic baroreceptor reflexes. **Brain Res.** 568(1-2):319-22, 1991.

Gray, A.L.; Johnson, T.A.; Ardell, J.L.; Massari, V.J.; Parasympathetic control of the heart. II. A novel interganglionic intrinsic cardiac circuit mediates neural control of heart rate. **J Appl Physiol.** 96(6):2273-8, 2004a.

Gray, A.L.; Johnson, T.A.; Lauenstein, J.M.; Newton, S.S.; Ardell, J.L.; Massari, V.J.; Parasympathetic control of the heart. III. Neuropeptide Y-immunoreactive nerve terminals synapse on three populations of negative chronotropic vagal preganglionic neurons. **J Appl Physiol.** 96(6):2279-87, 2004b.

Guyenet, P.G.; Darnall, R.A.; Riley, T.A.; Rostral ventrolateral medulla and sympathorespiratory integration in rats. **Am J Physiol.** 259:1063-74, 1990.

Haibara, A.S.; Colombari, E.; Chianca, D.A. JR.; Bonagamba, L.G.; Machado, B.H.; NMDA receptors in NTS are involved in bradycardic but not in pressor response of chemoreflex. **Am J Physiol.** 269:1421-7, 1995.

Halbach, O.B.; Dermietzel, R.; Neurotransmitter and neuromodulators. Wiley-VCH: Weinheim, 2002.

Hilmas, C.; Pereira, E.F.; Alkondon, M.; Rassoulpour, A.; Schwarcz, R.; Albuquerque, E.X.; The brain metabolite kynurenic acid inhibits alpha7 nicotinic receptor activity and increases non-alpha7 nicotinic receptor expression: physiopathological implications. **J Neurosci.** 21(19):7463-73, 2001.

Hsieh, J.H.; Chen, R.F.; Wu, J.J.; Yen, C.T.; Chai, C.Y.; Vagal innervation of the gastrointestinal tract arises from dorsal motor nucleus while that of the heart largely from nucleus ambiguus in the cat. **J Auton Nerv Syst.** 70(1-2):38-50, 1998.

Huang Z.; Wang X.; Evans C.; Gold A.; Bouairi E.; Mendelowitz D.; Prenatal Nicotine Exposure Alters the Types of Nicotinic Receptors That Facilitate Excitatory Inputs to Cardiac Vagal Neurons. **J Neurophysiol.** 92: 2548–2554, 2004.

Irnatén, M.; Aicher, S.A.; Wang, J.; Venkatesan, P.; Evans, C.; Baxi, S.; Mendelowitz, D.; Mu-opioid receptors are located postsynaptically and endomorphin-1 inhibits voltage-gated calcium currents in premotor cardiac parasympathetic neurons in the rat nucleus ambiguus. **Neuroscience.** 116(2):573-82, 2003.

Johnson, T.A.; Gray, A.L.; Lauenstein, J.M.; Newton, S.S.; Massari, V.J.; Parasympathetic control of the heart. I. An interventriculo-septal ganglion is the major source of the vagal intracardiac innervation of the ventricles. **J Appl Physiol.** 96(6):2265-72, 2004.

Jordan, D.; Central nervous pathways and control of the airways. **Respir Physiol.** 125(1-2):67-81, 2001.

Kalia, M.; Sullivan, J.M.; Brainstem projections of sensory and motor components of the vagus nerve in the rat. **J Comp Neurol.** 211(3):248-65, 1982.

Kappagoda, C.T.; Linden, R.J.; Snow, H.M.; A reflex increase in heart rate from distension of the junction between the superior vena cava and the right atrium. **The Journal of Physiology.** 220(1):177-97, 1972.

Katz, B.; Thesleff, S.; A study of the desensitization produced by acetylcholine at the motor end-plate. **J Physiol.** 138(1):63-80, 1957.

Kiely, J.M.; Gordon, F.J.; Role of rostral ventrolateral medulla in centrally mediated pressor responses. **Am J Physiol.** 267:1549-56, 1994.

Krieger, E.M.; Neurogenic hypertension in the rat. **Circ Res.** 15:511-21, 1964.

Kwok, E.H.; Dun, N.J.; Endomorphins decrease heart rate and blood pressure possibly by activating vagal afferents in anesthetized rats. **Brain Res.** 803(1-2):204-7, 1998.

Lavolette, S.R.; van der Kooy, D. The neurobiology of nicotine addiction: bridging the gap from molecules to behavior. **Nature Reviews Neuroscience.** 5:55-65, 2004.

Loewy, A.D. & Spyer, K.M.; Vagal preganglionic neurons. In: LOEWY, A.D. & SPYER, K.M. (Org.), **Central Regulation of Autonomic Functions**, Oxford University Press, Inc., New York, 1990. p. 68-87.

Machado BH, Brody MJ.; Role of the nucleus ambiguus in the regulation of heart rate and arterial pressure. **Hypertension.** (6 Pt 2):602-7, 1988.

Machado, B.H.; Brody, M.J.; Mechanisms of pressor response produced by stimulation of nucleus ambiguus. **Am J Physiol.** 259:955-62, 1990.

Machado, B.H.; Bonagamba, L.G.; Microinjection of L-glutamate into the nucleus tractus solitarius increases arterial pressure in conscious rats. **Brain Res.** 576(1):131-8, 1992.

Machado, B.H.; Castania, J.A.; Bonagamba, L.G.; Salgado, H.C.; Neuro-transmission of autonomic components of aortic baroreceptor afferents in the NTS of awake rats. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.** 279(1):67-75, 2000.

Madden, C.J.; Sved, A.E.; Rostral ventrolateral medulla C1 neurons and cardiovascular regulation. **Cell Mol Neurobiol.** 23(4-5):739-49, 2003.

Marchenko, V.; Sapru, H.N.; Cardiovascular responses to chemical stimulation of the lateral tegmental field and adjacent medullary reticular formation in the rat. **Brain Res.** 977(2):247-60, 2003.

Massari, V.J.; Johnson, T.A.; Gatti, P.J.; Cardiotoxic organization of the nucleus ambiguus? An anatomical and physiological analysis of neurons regulating atrioventricular conduction. **Brain Res.** 679(2):227-40, 1995.

Marks, M. J.; Burch, J. B.; Coluns, A. C.; Effects of Chronic Nicotine Infusion on Tolerance Development and Nicotinic Receptors. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.** 226 (3), 1983.

Matsubayashi, H.; Amano, T.; Seki, T.; Sasa, M.; Sakai, N.; Postsynaptic alpha 4 beta 2 and alpha 7 type nicotinic acetylcholine receptors contribute to the local and endogenous acetylcholine-mediated synaptic transmissions in nigral dopaminergic neurons. **Brain Research.** 1005, 1-8, 2004.

Mauad, H.; Glass, M.L.; Machado, B.H.; Effect of selective denervation of baroreceptors on pulmonary ventilation and arterial pressure lability. **Hypertension.** 19:182-6, 1992.

Mauad, H.; Machado, B.H.; Involvement of the ipsilateral rostral ventrolateral medulla in the pressor response to L-glutamate microinjection into the nucleus tractus solitarii of awake rats. **J Auton Nerv Syst.** 74(1):43-8, 1998.

Mayer, M.L.; Armstrong, N.; Structure and function of glutamate receptor ion channels. **Annu Rev Physiol.** 66:161-81, 2004.

McAllen, R.M.; Spyer, K.M.; The location of cardiac vagal preganglionic motoneurons in the medulla of the cat. **J Physiol.** 258(1):187-204, 1976.

McKittrick, D.J.; Calaresu, F.R.; Nucleus ambiguus inhibits activity of cardiovascular units in RVLM. **Brain Res.** 742(1-2):203-10, 1996.

Mendelowitz, D.; Nicotine excites cardiac vagal neurons via three sites of action, **Clinical Experience Pharmacology Physiology.** 25: 453–456, 1998.

Mendelowitz, D.; Advances in parasympathetic control of heart rate and cardiac function. **News Physiol Sci.** 14:155-161, 1999.

Mendelowitz, D.; Superior laryngeal neurons directly excite cardiac vagal neurons within the nucleus ambiguus. **Brain Res Bull.** 51(2):135-8, 2000.

Meyrelles, S.S.; Mill, J.G.; Cabral, A.M.; Vasquez, E.C. Cardiac baroreflex properties in myocardial infarcted rats. **J Auton Nerv Syst.** 60(3):163-8, 1996.

Meyrelles, S.S.; Mauad, H.; Mathias, S.C.; Cabral, A.M.; Vasquez, E.C.; Effects of myocardial hypertrophy on neural reflexes controlling cardiovascular function. **J Auton Nerv Syst.** 73(2-3):135-42, 1998.

Murugaian, J.; Sundaram, K.; Krieger, A.; Sapru, H.; Electrolytic lesions in the depressor area of the ventrolateral medulla of the rat abolish depressor responses to the aortic nerve stimulation. **Brain Res.** 499(2):371-7, 1989.

Neff, R.A.; Mihalevich, M.; Mendelowitz, D.; Stimulation of NTS activates NMDA and non-NMDA receptors in rat cardiac vagal neurons in the nucleus ambiguus. **Brain Res.** 792(2):277-82, 1998a.

Neff, R.A.; Humphrey, J.; Mihalevich, M.; Mendelowitz, D.; Nicotine enhances presynaptic and postsynaptic glutamatergic neurotransmission to activate cardiac parasympathetic neurons. **Circ Res.** 83(12):1241-7, 1998b.

Neff, R.A.; Wang, J.; Baxi, S.; Evans, C.; Mendelowitz, D. Respiratory sinus arrhythmia: endogenous activation of nicotinic receptors mediates respiratory modulation of brainstem cardioinhibitory parasympathetic neurons. **Circulation Research.** 93: 565–572, 2003.

Nosaka, S.; Yamamoto, T.; Yasunaga, K.; Localization of vagal cardioinhibitory preganglionic neurons with rat brain stem. **J Comp Neurol.** 186(1):79-92, 1979.

Ochoa, E.L.; Chattopadhyay, A.; McNamee, M.G.; Desensitization of the nicotinic acetylcholine receptor: molecular mechanisms and effect of modulators. **Cell Mol Neurobiol.** 9(2):141-78, 1989.

Ohta, H.; Talman, W.T.; Both NMDA and non-NMDA receptors in the NTS participate in the baroreceptor reflex in rats. **Am J Physiol.** 267:1065-70, 1994.

Ohta, H.; Li, X.; Talman, W.T.; Release of glutamate in the nucleus tractus solitarii in response to baroreflex activation in rats. **Neuroscience.** 74(1):29-37, 1996.

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

Peotta, V.A.; Vasquez, E.C.; Meyrelles, S.S.; Cardiovascular neural reflexes in L-NAME-induced hypertension in mice. **Hypertension.** 38:555-9, 2001.

Persson, P.; Ehmke, H.; Kirchheim, H.; Seller, H.; Effect of sino-aortic denervation in comparison to cardiopulmonary deafferentation on long-term blood pressure in conscious dogs. **Pflugers Arch.** 411(2):160-6, 1988.

Pin, J.P.; Duvoisin, R.; The metabotropic glutamate receptors: structure and functions. **Neuropharmacology.** 34(1):1-26, 1995.

Pires, J.G.; Silva, S.R.; Ramage, A.G.; Futuro-Neto, H.A.; Evidence that 5-HT₃ receptors in the nucleus tractus solitarius and other brainstem areas modulate the

vagal bradycardia evoked by activation of the von Bezold-Jarisch reflex in the anesthetized rat. **Brain Res.** 791(1-2):229-34, 1998.

Randall, W.C.; Wurster, R.D.; Morphology of intracellularly labeled canine intracardiac ganglion cells. **J Comp Neurol.** 314(2):396-402, 1991.

Raymundo, H.; Scher, A.M.; O'Leary, D.S.; Sampson, P.D.; Cardiovascular control by arterial and cardiopulmonary baroreceptors in awake dogs with atrioventricular block. **Am J Physiol.** 257:2048-58, 1989.

Rekling, J.C.; Feldman, J.L.; PreBotzinger complex and pacemaker neurons: hypothesized site and kernel for respiratory rhythm generation. **Annu Rev Physiol.** 60:385-405, 1998.

Rentero, N.; Cividjian, A.; Trevaks, D.; Pequignot, J.M.; Quintin, L.; McAllen, R.M.; Activity patterns of cardiac vagal motoneurons in rat nucleus ambiguus. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.** 283(6):1327-34, 2002.

Richter, D.W. & Spyer, K.M.; Cardiorespiratory control. In: LOEWY, A.D. & Spyer, K.M.; (Org.), **Central Regulation of Autonomic Functions**, Oxford University Press, Inc., New York, 1990. p. 189-203.

Robinson, S. E.; James, J. R.; Lapp, L. N.; Vann, R. E.; Gross, D. F.; Philibin, S. D.; Rosecrans, J. A.; Evidence of cellular nicotinic receptor desensitization in rats exhibiting nicotine-induced acute tolerance. **Psychopharmacology.** 184: 306–313, 2006.

Ross, C.A.; Ruggiero, D.A.; Park, D.H.; Joh, T.H.; Sved, A.F.; Fernandez-Pardal, J.; Saavedra, J.; Reis, D.J.; Tonic vasomotor control by the rostral ventrolateral medulla: effect of electrical or chemical stimulation of the area containing C1 adrenaline neurons on arterial pressure, heart rate, and plasma catecholamines and vasopressin. **J Neurosci.** 4(2):474-94, 1984.

Sampaio, K.N.; **Estudo do papel da substância cinzenta periaquedutal na regulação tônica e reflexa da pressão arterial e dos neurônios pré e pós-ganglionares vagais cardíacos no controle da frequência cardíaca e da condução atrioventricular em ratos.** 2001. Tese de doutorado – Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2001.

Sampaio, K.N.; Mauad, H.; Spyer, K.M.; Ford, T.W.; Differential chronotropic and dromotropic responses to focal stimulation of cardiac vagal ganglia in the rat. **Exp Physiol.** 88(3):315-27, 2003.

Sapru, H.N.; Glutamate circuits in selected medullo-spinal areas regulating cardiovascular function. **Clin Exp Pharmacol Physiol.** 29(5-6):491-6, 2002.

Schwarcz, R.; Ceresoli-Borroni, G.; Wu H. Q.; Rassoulpour, A.; Poeggeler, B.; Hodgkins, P. S.; Guidetti, P.; Modulation and function of kynurenic acid in the immature rat brain. **Adv Exp Med Biol.** 467:113–123, 1999.

Seagard, J.L.; Dean, C.; Hopp, F.A.; Neurochemical transmission of baroreceptor input in the nucleus tractus solitarius. **Brain Res Bull.** 51(2):111-8, 2000.

Secomand, T. K. L.; Mauad, H.; Participação dos receptores NMDA e não-NMDA na neurotransmissão do barorreflexo e reflexo Bezold-Jarisch no núcleo ambíguo de ratos anestesiados. 2004. Tese de mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2004.

Spyer, K.M.; The central nervous organization of reflex circulatory control. In: LOEWY, A.D. & SPYER, K.M. (Org.), **Central Regulation of Autonomic Functions**, Oxford University Press, Inc., New York, 1990. p. 168-187.

Stuesse, S.L.; Origins of cardiac vagal preganglionic fibers: a retrograde transport study. **Brain Res.** 236(1):15-25, 1982.

Sved, A.F.; Gordon, F.J.; Amino acids as central neurotransmitters in the baroreceptor reflex pathway. **News Physiol Sci.** 9:243-46, 1994.

Sved, A.F.; Ito, S.; Madden, C.J.; Baroreflex dependent and independent roles of the caudal ventrolateral medulla in cardiovascular regulation. **Brain Res Bull.** 51(2):129-33, 2000.

Takanaga, A.; Hayakawa, T.; Tanaka, K.; Kawabata, K.; Maeda, S.; Seki, M.; Immunohistochemical characterization of cardiac vagal preganglionic neurons in the rat. **Auton Neurosci.** 106(2):132-7, 2003.

Taylor J. A.; Sanderson, M.; A reexamination of the risk factors for the sudden infant death syndrome. **J. Pediatrics.** 126: 887-891, 1995.

Thorén, P.; Characteristics of right ventricular receptors with non-medullated vagal afferents in the cat. **Acta Physiologica Scandinavica.** 110(4):431-3, 1980.

Urbanski, R.W.; Sapru, H.N.; Evidence for a sympathoexcitatory pathway from the nucleus tractus solitarii to the ventrolateral medullary pressor area. **J Auton Nerv Syst.** 23(2):161-74, 1988a.

Urbanski, R.W.; Sapru, H.N.; Putative neurotransmitters involved in medullary cardiovascular regulation. **J Auton Nerv Syst.** 25(2-3):181-93, 1998b.

Vanoli, E.; De Ferrari, G.M.; Stramba-Badiale, M.; Hull, S.S. Jr.; Foreman, R.D.; Schwartz, P.J.; Vagal stimulation and prevention of sudden death in conscious dogs with a healed myocardial infarction. **Circ Res.** 68: 1471–1481, 1991.

Vardhan, A.; Kachroo, A.; Sapru, H.N.; Excitatory amino acid receptors in the nucleus tractus solitarius mediate the responses to the stimulation of cardio-pulmonary vagal afferent C fiber endings. **Brain Res.** 618(1):23-31, 1993b.

Vayssettes-Courchay C, Bouysset F, Laubie M, Verbeuren T.J.; Central integration of the Bezold-Jarish reflex in the cat. **Brain Res.** 744(2):272-8, 1997.

Venkatesan, P.; Wang, J.; Evans, C.; Irnaten, M.; Mendelowitz, D.; Nociceptin inhibits gamma-aminobutyric acidergic inputs to cardiac parasympathetic neurons in the nucleus ambiguus. **The journal of pharmacology and experimental therapeutics.** 300:78-82, 2002.

Verberne, A.J.; Lewis, S.J.; Jarrott, B.; Louis, W.J.; Bezold-Jarisch reflex is inhibited by excitotoxin-induced destruction of vagal primary afferent neurons. **Eur J Pharmacol.** 139(3):365-7, 1987.

Verberne, A.J.; Guyenet, P.G.; Medullary pathway of the Bezold-Jarisch reflex in the rat. **Am J Physiol.** 263:1195-202, 1992.

Viard, E.; Sapru, H.N.; Cardiovascular responses to activation of metabotropic glutamate receptors in the NTS of the rat. **Brain Res.** 952(2):308-21, 2002.

Wang, J.; Irnaten, M.; Mendelowitz, D.; Characteristics of spontaneous and evoked GABAergic synaptic currents in cardiac vagal neurons in rats. **Brain Res.** 889(1-2):78-83, 2001a.

Wang, J.; Irnaten, M.; Neff, R.A.; Venkatesan, P.; Evans, C.; Loewy, A.D.; Mettenleiter, T.C.; Mendelowitz, D.; Synaptic and neurotransmitter activation of cardiac vagal neurons in the nucleus ambiguus. **Ann N Y Acad Sci.** 940:237-46, 2001b.

Wang, J.; Irnaten, M.; Venkatesan, P.; Evans, C.; Mendelowitz, D.; Arginine vasopressin enhances GABAergic inhibition of cardiac parasympathetic neurons in the nucleus ambiguus. **Neuroscience.** 111(3):699-705, 2002.

Wang, J.; Wang, X.; Irnaten, M.; Venkatesan, P.; Evans, C.; Baxi, S.; Mendelowitz D.; Endogenous acetylcholine and nicotine activation enhances GABAergic and glycinergic inputs to cardiac vagal neurons. **J Neurophysiol.** 89(5):2473-81, 2003.

Wang, X.; Huang, Z.; Gold, A.B.S.; Bouairi, E.; Evans, C.; Andresen, M.C.; Mendelowitz, D.; Propofol modulates gamma-aminobutyric acid-mediated inhibitory neurotransmission to cardiac vagal neurons in the nucleus ambiguus. **American society of anesthesiology.** 100:1198-205, 2004.

Webster, R.A. Neurotransmitters, drugs and brain function. John Wiley & Sons: Chichester, 2001.

Whalen, E.J.; Johnson, A.K.; Lewis, S.J.; Functional evidence for the rapid desensitization of 5-HT(3) receptors on vagal afferents mediating the Bezold-Jarisch reflex. **Brain Res.** 873(2):302-5, 2000.

Willette, R.N.; Punnen, S.; Krieger, A.J.; Sapru, H.N.; Interdependence of rostral and caudal ventrolateral medullary areas in the control of blood pressure. **Brain Res.** 321(1):169-74, 1984.

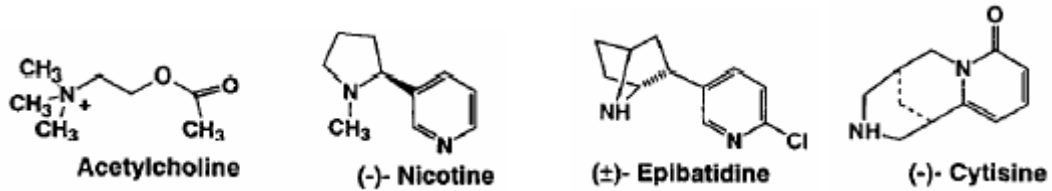
Willis, A.; Mihalevich, M.; Neff, R.A.; Mendelowitz, D.; Three types of postsynaptic glutamatergic receptors are activated in DMNX neurons upon stimulation of NTS. **Am J Physiol.** 271:1614-9, 1996.

Wonnacott, S. Presynaptic nicotinic Ach receptors. **Trends in Neurosciences.** 20:92-98, 1997.

ANEXO

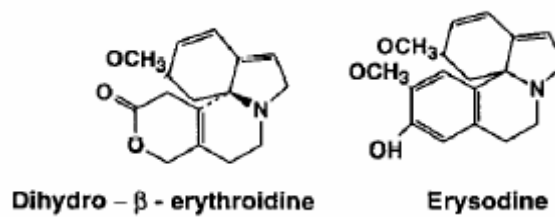
ANEXO 1

Agonistas dos Receptores Nicotínicos

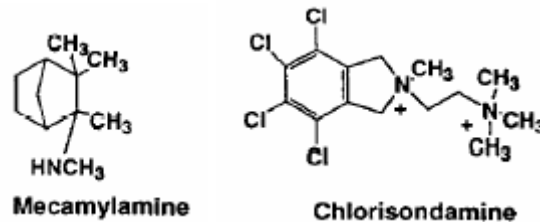


Antagonistas dos Receptores Nicotínicos

Competitivos



Não-competitivos



Anexo 1 – Estruturas dos receptores nicotínicos neuronais, seus agonistas e antagonistas (Modificado de Decker et al, 1995).

APÊNDICES

APÊNDICE I

Nicotinic Acetylcholine receptor

CURRENTLY USED NAME	Neuronal (CNS) (α -Bungarotoxin Insensitive)	Neuronal (ANS) (α -Bungarotoxin Insensitive)	Neuronal (CNS & ANS) (α -Bungarotoxin sensitive)	Neuromuscular junction
SUBUNITS (ARRANGED AS PENTAMERS)	α 4 β 2* (predominant) α 3 β 4* α 6 β 2 β 3* α 2*	α 3 α 5 β 4 α 3 α 5 β 2 β 4	α 7 homomers (predominant) α 8 homomers? (avian only) α 7 α 8 (avian only) α 9 homomers? α 9 α 10	(α 1) β 1 β 7 (developmental/extrasynaptic) (α 1) β 1 β 6 (endplates)
RECEPTOR SELECTIVE AGONISTS	(β 2> β 4> α 7) (-)-Nicotine Cytisine ^a (+)-Anatoxin-a Epibatidine RJR-2403 ABT-418 A-85380 5-Iodo-A-85380	(-)-Nicotine Epibatidine SIB-1553A DMPP	α 7: DMAC, GTS-21, ^a AR-R17779, Choline α 9, α 10: Carbachol, DMPP, Ciclotremotone	Epibatidine Anatoxin-a TMA
RECEPTOR SELECTIVE ANTAGONISTS	Mecamylamine (β 2, β 4> α 7) Dihydro- β -erythroidine (β 2> β 4) α -Conotoxin AUB (α 3 β 4*) α -Conotoxin MII (α 3/ α 6 β 2*) α -Conotoxin PIA (α 6 β 2) Chlorisondamine	Mecamylamine (β 2, β 4> α 7) Hexamethonium Neuronal-Bungarotoxin α -Conotoxin AUB (α 3 β 4*) Chlorisondamine	α 7: α -Bungarotoxin Methyllycaonitine (α 7> α 6 β 2> α 3> α 4= α 1) α -Conotoxin IML α 9, α 10: α -Bungarotoxin d-Tubocurarine, Nicotine Atropine, Muscarine Strychnine, Bicuculline Tropisetron	α -Bungarotoxin d-Tubocurarine α -Conotoxin GI α -Conotoxin MII α -Conotoxin SI
SIGNAL TRANSDUCTION MECHANISMS	Na ⁺ /K ⁺ /Ca ²⁺ fluxes	Na ⁺ /K ⁺ /Ca ²⁺ fluxes	Na ⁺ /K ⁺ /Ca ²⁺ fluxes	Na ⁺ /K ⁺ /Ca ²⁺ fluxes
RADIOLOGANDS OF CHOICE	[³ H]-Nicotine (α 4 β 2*) [³ H]-Cytisine (α 4 β 2*) [³ H]-Epibatidine (β 2> β 4) [¹²⁵ I]- α -Conotoxin MII (α 6/ α 3 β 2)	[³ H]-Epibatidine	[¹²⁵ I]- α -Bungarotoxin [³ H]-Methyllycaonitine	[¹²⁵ I]- α -Bungarotoxin
TISSUE EXPRESSION	α 4, β 2: throughout CNS, especially high in thalamus α 2: Interpeduncular nucleus, reticular formation, inferior colliculus, septum (medial nucleus) α 3: thalamus, locus coeruleus, medial habenula, retina α 5: hippocampus, substantia nigra, ventral tegmentum, some brainstem nuclei α 6: substantia nigra, ventral tegmentum, locus coeruleus β 3: substantia nigra, ventral tegmentum, locus coeruleus, retina β 4: medial habenula, interpeduncular nucleus, retina, also weaker expression in cortex, hippocampus	Sympathetic ganglia, sensory ganglia, chromaffin cells, fibroblasts, keratinocytes	α 7: widespread in CNS, especially cortex, hippocampus, hypothalamus, amygdala, some brainstem nuclei, retina autonomic neurons, cardiac ganglia also reported in macrophages, glia, α 9: outer hair cells of the cochlea also transcribed in hypophyseal gland and sensory neurons, sternohyoid and tongue muscle, bone marrow cells, embryonic blood cells α 10: outer hair cells of the cochlea	Skeletal muscle
PHYSIOLOGICAL FUNCTION	Postsynaptic receptors: synaptic transmission (rare), Presynaptic receptors extrasynaptic receptors: modulation of synaptic transmission	Synaptic transmission (sympathetic ganglia), Presynaptic modulation of transmitter release	α 7: Postsynaptic receptors: synaptic transmission (rare: e.g. hippocampus) Presynaptic receptors: modulation of glutamate, GABA release; Ca ²⁺ signaling; synaptic plasticity; extrasynaptic receptors: gene regulation α 9, α 10: ACh-gated depolarization leading to activation of K ⁺ channels and hyperpolarization of outer hair cells	Neuromuscular transmission
DISEASE RELEVANCE	Alzheimer's disease, pain, autism, ADNFLE (α 4, β 2 point mutations), nicotine addiction, Parkinson's disease	Megacystis-microcolon-Intestinal hypoperistalsis syndrome, ulcerative colitis	α 7: Alzheimer's disease, Inflammation?, schizophrenia	Myasthenia gravis

Abbreviations

A-85380: 3-[2-(5-Azetidinylmethoxy)pyridine
ABT-418: (S)-3-Methyl-5-(1-methyl-2-pyrrolidinyl)isoxazole
ADNFLE: Autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy
AR-R 17779: (-)-spiro[1-Azabicyclo[2.2.2]octane-3,5'-oxazolidin-2'-one (4a)
DMAC: 3-(4-Dimethylaminocinnamylidene) anabaseine
DMPP: N,N-Dimethyl-N-phenylpiperazinium iodide
GTS-21: [2-(2,4-Dimethoxybenzylidene)-anabaseine
RJR-2403: N-Methyl-4-(3-pyridinyl)-3-buten-1-amine
SIB-1553A: 4-[[2-(1-Methyl-2-pyrrolidinyl)ethyl]thio]phenyl hydrochloride
TMA: Tetramethylammonium

APÊNDICE II

Alterações de PAM e FC promovidas em resposta
às microinjeções de L-Glutamato 5 nmol/50 nL

Microinjeções de L-Glutamato no NA

Nicotina 0,5 mM	1ª Dose		2ª Dose		Após Nicotina	
	Δ PAM	Δ FC	Δ PAM	Δ FC	Δ PAM	Δ FC
	-74,8	-204,7	25,4	-106,5	53,7	-131,4
	-68,1	-149,7	-59,1	-189,3	43,4	-118,9
	37,3	-105,3	35,5	-127,4	59,8	-108,4
	12,2	-125,2	35,7	-126,6	-28,8	-127,7
	-26,9	-106,4	-33,5	-106,3	52,9	-85,6
	34,3	-128,4	60,2	-86,2		
MÉDIA	-14,33	-136,6	10,70	-123,7	36,20**	-114,4
EPM	20,36	15,2	18,91	14,5	16,46	8,2

** Diferença estatisticamente significativa quando comparada à primeira microinjeção de L-Glu (p<0,01)

Microinjeções de L-Glutamato no NA

Nicotina 1 mM	1ª Dose		2ª Dose		Após Nicotina	
	Δ PAM	Δ FC	Δ PAM	Δ FC	Δ PAM	Δ FC
	-23,5	-146,4	35,3	-143,2	48,2	-160,3
	-36,9	-127,1	-8,3	-126,4	54,6	-126,8
	-28,6	-168	-62,2	-213	59,5	-28,5
	-58,3	-138,3	-22,7	-72,5	17,5	-48,7
	6,7	-213,9	11	-228,2	31,5	-83,9
MÉDIA	-28,12	-158,7	-9,38	-156,7	42,26	-89,6
EPM	10,54	15,3	16,40	28,7	7,79	24,3

**Alterações de PAM e FC promovidas em resposta
às microinjeções de L-Glutamato 5 nmol/50 nL**

Microinjeções de L-Glutamato no NA

Nicotina 5 mM	1ª Dose		2ª Dose		Após Nicotina	
	Δ PAM	Δ FC	Δ PAM	Δ FC	Δ PAM	Δ FC
	42,7	-147,8	28,1	-86,6	57,3	-84,4
	-10,6	-81,7	-12	-58,7	32,2	-35,3
	6,7	-109,3	37,5	-72,3	38,1	-107,7
	41	-92,2	31,8	-131,3	43,5	-39
	-15,2	-77,3	23,1	-43,7	25	-65,4
	-48,4	-163,7	27,5	-122,9	39	-106,1
	-47,8	-108	-25,1	-155,7	44,3	-49,1
MÉDIA	-4,51	-111,4	15,84	-95,9	39,91*	-69,6
EPM	14,12	12,4	9,15	15,7	3,84	11,5

* Diferença estatisticamente significativa quando comparada à primeira microinjeção de L-Glu (p<0,05)

Microinjeções de L-Glutamato no NA

Nicotina 10 mM	1ª Dose		2ª Dose		Após Nicotina	
	Δ PAM	Δ FC	Δ PAM	Δ FC	Δ PAM	Δ FC
	22,8	-114,2	16,7	-67,6	23,5	-82,2
	14	-107,8	21,8	-111,8	16,4	-40,4
	-17	-142,4	9,2	-187,5	33,6	-207,1
	-38,6	-165,9	8,5	-187,7	40,4	-207,7
MÉDIA	-4,7	-132,6	14,1	-138,7	28,5	-134,4
EPM	14,2	13,4	3,2	29,7	5,3	43,0

APÊNDICE III

Alterações de PAM e FC promovidas em resposta às microinjeções de nicotina

Microinjeções de Nicotina no NA						
Nicotina 0,5 mM	Salina		1ª Dose		2ª Dose	
	Δ PAM	Δ FC	Δ PAM	Δ FC	Δ PAM	Δ FC
	28,7	-2,7	-10,2	-19,3	8	-0,5
	-10,5	-17	-46	-36,1	-21,4	-26,5
	-4,1	-1,8	-13,8	-15,2	-2,8	0
	9,5	-8,8	7,7	-8,9	16,8	8,6
	18,9	17,9	27,7	42,8	-14,7	9,8
MÉDIA	8,5	-2,5	-6,9	-7,3	-2,8	-1,7
EPM	7,2	5,8	12,24	13,3	7,0	6,5

** Diferença estatisticamente significativa quando comparada à microinjeção de salina ($p < 0,01$)

Microinjeções de Nicotina no NA						
Nicotina 1 mM	Salina		1ª Dose		2ª Dose	
	Δ PAM	Δ FC	Δ PAM	Δ FC	Δ PAM	Δ FC
	28,7	-2,7	39,4	-64,7	-13,2	-53,9
	-10,5	-17	43,1	-71,8	40	-43,7
	-4,1	-1,8	20,8	-35,2	-20,5	-40,8
	9,5	-8,8	45,5	-22,2	40,3	-22,2
	18,9	17,9	-4,2	-13,5	-4	-15,2
			45,2	-67,8	20,4	-32,2
MÉDIA	8,5	-2,5	31,6	-45,9**	10,5	-34,7*
EPM	7,2	5,8	8,1	10,4	10,9	5,9

* Diferença estatisticamente significativa quando comparada à microinjeção de salina ($p < 0,05$)

** Diferença estatisticamente significativa quando comparada à microinjeção de salina ($p < 0,01$)

**Alterações de PAM e FC promovidas
em resposta às microinjeções de nicotina**

Microinjeções de Nicotina no NA

Nicotina 5 mM	Salina		1ª Dose		2ª Dose	
	Δ PAM	Δ FC	Δ PAM	Δ FC	Δ PAM	Δ FC
	28,7	-2,7	39,8	-37,6	48,6	-55,1
	-10,5	-17,0	32,7	-98,8	44,0	-30,7
	-4,1	-1,8	42,2	-34,6	26,7	-50
	9,5	-8,8	47,3	-90,9	50,0	-214,8
	18,9	17,9	11,8	-42,7	6,1	-35,2
			7,4	-42,3	-16,9	-47,4
			8,1	-70,2	3,5	-59,5
MÉDIA	8,5	-2,5	27,0	-59,6**	23,1	-70,4**
EPM	7,2	5,8	6,6	10,1	9,9	24,4

** Diferença estatisticamente significativa quando comparada à microinjeção de salina ($p < 0,01$)

Microinjeções de Nicotina no NA

Nicotina 10 mM	Salina		1ª Dose		2ª Dose	
	Δ PAM	Δ FC	Δ PAM	Δ FC	Δ PAM	Δ FC
	28,7	-2,7	-58,1	-35,5	-36,5	-26,5
	-10,5	-17,0	21,7	9,8	-45,1	-21,0
	-4,1	-1,8	8,9	-2,8	13,9	-18,9
	9,5	-8,8	9,2	-2,8	13,2	-19,0
	18,9	17,9				
MÉDIA	8,5	-2,5	-4,6	-7,8	-13,63	-21,4
EPM	7,2	5,8	18,1	9,7	15,79	1,8

APÊNDICE IV

Duração de bradicardia (s) promovida
Por microinjeções de nicotina

Tempo de bradicardia				
Nicotina	0,5 mM	1 mM	5 mM	10 mM
	42,9	113	49,1	495
	25,3	45	48,8	68,3
	22,2	180	50,4	14
	36,7	124	48,1	13,4
	37,8	37,8	68,3	
		96,1	363,1	
			192,9	
MÉDIA	33,0	99,3	117,2	147,7
EPM	3,9	21,6	45,6	116,5

APÊNDICE V

Microinjeções unilaterais no NA de nicotina 1 mM em diferentes tempos

Microinjeções de nicotina em diferentes tempos								
Nicotina 1 mM	15 minutos				30 minutos			
	1ª microinjeção		2ª microinjeção		1ª microinjeção		2ª microinjeção	
	Δ PAM	Δ FC	Δ PAM	Δ FC	Δ PAM	Δ FC	Δ PAM	Δ FC
	35,8	-62,7	3,9	-21,4	39,4	-64,7	-13,2	-53,9
	19,5	-19,7	14,6	-17,3	43,1	-71,8	40	-43,7
	-36,3	-37,8	-24,2	-28	20,8	-35,2	-20,5	-40,8
	-17,4	-18,1	-31,5	-28,2	45,5	-22,2	40,3	-22,2
	26,9	-47,6	19,5	-16	-4,2	-13,5	-4	-15,2
	38,7	-28,9	17,2	-19,4	45,2	-67,8	20,4	-32,2
	42,2	-67,4	13	-2,9				
	11,7	-13,2	12,6	-23				
	30	-27,7	15,5	-16,4				
	15,4	-54,3	28,7	-25,6				
MÉDIA	16,7	-39,9	6,9	-22,4	31,6	-45,9	10,5	-34,7
EPM	8,0	6,2	6,1	3,6	8,1	10,4	10,9	5,9

APÊNDICE VI

Alterações de PAM e FC promovidas pelo L-Glu e nicotina antes e após a microinjeção unilateral de salina no NA

Microinjeções de salina no NA								
L-Glu 5 nmol/ 50 nL	L-Glu		L-Glu (30 min)		L-Glu (60 min)		L-Glu (90 min)	
	Δ PAM	Δ FC	Δ PAM	Δ FC	Δ PAM	Δ FC	Δ PAM	Δ FC
	-31,1	-128	-9,2	-159,1	52	-157,4	39	-153,4
	-9,2	-159,6	22,7	-231,3	49,7	-252,5	40,2	-244,4
	10,1	-159,7	23	-235	35	-151,9	38,1	-245,4
	-5,7	-126,1	14,1	-113,3	38,4	-93,7	27,4	-49,1
	-48,6	-155,5	40,8	-149,2	34,2	-134,1	21	-125,1
	21,5	-145,7	25,9	-73,1	30,6	-100	41,4	-114
MÉDIA	-10,5	-145,8	19,6*	-160,2	40,0**	-148,3	34,5**	-155,2
EPM	10,6	6,3	6,8	26,2	3,6	23,4	3,7	34,6

* Diferença estatisticamente significativa quando comparada à microinjeção de L-Glu antes da salina ($p < 0,05$)

** Diferença estatisticamente significativa quando comparada à microinjeção de L-Glu antes da salina ($p < 0,01$)

Microinjeções de salina no NA								
Nicotina 5 mM	Nicotina		Nicotina (15 min)		Nicotina (45 min)		Nicotina (75 min)	
	Δ PAM	Δ FC	Δ PAM	Δ FC	Δ PAM	Δ FC	Δ PAM	Δ FC
	-10,2	-143	-9,2	-184,7	21,9	-125,6	27,4	-142,6
	31,1	-24,2	20,7	-39,3	11,3	-16,2	-1,8	-28,9
	31,4	-23,6	14,8	-43,3	7,2	-16,2	-16,2	-24,3
	14,2	-32,1	-20,1	-44	-35,3	-42,9	-28	-45
	-26,4	-67,9	24,9	-74,2	6,2	-43,7	15	-57,1
	28,9	-33,5	7	-33,2	13	-54,3	-17,7	-60,1
MÉDIA	11,5	-54,1	6,4	-69,8	4,1	-49,8	-3,6**	-59,7
EPM	10,0	19,0	7,2	23,7	8,2	16,4	9,5	19,3

** Diferença estatisticamente significativa quando comparada à microinjeção de nicotina antes da salina ($p < 0,01$)

APÊNDICE VII

Alterações de PAM e FC promovidas pelo L-Glu e nicotina antes e após a microinjeção unilateral de DH- β -E no NA

Microinjeções de DH- β -E no NA								
L-Glu 5 nmol/50 nL	L-Glu		L-Glu (30 min)		L-Glu (60 min)		L-Glu (90 min)	
	Δ PAM	Δ FC	Δ PAM	Δ FC	Δ PAM	Δ FC	Δ PAM	Δ FC
	12,5	-62,4	7,5	-160,4	31,5	-98,9	12,7	-36,9
	-8,9	-141	23,9	-48,1	6,8	-41,1	25,9	-178,2
	24,6	-173,5	37,1	-129,2	26	-246,8	35,9	-97,7
	2,3	-196,2	42,9	-199,1	69,6	-139	11,4	-57,1
	-16,3	-176,2	-30,3	-187,3	10,9	-170,2		
MÉDIA	2,8	-149,9	16,2	-144,8	29,0	-139,2	21,5	-92,5
EPM	7,3	23,6	13,1	27,0	11,1	34,5	5,8	31,2

Microinjeções de DH- β -E no NA								
Nicotina 5 mM	Nicotina		Nicotina (15 min)		Nicotina (45 min)		Nicotina (75 min)	
	Δ PAM	Δ FC	Δ PAM	Δ FC	Δ PAM	Δ FC	Δ PAM	Δ FC
	13,6	-82,3	11,5	-85,9	-2,5	-86,2	-11	-50,7
	-9,7	-71,9	-10	-62,6	15,3	-29,4	-11,5	-31,1
	24,8	-118,7	-31,2	-110,5	5,2	-91,4	18,1	-13,8
	41,6	-80,1	3,3	-81,9	9,4	-41,8	-53,7	-63,7
	12,9	-56	-48,4	-53,1	-42	-57,2		
MÉDIA	16,6	-81,8	-15,0	-78,8	-2,9	-61,2	-14,5	-39,8*
EPM	8,4	10,3	11,0	10,0	10,2	12,1	14,8	11,0

* Diferença estatisticamente significativa quando comparada à microinjeção de nicotina antes do DH- β -E ($p < 0,05$)

APÊNDICE VIII

Alterações de PAM e FC promovidas pelo L-Glu e nicotina antes e após a microinjeção unilateral de α -bungarotoxina no NA

Microinjeções de α -bungarotoxina no NA								
L-Glu 5 nmol/50 nL	L-Glu		L-Glu (30 min)		L-Glu (60 min)		L-Glu (90 min)	
	Δ PAM	Δ FC	Δ PAM	Δ FC	Δ PAM	Δ FC	Δ PAM	Δ FC
	13,7	-197,5	46,2	-51,3	30,1	-14,9	-4,2	-7,9
	-52,4	-182,3	12,5	-240	40,7	-62,7	38,9	-39
	-23	-151	42,3	-62,8	19,5	-148,2	23,9	-177,6
	5,2	-175,9	-6,5	-19,1	30,8	-34,1	3,8	-26,8
	-62,1	-233,7	22,5	-155,8	8,4	-102,3	26,5	-104,2
MÉDIA	-23,7	-188,1	23,4*	-105,8	25,9*	-72,4*	17,8	-71,1*
EPM	15,1	13,7	9,7	40,5	5,5	24,0	7,9	31,2

* Diferença estatisticamente significativa quando comparada à microinjeção de L-Glu antes da α -bungarotoxina ($p < 0,05$)

Microinjeções de α -bungarotoxina no NA								
Nicotina 5 mM	Nicotina		Nicotina (15 min)		Nicotina (45 min)		Nicotina (75 min)	
	Δ PAM	Δ FC	Δ PAM	Δ FC	Δ PAM	Δ FC	Δ PAM	Δ FC
	32,5	-50,2	15,7	-23,4	17,1	-10,3	31,1	-16,4
	8,9	-31,7	1,3	-13,6	1,2	-10,5	15,9	-8,5
	31,1	-64,9	-5,3	-5,1	7,5	-30	-11,6	-50,7
	50,6	-39,1	-5,5	-3,1	-6,3	-1,2	10,4	-17,9
	-8,4	-35,6	4,3	-4,2	3,5	-10,1	3,5	-2,6
MÉDIA	22,9	-44,3	2,1	-9,9**	4,6	-12,4**	9,9	-19,2**
EPM	10,3	6,0	3,9	3,9	3,8	4,7	7,0	8,3

** Diferença estatisticamente significativa quando comparada à microinjeção de nicotina antes da α -bungarotoxina ($p < 0,01$)

APÊNDICE IX

Alterações de PAM e FC induzidas pela fenilefrina antes e após microinjeção bilateral de salina e α -bungarotoxina no NA

Fenilefrina 50 μ g/mL/min								
Salina	Antes		Após 15 min		Após 45 min		Após 75 min	
	Δ PAM	Δ FC	Δ PAM	Δ FC	Δ PAM	Δ FC	Δ PAM	Δ FC
	49,6	-61,5	54	-44,2	50,8	-71,5	68,4	-108,5
	65,5	-42,7	57,8	-53,1	64,4	-48,6	64,5	-33,5
	48,7	-72,2	47,8	-51,7	52,1	-55,6	53,1	-70,4
	61,3	-70,5	50,1	-78,1	60,2	-39,5	45,4	-59,4
MÉDIA	56,3	-61,7	52,4	-56,8	56,9	-53,8	57,9	-68,0
EPM	4,2	6,8	2,2	7,4	3,3	6,8	5,3	15,6

Fenilefrina 50 μ g/mL/min								
Alfa - Bungarotoxina	Antes		Após 15 min		Após 45 min		Após 75 min	
	Δ PAM	Δ FC	Δ PAM	Δ FC	Δ PAM	Δ FC	Δ PAM	Δ FC
	61	-41,9	46,1	-7,9	42,4	-11,5	46,6	-9,9
	55,4	-43,3	47,9	-24,9	51,1	-49,5	57,1	-52,0
	60,4	-44,0	66,4	-23,5	61,7	-30,5	53,0	-35,0
	58,1	-39,9	59,3	-20,7	56,3	-20,1	56,2	-14,4
	57,5	-36,5	54,3	-21,1	47,0	-45,7	53,5	-22,3
	49,5	-61,8	54,2	-20,3*	54,2	-70,6	66,9	-107,0
MÉDIA	57,0	-44,6	54,7	-19,7	52,1	-38,0	55,6	-40,1
EPM	1,7	3,6	3,0	2,5	2,8	8,8	2,7	14,8

* Diferença estatisticamente significativa quando comparada à infusão de fenilefrina antes da α -bungarotoxina ($p < 0,05$)

APÊNDICE X

Alterações de PAM e FC induzidas pela infusão contínua de fenilefrina antes e após microinjeção bilateral de α -bungarotoxina no NA

Fenilbiguanida 10 μ g/Kg								
Salina	Antes		Após 15 min		Após 45 min		Após 75 min	
	Δ PAM	Δ FC	Δ PAM	Δ FC	Δ PAM	Δ FC	Δ PAM	Δ FC
	-66,2	-94,3	-69,8	-48,1	-62,8	-54,5	-56,0	-160,1
	-66,3	-124,3	-54,2	-98,0	-54,1	-94,0	-45,4	-76,6
	-47,4	-108,9	-60,5	-104,3	-56,0	-122,2	-53,1	-125,8
MÉDIA	-60,0	-109,2	-61,5	-83,5	-57,6	-90,2	-51,5	-120,8
EPM	6,3	8,7	4,5	17,8	2,6	19,6	3,2	24,2

Fenilbiguanida 10 μ g/Kg								
Alfa - Bungarotoxina	Antes		Após 15 min		Após 45 min		Após 75 min	
	Δ PAM	Δ FC	Δ PAM	Δ FC	Δ PAM	Δ FC	Δ PAM	Δ FC
	-25,7	-106,7	-30,9	-41,3	-60,1	-100,5	-56,3	-107,3
	-14,4	-91,2	-19,7	-57,7	-28,3	-84,4	-16,1	-70,7
	-34,8	-165,6	-38,1	-59,9	-37,9	-62,6	-40,3	-191,6
	-44,1	-106,8	-27,6	-62,4	-32,4	-124,1	-27,4	-208,0
	-79,8	-115,3	-38,1	-60,8	-25,4	-85,4	-12,7	-80,5
MÉDIA	-39,8	-117,1	-30,9	-56,4	-36,8	-91,4	-30,6	-131,6
EPM	11,2	12,7	3,5	3,9	6,2	10,2	8,0	28,6

* Diferença estatisticamente significativa quando comparada à infusão de fenilefrina antes da α -bungarotoxina ($p < 0,05$)