

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E FARMACOLOGIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

EDUARDO AKIRA FUJIWARA

**ESTUDO DA PARTICIPAÇÃO DA NEUROTRANSMISSÃO COLINÉRGICA
NO HIPOCAMPO DORSAL NA MODULAÇÃO DE RESPOSTAS
CARDIOVASCULARES E RESPIRATÓRIAS DO QUIMIORREFLEXO**

VITÓRIA-ES
2016

EDUARDO AKIRA FUJIWARA

**ESTUDO DA PARTICIPAÇÃO DA NEUROTRANSMISSÃO COLINÉRGICA
NO HIPOCAMPO DORSAL NA MODULAÇÃO DE RESPOSTAS
CARDIOVASCULARES E RESPIRATÓRIAS DO QUIMIORREFLEXO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Farmacologia da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Resstel Barbosa Moraes

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Karla Nívea Sampaio

VITÓRIA-ES

2016

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Setorial do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do
Espírito Santo, ES, Brasil)

Fujiwara, Eduardo Akira, 1989 -

F949e Estudo da participação da neurotransmissão colinérgica no
hipocampo dorsal na modulação de respostas cardiovasculares e
respiratórias do quimiorreflexo / Eduardo Akira Fujiwara – 2016.

76 f. : il.

Orientador: Leonardo Resstel Barbosa Moraes.

Coorientador: Karla Nívea Sampaio.

Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Farmacologia) –
Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Cianeto de Potássio. 2. Hipocampo. 3. Receptores Colinérgicos.
4. Receptores Muscarínicos. I. Moraes, Leonardo Resstel Barbosa. II.
Sampaio, Karla Nívea. III. Universidade Federal do Espírito Santo.
Centro de Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU: 61

EDUARDO AKIRA FUJIWARA

**ESTUDO DA PARTICIPAÇÃO DA NEUROTRANSMISSÃO COLINÉRGICA
NO HIPOCAMPO DORSAL NA MODULAÇÃO DE RESPOSTAS
CARDIOVASCULARES E RESPIRATÓRIAS DO QUIMIORREFLEXO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Farmacologia da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Farmacologia.

Prof. Dr. Leonardo Resstel Barbosa Moraes, FMRP-USP

Prof. Dr^a. Karla Nívea Sampaio, UFES

Prof. Dr^a. Vanessa Beijamini Harres, UFES

Prof. Dr. Tadeu Uggere de Andrade, UVV

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Elio e Emilia, por colocarem a minha educação como prioridade. Sou agradecido pelos valores que me ensinaram!

A minha irmã, Lilian, pela compreensão nos momentos em que estive ausente, por estar sempre presente quando tudo parecia não dar certo e por me ouvir sempre. Obrigado!

Ao casal de amigos, Marina Gatti e Tomonori Oshikiri, pelos incentivos desde a época que eu estudava para a prova de mestrado, pela companhia e por me ajudar a esquecer de vários problemas. Obrigado!

Ao Prof. Dr. Leonardo Resstel, meu agradecimento pela oportunidade e pela acolhida em seu laboratório. Agradeço sua orientação para a realização do meu mestrado.

À Prof^a. Dr^a. Karla Nívea Sampaio, por sua co-orientação, pelas palavras de incentivo e pela disposição em sempre me ajudar. Obrigado pela confiança e todos os ensinamentos!

Aos professores que compuseram a banca examinadora deste trabalho, Prof.^a Dr.^a Vanessa Beijamini Harres e Prof. Dr. Tadeu Uggere de Andrade, pela disponibilidade e por terem aceitado gentilmente fazer parte da apresentação desta dissertação.

Novamente, à Prof.^a Dr.^a Vanessa Beijamini Harres, pela acolhida ao Programa de Pós-Graduação e disponibilidade em ensinar a verificar os sítios de microinjeção nas lâminas, pela experiência, profissionalismo e pela paciência comigo. Obrigado pela confiança!

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro para realização deste trabalho.

Ao Laboratório de Histologia Molecular e Imunohistoquímica (LHMI) pela disponibilização de equipamentos fundamentais à realização do projeto.

Aos professores do PPGBF, pelos ensinamentos e pela contribuição na minha formação acadêmica.

À secretária do PPGBF / UFES, Kelly Cristine Lima da Cruz, pelos serviços prestados, pela cordialidade e por sua ajuda.

À Gabriela Pandini Silote, na época minha colega de mestrado, que me acompanhou durante boa parte do meu mestrado e me ensinou a trabalhar com ratos, presente nas minhas crises de angústias, na vitória de ter atingido o Hipocampo, pela torcida incansável e pelas palavras amigas e de apoio. Muito obrigado, Gabi!

Às amigas que foram construídas na FMRP-USP: Mayara Firmino, Daniela Lescano, Sara Hott, Davi Lagatta, Luciana Kuntze, e a todos do Laboratório de Neurofarmacologia. Obrigado pelos ensinamentos, pelo apoio, pelas palavras de incentivo, pelos momentos de descontração (aventuras)! Adoro todos vocês!

Novamente à Sara Hott, na época pós-doutora em Vitória. Obrigado pela ajuda e boa vontade em mostrar a coleta de dados cardiovasculares, pelo companheirismo no laboratório, pelas conversas e pela sua presença!

À amiga Alciene, a primeira pessoa com quem pude me abrir na pós-graduação. Obrigado pelos momentos de descontração, por ser minha psicóloga particular. Foi recíproco!

À amiga Graziany, pela companhia aos sábados/feriados, pelos momentos de crises de risos no laboratório, pelo companheirismo e pela experiência trocada.

À Letícia Herbst, pelo companheirismo, pelas conversas descontraídas no laboratório! Obrigado!

Aos "migos Lab": Igor, Sara, Kamila, Aline, Vítor, Andrew, Thatiany, pelos momentos de descontração no Lab, de alegria e pelo companheirismo. Obrigado a todos!

Aos colegas de mestrado com quem pude trocar experiências muito positivas durante as disciplinas de Bioquímica e Farmacologia. Em especial, a amiga Mayana Cardoso, obrigado por estar sempre disposta a me ouvir mesmo

estando longe. Trocamos experiências maravilhosas!

Obrigado a todos que contribuíram direta ou indiretamente na minha formação!

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

Madre Teresa de Calcutá

RESUMO

O quimiorreflexo é um importante mecanismo neural envolvido nos controles cardiovascular e respiratório sob situações hipóxicas ou hipercapnêicas. Em animais experimentais, a ativação deste reflexo promove não só alterações cardiorrespiratórias, mas também comportamentais. Estudos prévios de nosso grupo de pesquisa têm demonstrado que o hipocampo dorsal é capaz de modular respostas cardiovasculares frente a estímulos aversivos, como o medo condicionado ao contexto e o estresse de restrição. Relata-se na literatura que a modulação da neurotransmissão colinérgica no HD produz alterações marcantes na pressão arterial média (PAM) e na frequência cardíaca (FC) (Hori et al. 1995). Entretanto, o papel da neurotransmissão colinérgica no HD na participação de respostas cardiorrespiratórias provocadas pela ativação do quimiorreflexo permanecia inexplorada. O objetivo do presente estudo foi avaliar o envolvimento da neurotransmissão colinérgica no HD na modulação de respostas cardiovasculares e respiratórias provocadas pela ativação de quimiorreceptores periféricos. Ratos Wistar (280-340g) foram anestesiados com tribromoetanol (250mg/kg) e cânulas-guia foram implantadas bilateralmente no HD utilizando aparelho estereotáxico. Três dias após a cirurgia estereotáxica, e sob anestesia com tribromoetanol, foi realizada a cirurgia de canulação da artéria e veia femorais para permitir o registro de pressão arterial pulsátil (PAP) e a injeção de KCN, respectivamente. Foi empregado o método de pletismografia de corpo inteiro para obtenção de frequência respiratória (f_R), ventilação minuto (V_E) e volume corrente (V_T). O quimiorreflexo foi ativado utilizando-se KCN (40 μ g/0.05 mL, iv) e PAM, FC, f_R , V_T e V_E foram avaliados antes, 10 e 60 minutos após a microinjeção bilateral de drogas anticolinérgicas no HD. As drogas testadas foram: hemicolínio (1 nmol/500nL), inibidor da recaptção da colina; atropina (0,6; 6; 18 e 30nmol/500nL), antagonista não-seletivo de receptores muscarínicos, *J104129 Fumarate* (6 nmol/500nL, antagonista de receptores muscarínicos M_1/M_3 ; pirenzepina (6 nmol/500nL), antagonista seletivo de receptor muscarínico M_1 . Os dados foram analisados utilizando-se ANOVA de duas vias para medidas repetidas, seguido do pós-teste de Bonferroni ($P < 0.05$). Microinjeções bilaterais das drogas moduladoras da neurotransmissão colinérgica no HD não

modificaram os níveis cardiorrespiratórios basais, nem as respostas cardiorrespiratórias induzidas pela ativação dos quimiorreceptores periféricos com KCN ($P > 0.05$). Os dados mostram que a neurotransmissão colinérgica presente no HD não parece estar envolvida no controle cardiorrespiratório basal, nem no processamento das respostas cardiorrespiratórias induzidas pela ativação de quimiorreceptores periféricos.

Palavras-chaves: quimiorreflexo, cianeto de potássio, hipocampo dorsal, receptores colinérgicos muscarínicos

ABSTRACT

Chemoreflex is an important neural mechanism involved in cardiovascular and respiratory control under hypoxic or hypercapnic situation. In experimental studies, activation of this reflex promotes not only cardiorespiratory but also behavioural changes. Previous studies from our research group have demonstrated that the dorsal hippocampus (DH) can modulate cardiovascular responses evoked by aversive stimuli such as contextual fear conditioning and restraint stress. Evidences also show that modulation of the cholinergic transmission within the DH produces marked changes in mean arterial pressure (MAP) and heart rate (HR) (Hori et al. 1995). However, whether the cholinergic neurotransmission within the DH participate in the cardiorespiratory responses of the chemoreflex remained unexplored. The goal of the present study was to evaluate the involvement of the DH cholinergic neurotransmission in the modulation of cardiovascular and respiratory responses evoked by the peripheral chemoreflex activation. Male Wistar rats (280-340g) were anesthetized (Tribromethanol, 250 mg/kg) and stainless steel guide cannulae were implanted bilaterally into the DH using a stereotaxic apparatus. Three days after the stereotaxic surgery, also under tribromethanol anesthesia, the femoral artery and vein was catheterized to allow pulsatile arterial pressure (PAP) recordings and drugs injection, respectively. The MAP and HR were derived from the PAP recordings. Whole body plethysmograph was used to assess the respiratory frequency (f_R), the minute ventilation (V_E) and the tidal volume (V_T). The chemoreflex was activated using KCN (40 μ g/0.05 mL, iv) and the evoked MAP, HR, f_R , V_E and V_T responses were evaluated before, 10 and 60 minutes after the bilateral microinjections of cholinergic agents within the DH. The drugs tested were: hemicholinium (1 nmol/500 nL), a choline reuptake inhibitor, atropine (0.6; 6; 18 and 30nmol/500 nL), non-selective muscarinic receptor antagonist, *J104129 fumarate* (6 nmol/500 nL) M_1/M_3 muscarinic receptor antagonist and pirenzepine (6 nmol/500 nL) a M_1 selective antagonist. Data were analyzed by two way ANOVA for repeated measures, followed by Bonferroni post hoc test ($P < 0.05$). Bilateral microinjections of the cholinergic modulatory agents within the DH did not alter the cardiorespiratory basal levels,

as well as did not change any of the cardiorespiratory responses induced by the chemoreflex activation with KCN ($P > 0.05$). The present data shows that cholinergic neurotransmission within the DH neither seems to be involved in the control of cardiorespiratory basal levels nor in the processing of the cardiorespiratory responses induced by the peripheral chemoreflex activation.

Keywords: chemoreflex, potassium cyanide, dorsal hippocampus, cholinergic muscarinic receptors

LISTAS DE SIGLAS

Ach - Acetilcolina

AchE - Acetilcolinesterase

bötzC - Complexo Bötzing

CA – Corno de Amon

CoCl₂ – Cloreto de cobalto

CPFM – Córtex pré-frontal medial

DA – Doença de Alzheimer

FC – Frequência cardíaca

f_R – Frequência respiratória

GD – Giro denteado

GRV - Grupo respiratório rostroventral

HD – Hipocampo dorsal

HI – Hipocampo Intermediário

HPA- Hipotálamo-Hipófise-Adrenal

HV – Hipocampo ventral

IML – Coluna intermediolateral

KCN –Cianeto de potássio

MCC – Medo condicionado ao contexto

NA – Núcleo ambíguo

NaCN- Cianeto de sódio

NRT – Núcleo retrotrapezóide

NTS – Núcleo do trato solitário

PAM – Pressão arterial média

PAP – Pressão arterial pulsátil

Pré-BötzC – Complexo Pré-Bötzinger

rGRV - Grupo respiratório rostroventral

RVLM - Área rostroventrolateral do bulbo

SNP – Sistema nervoso parassimpático

vCPFM - Córtex pré-frontal medial ventral

V_E - Ventilação minuto

vGRV - Grupo respiratório caudoventral

V_T – Volume minuto

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	11
LISTAS DE SIGLAS	13
1 INTRODUÇÃO	15
1.1 QUIMIORREFLEXO	16
1.2 HIPOCAMPO.....	21
1.3 NEUROTRANSMISSÃO COLINÉRGICA NO HIPOCAMPO	24
2 OBJETIVOS	27
2.1 OBJETIVO PRINCIPAL	28
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	28
3 MATERIAIS E MÉTODOS	29
3.1 ANIMAIS	30
3.2 IMPLANTE DE CÂNULAS-GUIA PARA O HD	30
3.3 CANULAÇÃO DA ARTÉRIA E VEIA FEMORAIS	31
3.4 DROGAS UTILIZADAS.....	32
3.5 MICROINJEÇÃO DE DROGAS NO HD	32
3.6 REGISTROS CARDIOVASCULARES.....	32
3.7 ESTIMULAÇÃO DE QUIMIORRECEPTORES PERIFÉRICOS.....	33
3.8 REGISTRO DA VENTILAÇÃO E ANÁLISE DOS DADOS.....	33
3.9 ANÁLISE DA FREQUÊNCIA RESPIRATÓRIA.....	33
3.10 ANÁLISE DO VOLUME CORRENTE E DA VENTILAÇÃO MINUTO NOS ANIMAIS	34
3.11 REGISTROS SIMULTÂNEOS DA PA, FC E VENTILAÇÃO.....	35
3.12 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS	36
3.12.1 Efeito da administração bilateral de hemicolínio no HD.....	37
3.12.2 Efeito da administração bilateral de atropina no HD.....	37
3.12.3 Efeito da administração bilateral de <i>J104129 Fumarate</i> no HD....	38
3.12.4 Efeito da administração bilateral de Pirenzepina no HD.....	39
3.13 DETERMINAÇÃO HISTOLÓGICA DOS SÍTIOS DE MICROINJEÇÃO	40
3.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	41
4 RESULTADOS	42

4.1 LOCALIZAÇÃO DOS SÍTIOS DE MICROINJEÇÃO	43
4.2 RESPOSTAS CARDIORESPIRATÓRIAS FRENTE À ATIVAÇÃO DO QUIMIORREFLEXO EM RATOS NÃO-ANESTESIADOS.	45
4.3 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO BILATERAL NO HD DO INIBIDOR DA CAPTAÇÃO DE COLINA, HEMICOLÍNIO, SOBRE OS PARÂMETROS CARDIORESPIRATÓRIOS BASAIS E INDUZIDOS PELA ATIVAÇÃO DO QUIMIORREFLEXO.....	46
4.4 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO BILATERAL DE ATROPINA NO HD SOBRE OS PARÂMETROS CARDIORESPIRATÓRIOS BASAIS E INDUZIDOS PELA ATIVAÇÃO DO QUIMIORREFLEXO.	49
4.5 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO BILATERAL DO <i>J104129 FUMARATE</i> NO HD SOBRE OS PARÂMETROS CARDIORESPIRATÓRIOS BASAIS E INDUZIDOS PELA ATIVAÇÃO DO QUIMIORREFLEXO.	52
4.6 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO BILATERAL DE PIRENZEPINA NO HD SOBRE OS PARÂMETROS CARDIORESPIRATÓRIOS BASAIS E INDUZIDOS PELA ATIVAÇÃO DO QUIMIORREFLEXO.	55
5 DISCUSSÃO	58
CONSIDERAÇÕES FINAIS	65
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
ANEXO	75
ANEXO 1	76

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 QUIMIORREFLEXO

Os estados de hipóxia ou anóxia representam condições aversivas para a maioria dos organismos vivos e intensos desafios fisiológicos, resultando em rápida degradação celular e, em última instância, em morte (COSTA et al., 2014). Todos os seres vivos na Terra adquiriram, ao longo do tempo, mecanismos fisiológicos que permitem que complexos sistemas multicelulares respondam aos estados hipóxicos ou anóxicos, visando a preservação da integridade celular e, conseqüentemente, garantindo a homeostasia (COSTA et al., 2014; LINDAHL, 2008).

Nos animais vertebrados, o principal sistema sensorial para a detecção do oxigênio é a via neuronal do quimiorreflexo pelo qual a disponibilidade de oxigênio é detectada e ajustes ventilatórios e autonômicos são promovidos diante de uma situação de hipóxia. (COSTA et al., 2014; VASQUEZ et al., 1997). Sendo assim, o quimiorreflexo é um importante mecanismo neural envolvido não apenas em ajustes respiratórios, mas também nos ajustes cardiovasculares por meio de um complexo mecanismo fisiológico (KARA; NARKIEWICZ; SOMERS, 2003; VASQUEZ et al., 1997). Além disso, a hipoxemia e apnéia podem ocorrer em situações fisiopatológicas, como a apnéia obstrutiva do sono (AOS). Pacientes com AOS sofrem episódios repetitivos de hipoxemia e por vezes hipercapnia que levam conseqüentemente a aumento da PA a níveis elevados (MANSUKHANI; WANG; SOMERS, 2015). Estudos em humanos obesos, sem a coexistência de outras doenças, mostram que a obesidade está associada a elevada resposta do quimiorreflexo frente à hipercapnia (MANSUKHANI; WANG; SOMERS, 2015)

Os quimiorreceptores responsáveis pela detecção das alterações nos gases sanguíneos estão localizados periféricamente em corpúsculos aórticos e carotídeos, estando os últimos posicionados bilateralmente na bifurcação da artéria carótida, e centralmente na superfície ventral do bulbo (GUIMARÃES; BELLI, 2011).

Os corpúsculos carotídeos são estruturas altamente irrigadas cujo volume ocupado por vênulas e arteríolas representa cerca de 25% da estrutura (CAMPAGNOLE-SANTOS; HAIBARA, 2001). Além disso, a sua localização na artéria carótida é estratégica, uma vez que a composição do sangue é amostrada antes de chegar a estruturas sensíveis à privação de oxigênio como o cérebro (NURSE, 2014). Apesar de relatos na literatura da localização de quimiorreceptores nos corpúsculos aórticos (CAMPAGNOLE-SANTOS; HAIBARA, 2001), em ratos, coelhos e humanos os quimiorreceptores aórticos estão funcionalmente ausentes (MARSHALL, 1994). Os quimiorreceptores periféricos são formados por células quimiossensíveis, as células glomus ou células do tipo I, que respondem principalmente a hipoxemia, e as células do tipo II que são células tipo-gliais cuja função principal é estrutural, mas cujas evidências recentes apontam também para uma participação ativa por meio da sinalização parácrina na quimiotransdução (NURSE, 2014).

Embora o mecanismo de quimiotransdução pelas células glomus não tenha sido completamente elucidado, o modelo atual propõe que o estado de hipóxia induz a inibição de canais de K^+ , levando a despolarização da célula glomus e promovendo a entrada de íon Ca^{2+} , o que resulta na liberação de neurotransmissores, como a dopamina, a acetilcolina, o ATP e a adenosina (ITURRIAGA, 2014; NURSE, 2014; PRABHAKAR, 2006). Conseqüentemente, ocorre a propagação desse sinal via nervo glossofaríngeo fazendo sua primeira sinapse em uma região do bulbo, denominada Núcleo do Trato Solitário (NTS) (DAMPNEY; HORIUCHI, 2003; VASQUEZ et al., 1997). O NTS, em particular, o comissural, é uma importante área bulbar que recebe informações aferentes periféricas dos sistemas cardiovascular e respiratório, produzindo ajustes autonômicos e ventilatórios necessários em diferentes situações fisiológicas (FURUYA et al., 2014; GUIMARÃES; BELLI, 2011; SEQUEIRA et al., 2000).

A partir do NTS partem projeções excitatórias à área rostroventrolateral do bulbo (RVLM), uma região abrangendo neurônios que desempenham funções na geração de estímulo simpático e respiratório (MORAES et al., 2011). Portanto, a via NTS-RVLM tem sido sugerida como parte do componente simpatoexcitatório da ativação do quimiorreflexo (FREET; STONER; TANG, 2013). A RVLM contém neurônios simpatoexcitatórios que projetam para a coluna intermediolateral (IML) na medula espinhal fazendo sinapse nos

neurônios pré-ganglionares simpáticos (ROSS et al., 1984). Além da RVLM, partem projeções excitatórias do NTS para o Núcleo Ambíguo (NA), que contém os corpos celulares dos neurônios pré-ganglionares do sistema nervoso parassimpático (SNP) (CAMPAGNOLE-SANTOS; HAIBARA, 2001; GRANJEIRO; MACHADO, 2009; GUIMARÃES; BELLI, 2011; MACHADO et al., 1997) (Figura 1).

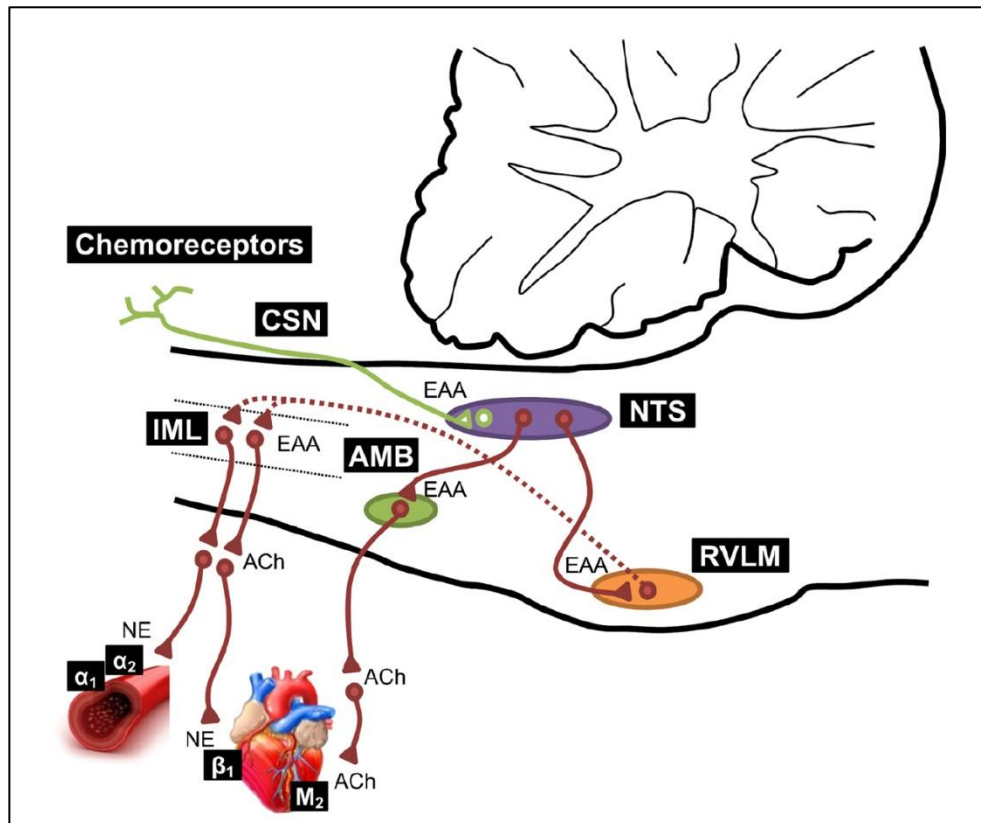


Figura 1: Vias do quimiorreceptor periférico na região do tronco encefálico. CSN, nervo do seio carotídeo; NTS, núcleo do trato solitário; RVLM, área rostroventrolateral do bulbo; AMB, núcleo ambíguo IML, coluna intermédia lateral, EAA, aminoácido excitatório; ACh, acetilcolina; e NE, norepinefrina. Fonte: Dampney RA. et al. (2002), retirado de Salman et al.(2006).

A ativação do NTS pelos quimiorreceptores periféricos também gera respostas respiratórias mediadas principalmente por projeções deste núcleo para o grupo respiratório ventral (GRV), localizado na porção ventrolateral do bulbo. O GRV abriga o complexo Pré-Bötzinger (preBötzc), considerado o principal gerador do ritmo respiratório. Fazem parte do GRV, também, o complexo Bötzing (BötC), o grupo respiratório rostroventral (rGRV) e o grupo respiratório caudoventral (vGRV), que estão envolvidos na respiração ativa e também frente à ativação dos quimiorreceptores periféricos (COSTA et al.,

2014). Além disso, o núcleo retrotrapezóide (NRT) e o grupo respiratório parafacial também recebem projeções relacionadas ao quimiorreflexo e estão envolvidos na expiração e componentes simpatoexcitatório frente à hipóxia (COSTA et al., 2014; TAKAKURA et al., 2006).

Portanto, as sinapses desse reflexo no NTS promovem excitação de várias vias neurais para diferentes regiões do tronco encefálico produzindo mudanças dos componentes simpático e parassimpático, como bradicardia, resposta pressora, hiperpnéia e taquipnéia. Além disso, em animais de experimentação são observadas respostas comportamentais como o estado de alerta e exploração de ambiente (FRANCHINI, 1992). Por outro lado, os quimiorreceptores centrais são estimulados pela acidificação do fluido cerebral extracelular que por sua vez levam a ajustes ventilatórios, a fim de minimizar variações de pH (NATTIE; LI, 2012).

Desde estudos clássicos, como o de Bernthal (1938), onde foi observado vasoconstrição periférica acompanhada por aumento da frequência respiratória (f_R) por meio da estimulação química de quimiorreceptores carotídeos com cianeto de sódio (NaCN), a utilização de sais de cianeto têm sido amplamente empregados no estudo do quimiorreflexo. De fato, o estímulo quimiorreflexo com sais de cianeto perante administração intravenosa, produz respostas cardiovasculares semelhantes àquelas produzidas por hipóxia, sendo uma ferramenta adequada para avaliação das diferentes respostas induzidas pela ativação quimiorreflexa (BARROS et al., 2002). Todavia, a maioria dos estudos envolvendo a elucidação das vias neurais mediando as respostas cardiorrespiratórias do quimiorreflexo tem focado no estudo do papel de áreas bulbares e pontinas, que são reconhecidamente áreas de projeções primárias de aferências quimiossensitivas e sítios de integração respiratória e simpática.

Algumas evidências, entretanto, têm demonstrado que as vias bulbares não parecem modular de forma exclusiva as respostas frente à ativação dos quimiorreceptores periféricos (HAIBARA et al., 1995; MAUAD; MACHADO, 2001). Nestes estudos, o bloqueio do RVLM por meio da administração do ácido quinurênico ou bloqueio de receptores NMDA no NTS não altera a resposta pressora quimiorreflexa. Ainda que o papel de estruturas

suprabulbares permaneça pouco explorado, dados da literatura sugerem que outras estruturas poderiam participar da modulação de respostas cardiovasculares frente à ativação do quimiorreflexo, tais como as estruturas límbicas, como o córtex prélimbico. (GRANJEIRO et al., 2011a).

O sistema límbico compreende o circuito neuronal relacionado às respostas emocionais e aos impulsos motivacionais, mas que fazem também conexões com o sistema somático e autonômico de forma a promover uma resposta integrada entre os processos emocionais, cognitivos e homeostáticos (ESPERIDIAO-ANTONIO et al., 2008). As principais estruturas interagindo no sistema límbico compreendem: o córtex pré-frontal, córtex cingulado, complexo amigdalóide, tálamo, hipocampo, núcleo accumbens, hipotálamo, área tegmental ventral. Além disso, também abrange componentes do mesencéfalo incluindo os núcleos dorsal da rafe e núcleo mediano da rafe (MORGANE; GALLER; MOKLER, 2005).

Em um estudo do nosso grupo de pesquisa, Granjeiro e colaboradores (2011) mostram que a inativação do córtex infralímbico, sub-região do córtex pré-frontal medial ventral (CPFM), com o cloreto de cobalto (CoCl_2) (bloqueador não-seletivo de sinapses reversível) (KRETZ, 1984) seguido da ativação do quimiorreflexo com KCN provoca uma atenuação significativa da resposta pressora, sem alteração na resposta bradicárdica induzida pelo quimiorreflexo. Esse dado sugere, portanto, a participação de estruturas límbicas na modulação de respostas cardiovasculares induzidas pela ativação dos quimiorreceptores periféricos. De fato, estruturas límbicas parecem modular diretamente a regulação de reflexos neurais, uma vez que dados do nosso grupo mostram que o hipocampo dorsal, por meio de receptores NMDA, endocanabinóide CB1 e muscarínico é capaz de modular a atividade barorreflexa cardíaca de ratos não-anestesiados (FERREIRA-JUNIOR, 2015). Em outra estrutura límbica, o córtex pré-frontal medial ventral (vCPFM), a neurotransmissão glutamatérgica também parece estar envolvida no processamento de respostas taquicárdicas e bradicárdicas do barorreflexo (FERREIRA-JUNIOR et al., 2013).

Evidências recentes apontam também para um importante papel do hipocampo ventral e dorsal na modulação quimiorreflexa (KUNTZE, 2016; KUNTZE et al., 2016). Esse estudo avaliou os efeitos do bloqueio não seletivo

com CoCl_2 e o envolvimento de receptores NMDA e da produção de óxido nítrico local sobre a modulação das respostas quimiorreflexas. Os resultados obtidos mostram que o hipocampo dorsal (HD) e o hipocampo ventral (HV) apresentam um papel inibitório sobre as respostas de bradicardia e uma ação facilitatória sobre a resposta pressora decorrente do estímulo quimiorreflexo, mediados pela via NMDA/NO presente nestas estruturas.

1.2 HIPOCAMPO

O hipocampo é uma das estruturas do sistema límbico estando envolvido em processos fisio-patológicos como memória e cognição, emoções e estresse, Doença de Alzheimer (DA) e epilepsia (TAUPIN, 2007), e filogeneticamente está entre as estruturas mais antigas do cérebro. Relata-se na literatura que a estimulação elétrica do hipocampo em gatos, cães e macacos resulta em diversas modificações comportamentais tais como, agitação, reações defensivas e de fuga (MACLEAN; DELGADO, 1953), bem como modificações autonômicas sobre a frequência cardíaca (tanto aumento, quanto redução), aumento da pressão arterial e inibição respiratória (RUIT; NEAFSEY, 1988).

Ao longo de sua estrutura, são observados aspectos morfológicos altamente diversificados. O hipocampo é composto por duas regiões: o giro denteado (GD) e o corno de Amon (CA). A região CA é, por sua vez, dividida em sub-regiões conhecidos como: CA1, CA2 e CA3. Em cada uma dessas regiões é encontrada uma camada de células nervosas denominada camada principal. As células nervosas encontradas na camada principal do GD são as células granulares, e aquelas encontradas na região CA são denominadas células piramidais. Juntamente, essas células estão organizadas em uma via única, o circuito tri-sináptico (Figura 2). O circuito tri-sináptico é organizado em lamelas ao longo do hipocampo. Os axônios das células granulares, que são as fibras musgosas, estabelecem contatos com as células piramidais da região CA3. As células piramidais da CA3 enviam projeções às células piramidais da CA1, numa via denominada Colateral de Schaeffer, formando a terceira ligação

do circuito tri-sináptico do hipocampo. A organização desse circuito está relacionado ao recebimento de informações do córtex entorrinal e sua distribuição unidirecional (TAUPIN, 2007).

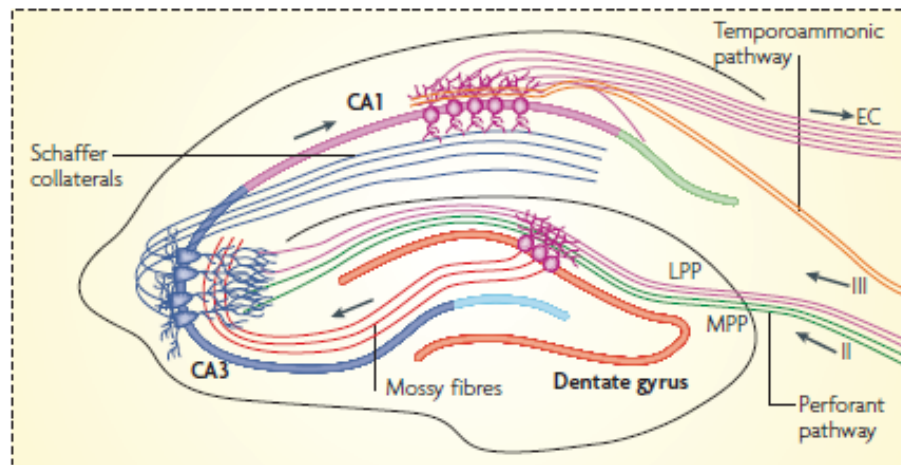


Figura 2: Ilustração da neurocircuitaria hipocampal discriminando suas sub-regiões. A via trisináptica é mostrada por meio das setas (córtex entorrinal (EC)- Giro denteado-CA3-CA1-EC). Fonte: Adaptado de Deng et al. (2010).

Tradicionalmente o hipocampo pode ser dividido em duas sub-regiões distintas ao longo do eixo dorsoventral, o hipocampo dorsal (HD) e o hipocampo ventral (HV) (FANSELOW; DONG, 2010). O HD está relacionado a funções cognitivas, uma vez que lesões no HD levam ao déficit no desempenho comportamental em testes cognitivos (MORAES RESSTEL; DE AGUIAR CORRÊA; GUIMARÃES, 2008; MORAES-NETO et al., 2014). Em contrapartida, o HV tem sido associado ao estresse e emoções, uma vez que lesões no HV atenuam respostas ao estresse e comportamento (BANNERMAN et al., 2004). Outra sub-região encontrada no hipocampo é o hipocampo intermediário (HI) (FANSELOW; DONG, 2010), que apresenta características eletrofisiológicas e morfológica distintas do HV e HD. A porção intermediária parece ser crítica para exercer uma tradução rápida da memória espacial em comportamento adaptativo (BAST et al., 2009). Considera-se, portanto, o hipocampo como uma estrutura não-homogênea (MALIK et al., 2016).

O hipocampo envia projeções a regiões encefálicas envolvidas com comportamento de defesa e respostas cardiovasculares (RISOLD; SWANSON, 1997). Estudos do nosso grupo (Scopinho et al.2013) mostram que a neurotransmissão local no HD e no HV tem influências similares nas respostas autonômicas associadas ao estresse de restrição aguda. O estresse de restrição é um modelo experimental amplamente utilizado no estudo de respostas autonômicas ao estresse agudo, caracterizando uma situação aversiva inescapável. Nesse estudo, a inibição da neurotransmissão com o CoCl_2 no HD ou no HV foi capaz de atenuar as respostas hipertensoras e taquicárdicas suscitadas pela exposição ao estresse de restrição quando comparados ao grupo controle.

Ainda em nosso grupo de pesquisa, um estudo desenvolvido por Resstel e colaboradores (2008), mostra a participação do HD na modulação das respostas autonômicas frente ao medo condicionado ao contexto (MCC). O MCC é uma forma de aprendizado associativo onde o animal é reexposto ao ambiente (contexto) em que anteriormente foi pareado um estímulo aversivo (choque nas patas) (BUCCAFUSCO, 2001). Nesse estudo foi administrada uma dose (1mmol/L em 500nL) do CoCl_2 bilateralmente no HD, em diferentes momentos das sessões de pré-condicionamento, condicionamento e na sessão de teste. Foram observadas atenuação das respostas hipertensoras e taquicárdicas produzidas pelo MCC no grupo tratado com o CoCl_2 em comparação ao grupo veículo, porém sem alteração nas respostas comportamentais. Além disso, um estudo recente de nosso grupo mostra que o sistema endocanabinóide, por meio do receptor canabinóide do tipo 1 (CB1) presente no HD modula a resposta emocional condicionada em ratos (respostas cardiovasculares e comportamentais), alterando a liberação de neurotransmissores como o GABA, o glutamato e o óxido nítrico (SPIACCI et al., 2016).

O conjunto de evidências tanto de estudos comportamentais quanto de modulação autonômica aponta para a participação do hipocampo, particularmente da sua porção dorsal, na modulação de respostas cardiovasculares frente a situações aversivas e na modulação dos reflexos cardiovasculares. No entanto, permanece inexplorado o papel de outros

sistemas de neurotransmissão no hipocampo na modulação das respostas quimiorreflexas.

1.3 NEUROTRANSMISSÃO COLINÉRGICA NO HIPOCAMPO

As duas principais fontes de ACh no cérebro incluem projeções de neurônios que inervam áreas distais e interneurônios locais que são intercaladas entre os seus alvos celulares. Projeções de neurônios colinérgicos são encontrados em núcleos em todo o cérebro, como as áreas pedúnculo pontino e área tegmental laterodorsal, habenula medial e o complexo prosencefálico basal (Figura 3) (PAUL et al., 2015; PICCIOTTO; HIGLEY; MINEUR, 2012).

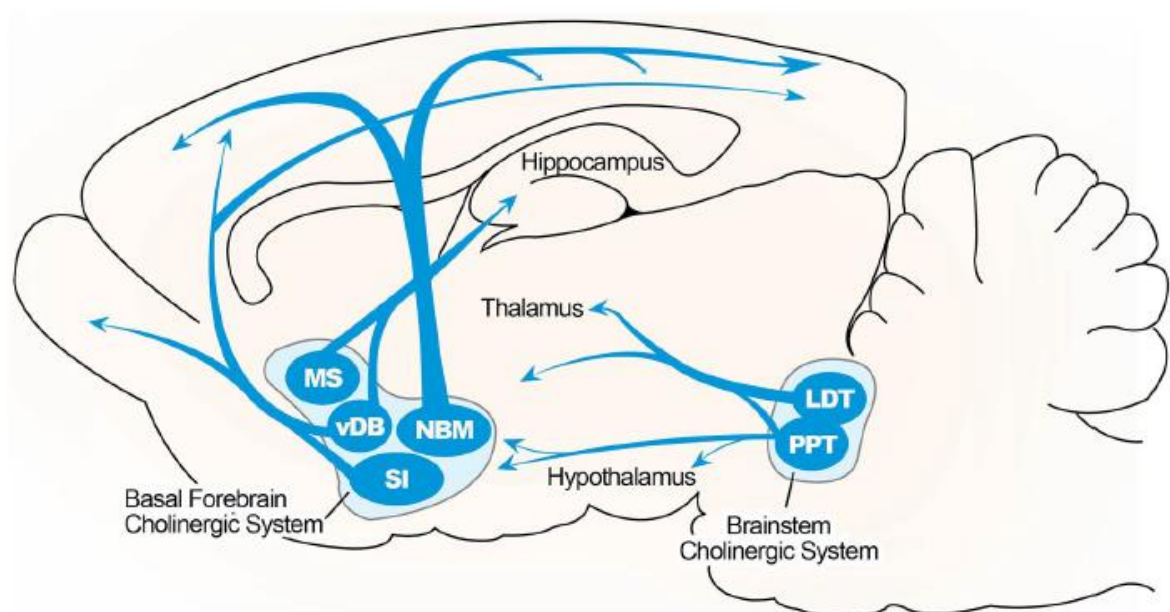


Figura 3: Visão geral das projeções de neurônios colinérgicos no encéfalo de rato. MS (Septo Medial); vDB (Banda Diagonal de Broca); NBM (Núcleo Basal de Meynert); SI (Substância Inominata); LDT (núcleo laterodorsal tegmental); PPT (núcleo pedunculopontino tegmental). Fonte: Retirado de PAUL et al., 2015.

A neurotransmissão colinérgica no hipocampo de ratos é oriunda, principalmente, do complexo prosencefálico basal: a banda diagonal de Broca e o núcleo septal medial (PAUL et al., 2015; PICCIOTTO; HIGLEY; MINEUR,

2012). A via septo-hipocampal, proveniente desses dois núcleos, é a fonte principal da inervação colinérgica no hipocampo. O núcleo septal medial conecta-se ao hipocampo via fimbria e fórnix dorsal. A região CA1 e as células granulosas do giro denteado no HD recebem aferências da banda diagonal de Broca (PAUL et al., 2015). São encontrados receptores colinérgicos muscarínicos amplamente distribuídos ao longo do hipocampo, sendo esses dos subtipos M₁-M₄. Um estudo de marcação por imunohistoquímica (LEVEY et al., 1995) mostra que os receptores muscarínicos e seus subtipos estão distribuídos de maneira distinta. Os receptores M₁ são altamente expressos na área CA1. Os receptores M₂ estão principalmente localizados nos neurônios não-piramidais. Os receptores M₃ estão localizados nos neurônios piramidais e na terceira camada mais externa do giro denteado. Os receptores M₄, por sua vez, se encontram em neurônios não-piramidais e na terceira camada mais interna da camada molecular. Essa distribuição diferenciada dos subtipos de receptores muscarínicos sugere um papel diferenciado da modulação colinérgica nos circuitos excitatórios e inibitórios do hipocampo (Levey et al., 1995).

A neurotransmissão colinérgica no hipocampo está relacionada a alguns tipos de memória e aprendizado, logo a degeneração dessa neurotransmissão leva a déficits cognitivos, semelhantes ao quadro clínico na DA (LEVEY et al., 1991, 1995). Adicionalmente, a neurotransmissão colinérgica no hipocampo também parece exercer um papel na modulação cardiovascular. Em um estudo realizado por Hori e colaboradores(1995), observou-se um aumento da PA e uma diminuição da FC em ratos por meio da estimulação de receptores colinérgicos por agonistas muscarínicos ou inibidores da acetilcolinesterase (AChE) no HD. Nesse mesmo estudo, a estimulação é bloqueada pela administração de metilatropina, um antagonista muscarínico não-seletivo. Esses dados sugerem que a neurotransmissão colinérgica no HD poderia participar na modulação de respostas cardiovasculares.

A ativação da neurotransmissão colinérgica septo-hipocampal é considerada como um dos aspectos importantes nas respostas adaptativas frente ao estresse e é influenciada por estímulos hormonais e neurais. Relatos na literatura indicam que o estresse agudo aumenta a liberação de ACh e induz a expressão de genes que regulam a disponibilidade de ACh no hipocampo e

no córtex pré-frontal, mostrando que a transmissão colinérgica no hipocampo também parece participar das respostas de estresse (GILAD et al., 1985; MARK; RADA; SHORS, 1996; PAUL et al., 2015)

Em um estudo do nosso grupo de pesquisa (ANTERO, 2013), é observada a participação da neurotransmissão colinérgica presente no HD de ratos na modulação de respostas autonômicas e comportamentais frente ao MCC. Nesse estudo foram utilizadas drogas que interferem com a neurotransmissão colinérgica, como o hemicolínio, atropina, *J104129 fumarate* e pirenzepina. Em relação às respostas autonômicas cardiovasculares, a microinjeção bilateral de hemicolínio, inibidor da captação de colina, no HD foi capaz de atenuar o aumento da PAM e FC induzidos pelo MCC. A atenuação das respostas cardiovasculares foi observada de igual maneira com a administração de atropina, antagonista não seletivo de receptores muscarínicos, de forma dose-dependente. A microinjeção de diferentes doses de *J104129 fumarate*, antagonista de receptores muscarínicos M_1/M_3 , atenuou a elevação da PAM, FC durante a re-exposição ao contexto aversivo. Foi utilizado um antagonista de maior afinidade para os receptores muscarínicos M_1 , a pirenzepina. A microinjeção de pirenzepina foi capaz de atenuar as respostas autonômicas, induzidas pelo MCC, sugerindo que os receptores muscarínicos do tipo M_1 presentes no HD estão envolvidos com as respostas autonômicas.

Os dados citados mostram uma relevante participação da neurotransmissão colinérgica no HD na modulação de respostas autonômicas cardiovasculares frente às situações aversivas. Entretanto, a participação desse sistema frente à ativação do quimiorreflexo permanecia inexplorada. Deste modo, a hipótese do nosso estudo é de que a transmissão colinérgica no HD interfere com a resposta cardiovascular induzida pela estimulação do quimiorreflexo.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO PRINCIPAL

- ✓ Avaliar o envolvimento da neurotransmissão colinérgica presente no HD na modulação das respostas cardiovasculares e respiratórias induzidas pela ativação do quimiorreflexo.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Avaliar os efeitos da inibição da captação de colina, pela administração de hemicolínio, nas respostas cardiorrespiratórias do quimiorreflexo.
- ✓ Avaliar os efeitos do bloqueio de receptores muscarínicos, pela administração de atropina, nas respostas cardiorrespiratórias do quimiorreflexo.
- ✓ Avaliar os efeitos do bloqueio de receptores muscarínicos M_1/M_3 , pela administração de *J104129 fumarate*, nas respostas cardiorrespiratórias do quimiorreflexo.
- ✓ Avaliar os efeitos do bloqueio de receptor muscarínico M_1 , pela administração de pirenzepina, nas respostas cardiorrespiratórias do quimiorreflexo.

MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados ratos Wistar (n=94) pesando entre 280-340g obtidos do Biotério Central da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES). Os animais receberam água e dieta sólida *ad libitum* e foram acomodados em ambiente sob condições controladas de temperatura (22-25°C) e ciclo claro/escuro de 12 horas. Para cada protocolo experimental com as diferentes drogas utilizadas neste estudo, os animais foram divididos em dois grupos: Grupo controle e Grupo tratamento. O protocolo de experimentação animal foi submetido à avaliação e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Centro de Ciências da Saúde (CCS) da UFES (Protocolo nº13/2015).

3.2 IMPLANTE DE CÂNULAS-GUIA PARA O HD

Os ratos foram anestesiados com Tribromoetanol (250 mg/kg) e, em seguida, foram submetidos a tricotomia na região do crânio para a cirurgia estereotáxica. Uma vez posicionados no aparelho estereotáxico e fixados na posição plana por meio de duas barras auriculares, foi aplicada por via subcutânea solução de lidocaína 2% com vasoconstritor, com o objetivo de minimizar o sangramento no momento da incisão cirúrgica. Seguido da assepsia com solução de álcool a 70°GL foi feita a exposição da calota craniana por incisão.

Uma vez exposta a calota craniana, foi feita a limpeza com solução de peróxido de oxigênio e foi removido o periósteo. Foram feitos quatro orifícios com o auxílio de uma broca odontológica para o implante bilateral de cânulas de aço inoxidável. Dois desses orifícios se destinaram ao implante de pequenos parafusos de aço inoxidável para assegurar uma melhor fixação com a resina odontológica, e os orifícios restantes foram feitos para o implante das cânulas-guia.

A torre do aparelho estereotáxico foi colocada na posição vertical, ou seja, no ângulo zero. Foram fixadas as cânulas-guia de 11mm no canhão da torre do aparelho estereotáxico. Os pontos de introdução das cânulas-guia foram calculados seguindo as seguintes coordenadas estereotáxicas: incisivo: -2.5mm, ântero-posterior: -4.0 mm em relação ao Bregma; lateral: +2.8 mm em relação à Sutura Sagital; vertical: -2.1 mm em relação à estrutura óssea da calota craniana, referenciadas pelo Atlas de Paxinos & Watson (2006).

Ao final da cirurgia, os ratos receberam dose de antibiótico por via intramuscular (Multibiótico Veterinário - Benzilpenicilina e Estreptomicina 1.200.000 UI) na dose de 0,1mL/100g, bem como uma dose por via subcutânea de analgésico e anti-inflamatório (Banamine® -Flunixinina meglumina) na dose de 2,2mg/kg de rato (50mg/mL). (ANTERO, 2013; KUNTZE, 2016; RESSTEL LEONARDO, JOCA SAMIA , CORRÊA FERNANDO MORGAN, 2008; SCOPINHO et al., 2013)

3.3 CANULAÇÃO DA ARTÉRIA E VEIA FEMORAIS

Três dias após a cirurgia estereotáxica, os animais foram novamente anestesiados com Tribromoetanol (250mg/Kg, i.p) e submetidos à cirurgia para implantação de duas cânulas de polietileno previamente preenchidas com salina e anticoagulante, sendo uma na artéria femoral e a outra na veia femoral. A cânula é constituída por um segmento de polietileno PE-10 soldado a outro segmento de polietileno PE-50.

Os animais foram submetidos à tricotomia na região inguinal, em seguida, foi realizada assepsia com solução de etanol a 70°GL. Foi realizada uma pequena incisão nessa região para acessar a artéria e veia femorais. Uma vez implantadas, as cânulas foram exteriorizadas com o auxílio de um trocáter para a região dorsal do rato. Em seguida, foram realizadas suturas nas regiões inguinal e dorsal do rato para a fixação das cânulas.

Após a cirurgia, foi administrado por via subcutânea analgésico e anti-inflamatório (Banamine®) na dose de 2,2 mg/kg de rato (50mg/mL).

Finalmente, os animais foram devidamente identificados e alojados individualmente em suas caixas. (ANTERO, 2013; KUNTZE, 2016; RESSTEL

LEONARDO, JOCA SAMIA , CORRÊA FERNANDO MORGAN, 2008; SCOPINHO et al., 2013).

3.4 DROGAS UTILIZADAS

Atropina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA, bloqueador não-seletivo de receptores muscarínicos), *J 104129 fumarate* (Tocris Bioscience, West woods, Business Park, Ellisville, MO, USA, antagonista seletivo para receptores muscarínicos M₁/M₃), hemicolínio (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA, inibidor da captação de colina) e pirenzepina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA, antagonista seletivo para receptores muscarínicos M₁).

3.5 MICROINJEÇÃO DE DROGAS NO HD

As drogas foram administradas sendo as doses e o modo de microinjeção referenciadas por dados publicados por nosso grupo (ANTERO, 2013; MORAES-NETO et al., 2014; SCOPINHO et al., 2013). A microinjeção foi realizada diretamente na porção dorsal do hipocampo por meio de uma agulha microinjetora de metal (gauge 33) conectada a uma seringa de 10 µl (Hamilton, Reno, NV, USA) por um segmento de tubo de polietileno (PE-10). As drogas foram diluídas em salina e o volume final microinjetado em cada lado do HD foi de 500 nL. As doses utilizadas foram: hemicolínio (1 nmol/500 nL); atropina (0,6 ; 6; 18; 30 nmol/500nL); *J104129 fumarate* (6 nmol/500nL); pirenzepina (6 nmol/500nL). (ANTERO, 2013)

3.6 REGISTROS CARDIOVASCULARES

No dia seguinte à cirurgia da canulação da artéria e veia femorais, a cânula arterial previamente heparinizada foi conectada a um transdutor de pressão, conectado a um amplificador. O sinal foi digitalizado em um computador com o software adequado (PowerLab, ADInstruments, Bella Vista, NSW, Australia). Os registros gerados correspondem aos dados de pressão

arterial pulsátil (PAP), a partir dos quais foram derivadas a pressão arterial média (PAM) e a frequência cardíaca (FC).

3.7 ESTIMULAÇÃO DE QUIMIORRECEPTORES PERIFÉRICOS

Ratos não-anestesiados foram submetidos à administração de solução de cianeto de potássio (KCN; 40 µg/0,05 mL/rato) pela cânula implantada na veia femoral. O KCN promove hipóxia citotóxica (FRANCHINI, 1992; FRANCHINI; KRIEGER, 1993; HAIBARA; BONAGAMBA; MACHADO, 1999) e respostas similares àquelas provocadas pela ativação de quadros hipóxicos,

3.8 REGISTRO DA VENTILAÇÃO E ANÁLISE DOS DADOS

O método de pletismografia foi utilizado para medir os parâmetros ventilatórios (MORTOLA; FRAPPELL, 1998, 2013). O animal foi colocado na câmara pletismográfica, que consiste em uma câmara de acrílico rígida vedada. As oscilações de pressão no interior da câmara foram utilizadas para o cálculo dos parâmetros ventilatórios e foram captadas por meio de um transdutor de pressão diferencial (ML141 Spirometer, PowerLab, ADInstruments, Bella Vista, NSW, Australia) acoplado à câmara, cujo sinal foi amplificado pelo software de aquisição de dados (PowerLab, ADInstruments, Bella Vista, NSW, Australia).

De posse do registro gerado, foi calculado o volume corrente (V_T), parâmetro que indica o volume de ar inspirado ou expirado em cada movimento respiratório, e a ventilação minuto (V_E), o volume de ar trocado por minuto.

3.9 ANÁLISE DA FREQUÊNCIA RESPIRATÓRIA

A frequência respiratória (f_R) foi calculada manualmente uma vez que após a administração de KCN ocorre a resposta comportamental de exploração devido a hipóxia citotóxica. Além disso, deve-se observar a movimentação natural do animal. As oscilações de pressão produzidas pela respiração do animal dentro da câmara foram registradas nos intervalos de 20 segundos

antes e 20 segundos após a injeção intravenosa de KCN. A quantificação da f_R foi realizada a cada intervalo de 2 segundos.

3.10 ANÁLISE DO VOLUME CORRENTE E DA VENTILAÇÃO MINUTO NOS ANIMAIS

Foram calculados os valores basais de V_T e V_E dos animais antes das microinjeções de drogas levando-se em consideração os registros correspondentes ao intervalo de 20 segundos antes da administração de KCN no período controle, 10 e 60 minutos após a administração das drogas no HD. Estes cálculos foram efetuados a partir das equações de Drorbaugh e Fenn (DRORBAUGH; FENN, 1955) (Figura 4). Somente a f_R foi avaliada após a ativação do quimiorreflexo, pois a resposta comportamental de exploração induzida pelo KCN leva ao aumento da linha de base do sinal respiratório, prejudicando a análise V_T e V_E .

Para a obtenção de uma análise confiável dos parâmetros respiratórios, o animal permaneceu em estado de repouso e quieto. A movimentação do animal interfere na captação e análise fidedigna dos ciclos respiratórios, sendo esse um fator limitante da técnica. Portanto, os animais foram previamente ambientados ao sistema durante pelo menos 30 minutos antes do início dos experimentos e somente aqueles que se apresentaram em repouso foram submetidos à experimentação.

$$V_T (\text{mL.Kg}^{-1}) = V_K \times \frac{P_T}{P_K} \times \frac{T_C (P_B - P_A)}{T_C (P_B - P_A) - T_A (P_B - P_C)}$$

$$V_E (\text{mL.Kg}^{-1}.\text{min}^{-1}) = V_T (\text{mL.Kg}^{-1}) \times f_R (\text{cpm})$$

Onde:

V_K : Volume de ar injetado na câmara do animal para calibração

P_T : Deflexão de pressão associada com cada volume de ar corrente

P_K : Deflexão de pressão com cada volume de ar injetado para calibração

T_C : Temperatura corporal

T_A : Temperatura do ar dentro da câmara do animal

P_B : Pressão barométrica

P_C : Pressão de vapor d'água à temperatura corporal

P_A : Pressão de vapor d'água à temperatura da câmara

Figura 4: Equação de Drorbaugh e Fenn(1955)

3.11 REGISTROS SIMULTÂNEOS DA PA, FC E VENTILAÇÃO

A pletismografia de corpo inteiro foi utilizada em ratos não-anestesiados, a fim de que os parâmetros cardiovasculares e respiratórios fossem registrados, tanto em condições basais quanto em resposta à ativação do quimiorreflexo, simultaneamente. Vinte e quatro horas após a cirurgia de canulação da artéria e veia femoral, os animais foram colocados dentro da câmara de pletismografia. Durante a ambientação do animal na câmara pletismográfica, a câmara foi mantida aberta para permitir o fluxo de ar. Após a ambientação, as cânulas foram exteriorizadas por um orifício na tampa da câmara, permitindo que a cânula arterial fosse conectada ao transdutor de pressão para registrar a PAP, ao passo que, o outro orifício da tampa da câmara foi conectado ao transdutor das variações de pressão pletismográficas para quantificar os parâmetros ventilatórios. Ambos os transdutores foram acoplados ao sistema de aquisição de dados. Durante a execução dos protocolos experimentais a câmara pletismográfica permaneceu fechada por no máximo 2 minutos. Após a ativação do quimiorreflexo com KCN, a câmara foi reaberta permitindo a completa troca do ar.

Para a ativação do quimiorreflexo foram administradas injeções intravenosas de KCN ($40 \mu\text{g}/0,05 \text{ mL}/\text{rato}$) por meio da cânula inserida na veia femoral conectada a uma extensão de polietileno (PE-50), previamente exteriorizada por meio do orifício na parte superior da tampa da câmara.

A câmara pletismográfica foi fechada e a administração de KCN foi realizada quando o animal estava em repouso. Para as microinjeções das drogas no HD, a câmara pletismográfica foi aberta e por esse motivo, somente os registros cardiovasculares foram realizados.



Figura 5: Foto de um animal não anestesiado no interior da câmara pletismográfica durante o experimento.

3.12 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

No dia do experimento, os animais foram divididos em dois grupos: Grupo controle e Grupo tratamento. Os animais do grupo controle receberam solução de salina intra-HD, ao passo que, os animais do grupo tratamento receberam as drogas anticolinérgicas. As drogas ou veículo foram administradas bilateralmente no HD em volume de 500 nL, diluídas em solução de salina. As temperaturas da câmara pletismográfica e da sala foram monitoradas e registradas. As respostas reflexas hipertensora, bradicárdica, hiper e taquipnéicas frente à administração intravenosa de KCN ($40 \mu\text{L}/0,05 \text{ mL}/\text{rato}$) foram observadas. Uma vez realizado o registro, os animais receberam a microinjeção das drogas. Uma nova administração de KCN foi

realizada 10 minutos após o tratamento farmacológico com o objetivo de avaliar a ativação quimiorreflexa após a manipulação farmacológica.

Sessenta minutos após a microinjeção das drogas foi administrado novamente o KCN para verificar a normalização das respostas do quimiorreflexo.

3.12.1 Efeito da administração bilateral de hemicolínio no HD

O hemicolínio (inibidor da captação de colina) foi administrado na dose de 1 nmol/500 nL no HD. Este protocolo teve como objetivo verificar os efeitos da redução dos níveis de acetilcolina (ACh) sobre as respostas do quimiorreflexo.

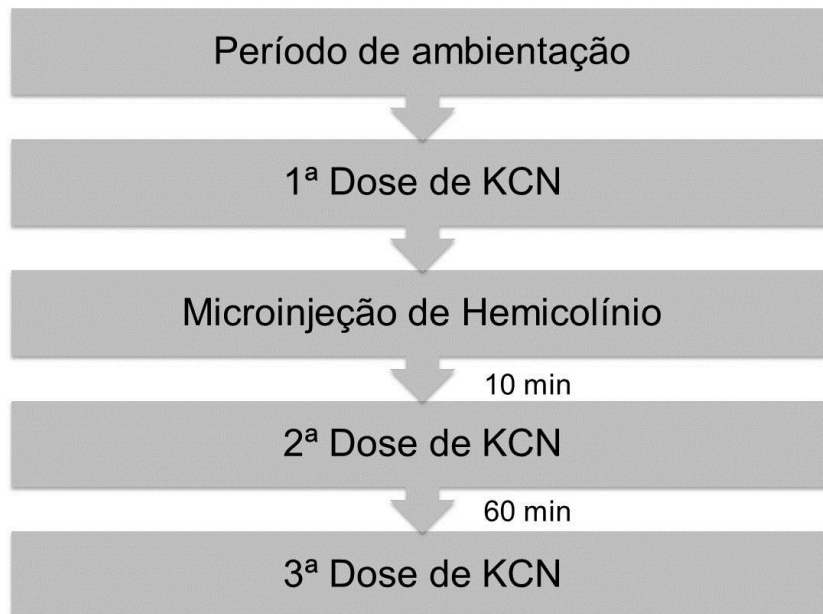


Figura 6: Etapas seguidas no protocolo de microinjeção de hemicolínio no HD.

3.12.2 Efeito da administração bilateral de atropina no HD

Com objetivo de avaliar a participação dos receptores muscarínicos no HD sobre a modulação do quimiorreflexo, a atropina (antagonista de receptores muscarínicos) foi administrada nas doses de 0,6; 6; 18; e 30nmol/500nL bilateralmente no HD.

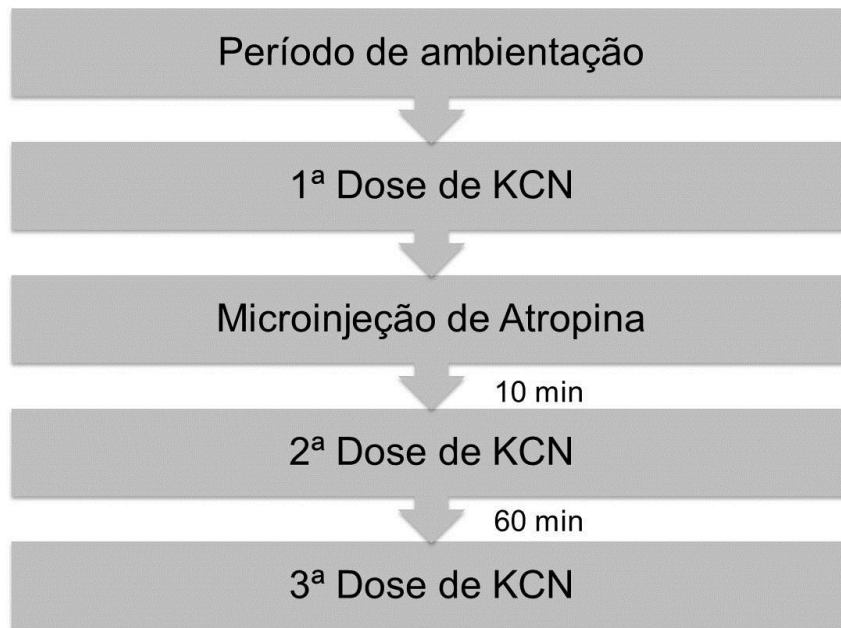


Figura 7: Etapas seguidas no protocolo de microinjeção de atropina no HD.

3.12.3 Efeito da administração bilateral de *J104129 Fumarate* no HD

A administração de *J104129 fumarate* foi realizada na dose 6 nmol/500 nL bilateralmente no HD, com objetivo de avaliar a participação de receptores muscarínicos M₁/M₃, sobre as respostas ativadas pelo quimiorreflexo periférico.

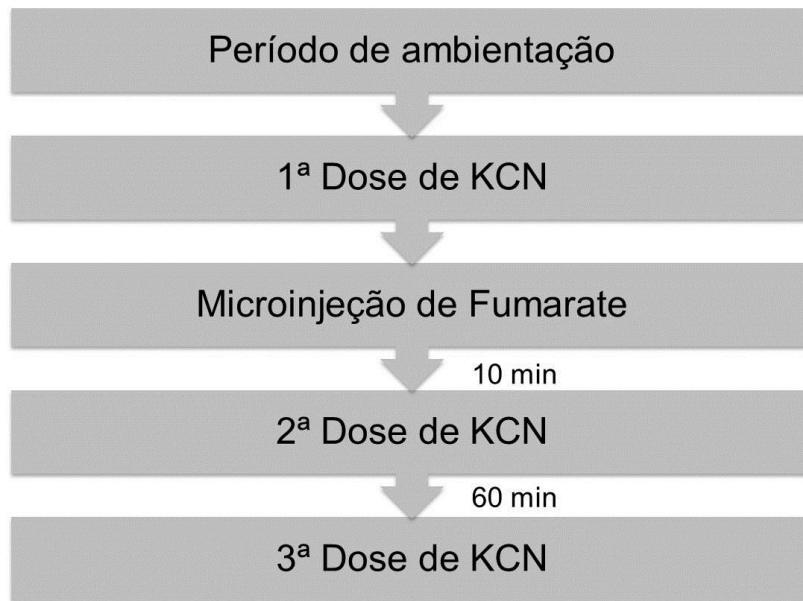


Figura 8: Etapas seguidas no protocolo de microinjeção de *J104129 Fumarate* no HD.

3.12.4 Efeito da administração bilateral de Pirenzepina no HD

Com objetivo de avaliar a participação dos receptores muscarínicos M_1 sobre o quimiorreflexo, a pirenzepina (antagonista de receptores muscarínicos M_1) foi administrada na dose de 6nmol/500 nL bilateralmente no HD

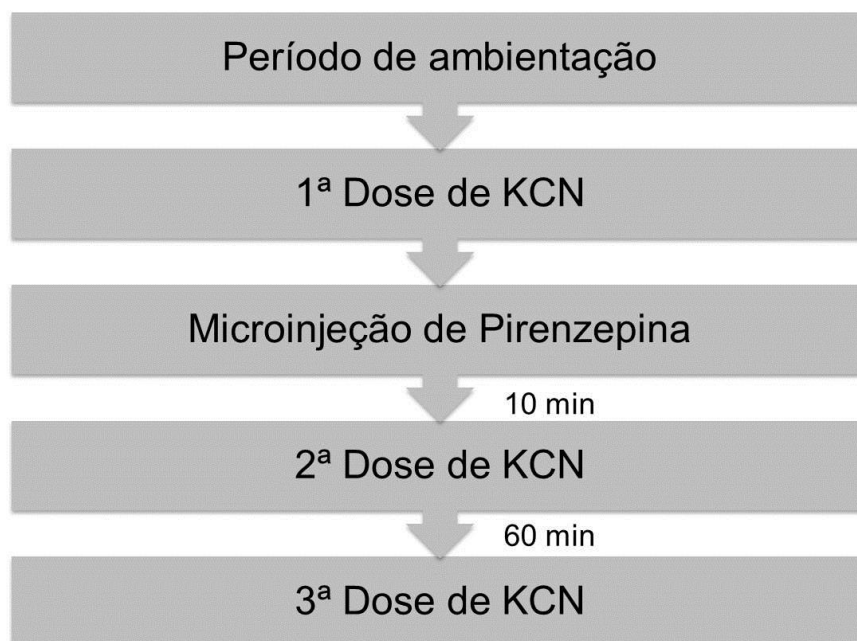


Figura 9: Etapas seguidas no protocolo de microinjeção de Pirenzepina no HD.

3.13 DETERMINAÇÃO HISTOLÓGICA DOS SÍTIOS DE MICROINJEÇÃO

Após a realização dos experimentos, os animais receberam dose anestésica de uretana (1,25 g/kg, i.p.) e foi realizada a perfusão intracardíaca. No primeiro momento, a perfusão foi feita com 20 mL de solução salina (NaCl 0,9%). Em seguida, foi realizada a infusão com solução de formol a 10%. Em seguida, foi microinjetado 500 nL do corante de azul de metileno no mesmo local onde foram feitas as microinjeções das drogas.

Após a microinjeção do corante, os encéfalos foram retirados e armazenados em tubos Falcon por 48h a 4°C na própria solução de perfusão.

Após 48h os encéfalos foram seccionados em criostato nas áreas do HD no Laboratório de Histologia e Imunohistoquímica (LHMI) da UFES.

Os cortes seriais foram analisados em microscópio óptico. Somente os animais que apresentaram os centros das microinjeções no HD tiveram resultados computados para fins de avaliação dos efeitos sobre as respostas do quimiorreflexo.

3.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). A análise estatística dos valores basais de PAM e FC dos grupos experimentais foram comparados aos valores obtidos pelos grupos controle em cada protocolo experimental, ao passo que para a análise estatística dos parâmetros ventilatórios (f_R , V_T e V_E) basais foi considerada a média dos 10 pontos obtidos (a cada 2 segundos) antes das administrações de KCN.

A magnitude das respostas cardiovasculares e de aumento da f_R perante à ativação do quimiorreflexo foram avaliadas no das pico respostas. Como teste estatístico foi utilizado a análise de variância (ANOVA) de duas vias para medidas repetidas seguida do pós-teste de *Bonferroni* para múltiplas comparações. A análise estatística e os gráficos foram feitos utilizando o software GraphPad Prism 5. O nível de significância foi fixado em $p < 0,05$.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 LOCALIZAÇÃO DOS SÍTIOS DE MICROINJEÇÃO

A Figura 10 mostra uma fotomicrografia representativa do trajeto das microinjetoras inseridas bilateralmente intra-HD e a figura 11 representa o diagrama de secções do HD (modificado de Paxinos e Watson, 1997), indicando os sítios de injeção de drogas no HD dos animais utilizados nos diferentes protocolos estudados. Como podemos observar, os animais considerados na análise estatística tiveram seus sítios de microinjeção localizados no HD.

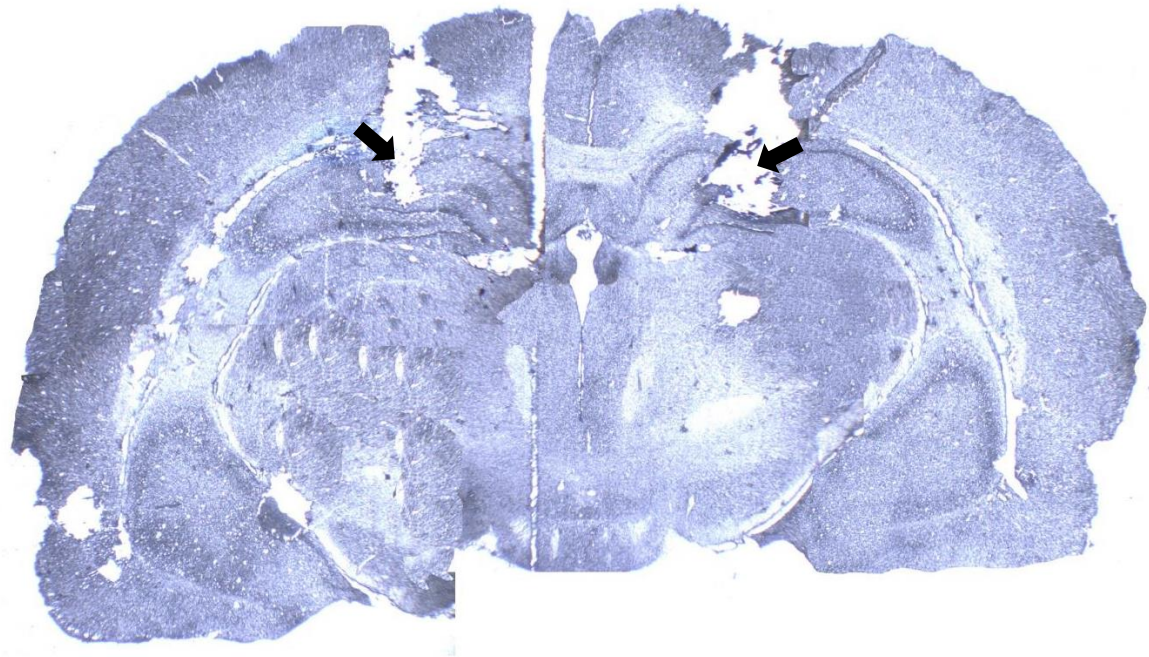


Figura 10: Fotomicrografia de uma secção coronal do cérebro de um rato mostrando os sítios de injeção no HD.

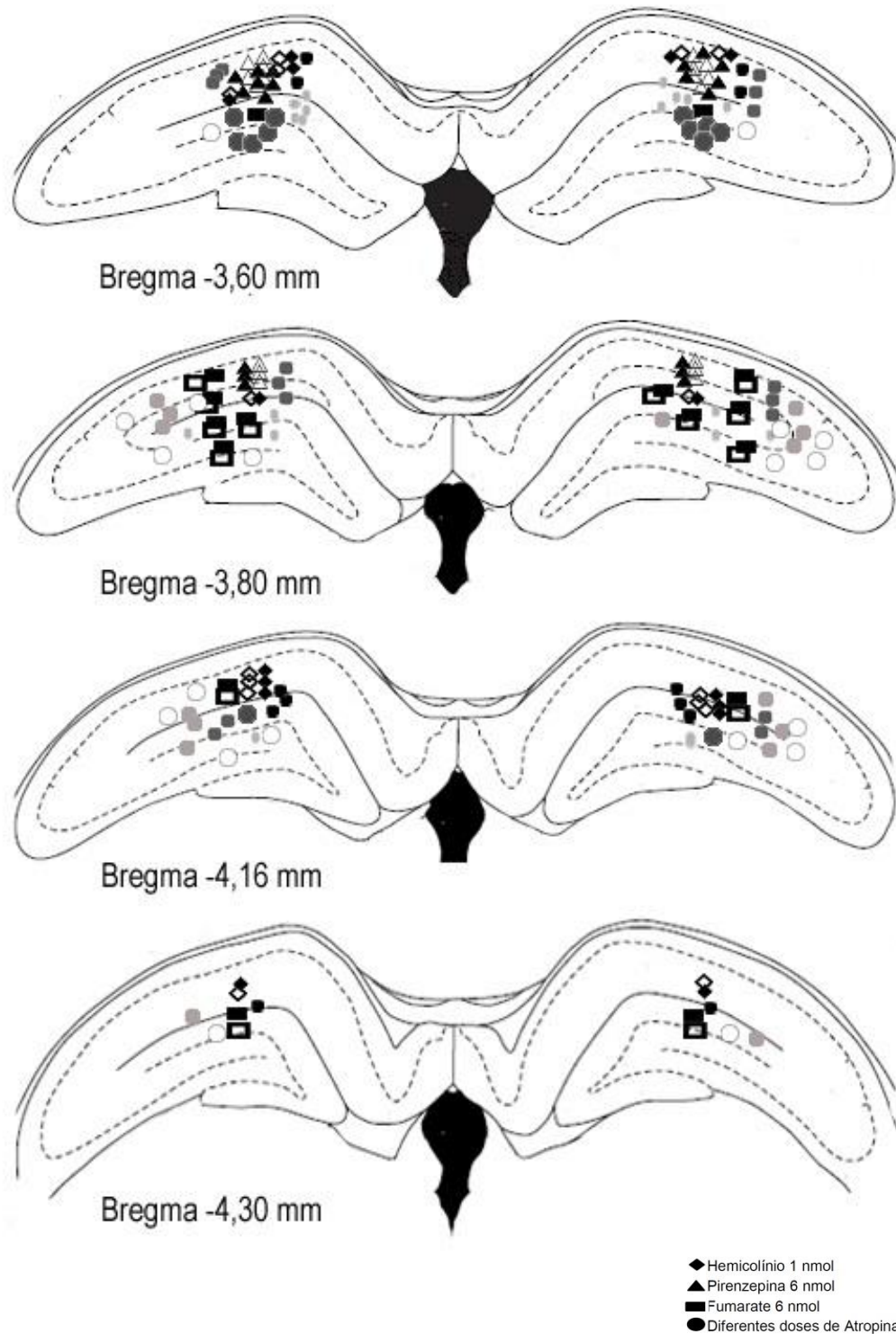


Figura 11: Diagrama representativo de um grupo de secções coronais do encéfalo de rato representando os sítios de microinjeção bilateral no HD com base no atlas *The Rat Brain* de Paxinos e Watson (2007). O número de pontos não coincide com o número de animais, pois há sobreposição de pontos.

4.2 RESPOSTAS CARDIORESPIRATÓRIAS FRENTE À ATIVAÇÃO DO QUIMIORREFLEXO EM RATOS NÃO-ANESTESIADOS.

A ativação do quimiorreflexo pela infusão intravenosa de KCN promoveu respostas hipertensora, bradicárdica, hiper e taquipnéica, como pode ser evidenciado no traçado típico representado na figura 12.

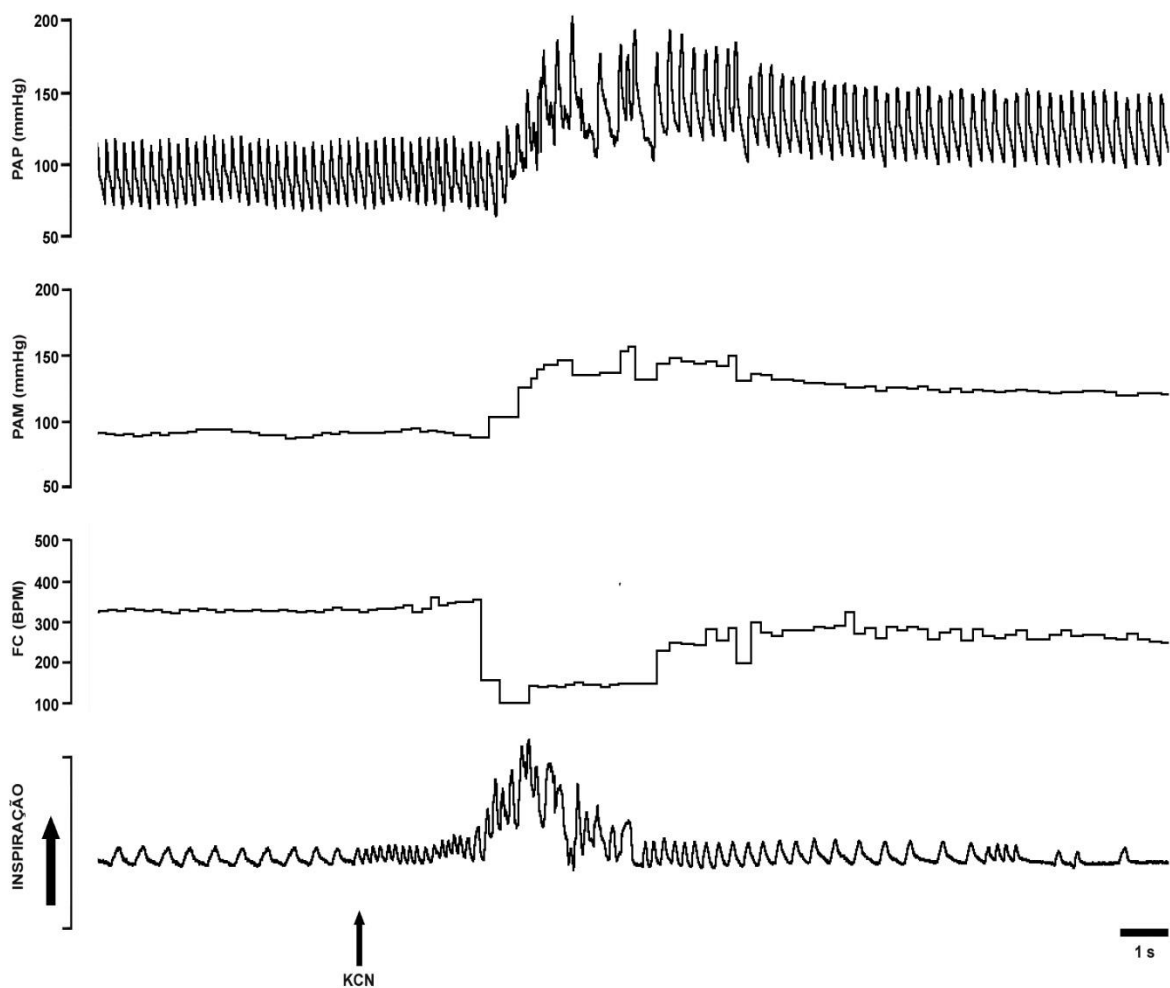


Figura 12: Traçado típico de um animal representativo do grupo controle, ilustrando as respostas cardiorrespiratórias obtidas frente à ativação do quimiorreflexo com a infusão intravenosa de KCN (40 μ g/0,05mL). PAP, pressão arterial pulsátil (mmHg), PAM, pressão arterial média (mmHg), FC, frequência cardíaca (BPM). O início da infusão de KCN é indicado pela seta.

4.3 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO BILATERAL NO HD DO INIBIDOR DA CAPTAÇÃO DE COLINA, HEMICOLÍNIO, SOBRE OS PARÂMETROS CARDIORESPIRATÓRIOS BASAIS E INDUZIDOS PELA ATIVAÇÃO DO QUIMIORREFLEXO.

Os valores basais de PAM, FC, V_T , V_E e f_R , quantificados nos animais microinjetados com hemicolínio (1 nmol/500 nL) (n=10) no HD, não diferiram dos animais microinjetados somente com veículo (n=8) (PAM: $F_{1,16}=0,01$; $p>0,05$; $FC_{1,16}$: 0,12; $p>0,05$ V_T : $F_{1,16}= 0,39$; $p>0,05$; V_E : $F_{1,16}= 0,05$; $p>0,05$; f_R basal: $F_{1,16}=0,001$, $p>0,05$), não diferiram em relação aos tempos avaliados (PAM: $F_{2,16}=4,25$, $p>0,05$; FC: $F_{2,16}= 5,20$; V_T : $F_{2,16}= 0,01$; $p>0,05$; V_E : $F_{2,16}= 0,05$; $p>0,05$; f_R basal: $F_{2,16}= 0,13$; $p>0,05$), assim como não houve interação entre o tratamento e o tempo (PAM: $F_{2,16} =0,49$; $p>0,05$ FC: $F_{2,16}= 1,03$; $p>0,05$; V_T : $F_{2,16}= 7,63$; $p>0,05$; V_E : $F_{2,16}= 1,70$; $p>0,05$; f_R basal ($F_{2,16}= 0,25$; $p>0,05$) (Figura 13).

A resposta hipertensora do quimiorreflexo não diferiu entre animais microinjetados com hemicolínio ou veículo (tratamento: $F_{1,16}= 1,16$; $p>0,05$; ANOVA de duas vias), não diferiu em relação aos diferentes tempos avaliados ($F_{2,16}= 2,49$; $p>0,05$; ANOVA de duas vias), assim como não houve interação entre o fator tratamento e o tempo ($F_{2,16}= 0,09$; $p>0,05$; ANOVA de duas vias) (Figura 14, A).

Quanto a bradicardia quimiorreflexa, também não foi observada diferença estatisticamente significativa entre animais controle e injetados com hemicolínio ($F_{1,16}= 1,44$; $p>0,05$), assim como não houve diferença nos tempos avaliados ($F_{2,16}= 5,98$; $p>0,05$) ou interação entre o tratamento e o tempo ($F_{2,16}= 0,12$; $p>0,05$) (Figura 14, B).

Em relação à resposta taquipnéica do quimiorreflexo, a microinjeção com hemicolínio no HD não promoveu alterações em comparação aos animais injetados com veículo ($F_{1,16}= 0,18$; $p>0,05$, ANOVA duas vias), assim como não foram observadas diferenças nos diferentes tempos ($F_{2,16}= 0,20$; $p>0,05$,

ANOVA de duas vias) ou interação entre o tratamento e o tempo ($F_{2,16} = 0,46$; $p > 0,05$) (Figura 14, C).

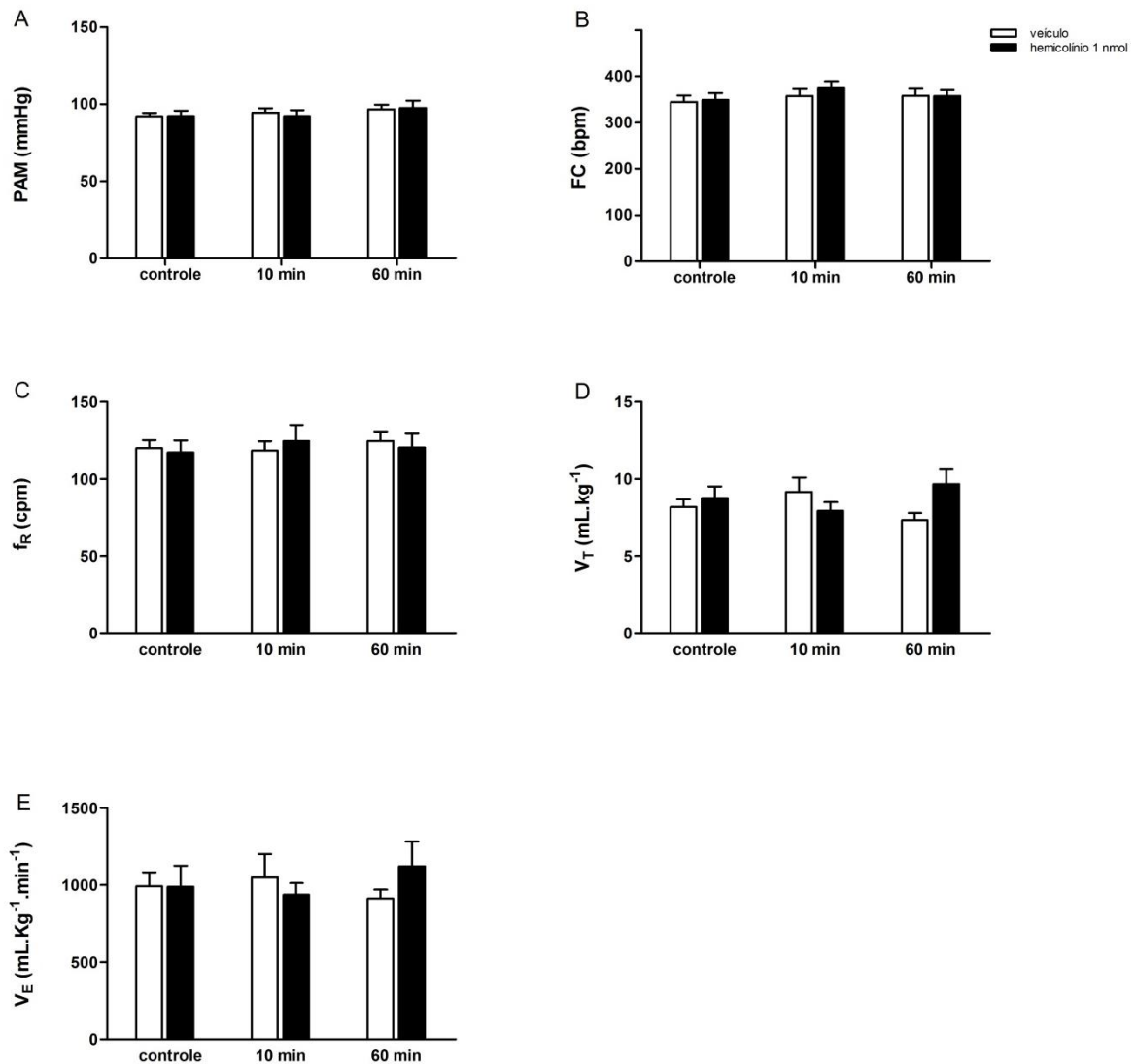


Figura 13: Efeitos da administração bilateral de hemicolinio no HD sobre os parâmetros cardiorrespiratórios basais. A) Pressão arterial média (PAM, mmHg); B) Frequência cardíaca (FC, bpm), C) Frequência respiratória (f_R , cpm), D) Volume corrente (V_T , $\text{mL} \cdot \text{kg}^{-1}$); E) Volume minuto (V_E , $\text{mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) antes (controle), 10 minutos e 60 minutos após a microinjeção bilateral de hemicolinio (1 nmol/500 nL) no HD ($n=10$) ou veículo ($n=8$). Os dados são expressos como média \pm erro padrão da média. ANOVA de duas vias para medidas repetidas.

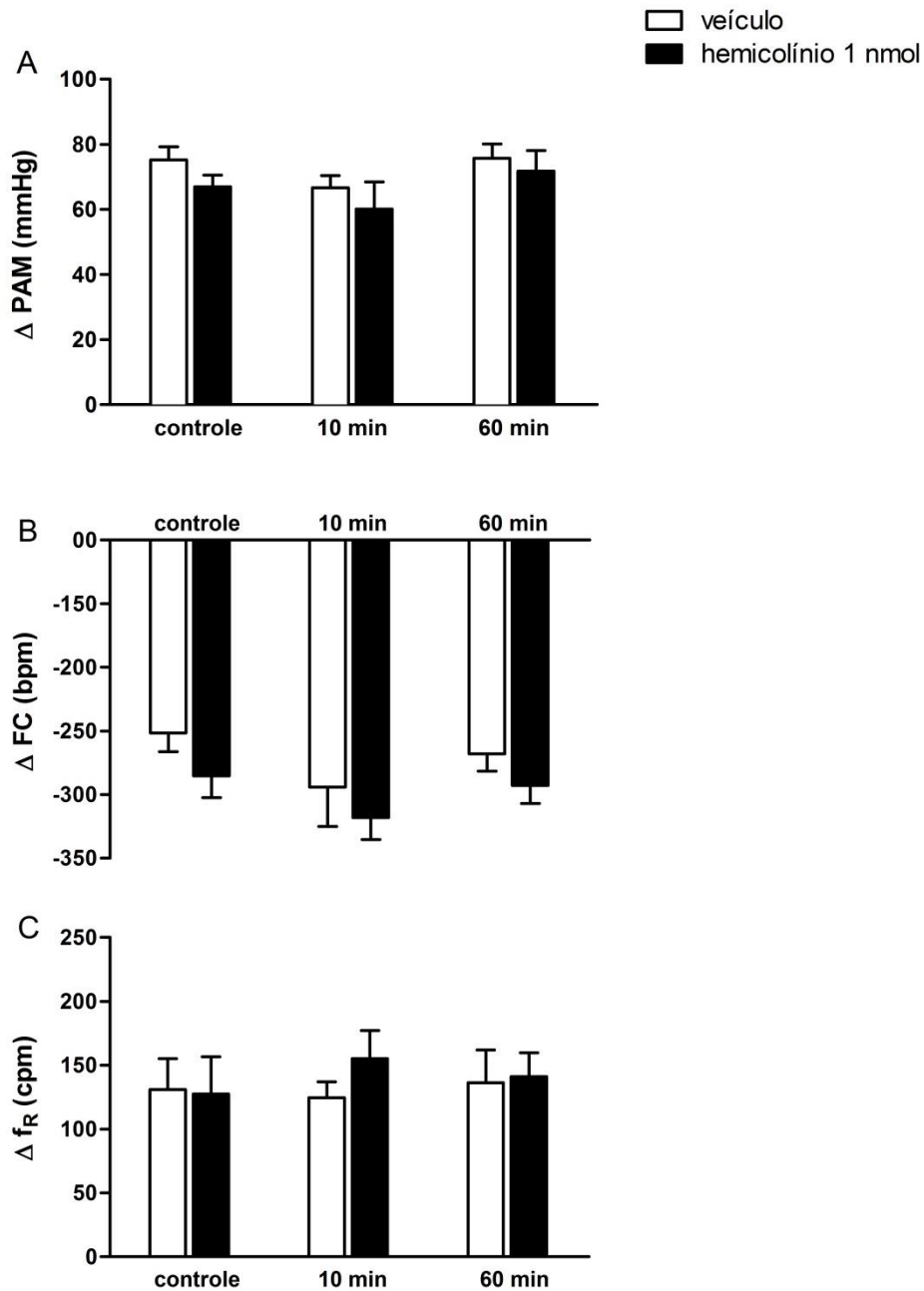


Figura 14: Variações de A) pressão arterial média (PAM, mmHg), B) frequência cardíaca (FC, batimentos por minuto), C) frequência respiratória (Δf_R , ciclos por minuto), frente à ativação do quimiorreflexo com infusão intravenosa de KCN (40 μ g; 0,05 mL) antes (controle), 10 minutos e 60 minutos após a microinjeção bilateral de veículo (n=6) ou hemicolinio no HD (1nmol em 500nL; n=10). Os dados são expressos como média \pm erro padrão da média. ANOVA de duas vias para medidas repetidas.

4.4 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO BILATERAL DE ATROPINA NO HD SOBRE OS PARÂMETROS CARDIORESPIRATÓRIOS BASAIS E INDUZIDOS PELA ATIVAÇÃO DO QUIMIORREFLEXO.

Os valores basais de PAM, FC, V_T , V_E e f_R , não diferiram entre animais injetados com diferentes doses de atropina (0,6 nmol, n= 7; 6 nmol, n= 9; 18 nmol, n= 9; 30 nmol, n = 9) ou somente com veículo (n=8) (PAM: $F_{4,37} = 0,43$; $p > 0,05$; FC: $F_{4,37} = 0,93$ $p > 0,05$; V_T : $F_{4,37} = 2,11$; $p > 0,05$; V_E : $F_{4,37} = 1,03$; $p > 0,05$; f_R : $F_{4,37} = 0,70$, $p > 0,05$), houve diferença no fator tempo, para a PAM e FC, o que não foi observado para as outras variáveis (PAM: $F_{2,37} = 10,41$ $p < 0,01$; FC: $F_{2,37} = 8,30$ $p < 0,01$; V_T : $F_{2,37} = 1,91$; $p > 0,05$, V_E : $F_{2,37} = 0,06$, $p > 0,05$, f_R : $F_{2,37} = 6,13$; $p > 0,05$), mas não houve interação entre o tratamento e o tempo (PAM: $F_{8,37} = 0,91$; FC: 0,86; $p > 0,05$; V_T : $F_{8,37} = 1,24$; $p > 0,05$; V_E : $F_{8,37} = 0,57$; $p > 0,05$; f_R basal ($F_{8,37} = 0,37$; $p > 0,05$) (Figura 15). A análise pós hoc da PAM basal para o fator tempo mostrou que no grupo atropina de 0,6 nmol a PAM basal foi maior aos 60 minutos em comparação com o valor controle ($p < 0,05$), enquanto que para a FC basal os valores aos 10 minutos dos grupos atropina de 6 e 18 nmol foram maiores do que os valores na situação controle ($p < 0,01$).

A administração de atropina nas quatro doses não alterou a magnitude da resposta pressora do quimiorreflexo ($F_{4,37} = 1,52$; $p > 0,05$; ANOVA de duas vias), assim como não foram observadas diferenças em relação aos tempos avaliados ($F_{2, 37} = 0,11$; $p > 0,05$) ou interação entre o tratamento e o tempo ($F_{8,37} = 1,04$; $p > 0,05$) (Figura 16, A). De modo similar, a ANOVA de duas vias não detectou diferenças significantes na resposta bradicárdica do quimiorreflexo entre os animais administrados com atropina ou veículo ($F_{4,37} = 0,81$; $p > 0,05$), houve diferença da resposta nos tempos avaliados ($F_{2,37} = 6,92$; $p < 0,01$), mas não houve interação entre o tratamento e o tempo ($F_{8,37} = 1,06$; $p > 0,05$) (Figura 16, B). Para os parâmetros que apresentaram diferença no fator tempo a análise pós hoc não identificou diferença entre os grupos veículo e atropina nos diferentes tempos avaliados ($P < 0,05$).

Em relação ao componente respiratório, a administração das diferentes doses de atropina alterou a resposta taquipnéica do quimiorreflexo ($F_{4,37} = 5,09$; $p < 0,01$). Não foram observadas diferenças significativas nos diferentes tempos avaliados ($F_{2,37} = 1,15$; $p > 0,05$) ou interação entre o tratamento e o tempo ($F_{8,7} = 1,31$; $p > 0,05$) (Figura 16, C). As diferenças para o fator tratamento foram observadas entre os grupos veículo e atropina 18 nmol para os tempos controle ($p < 0,01$) e 60 minutos ($p < 0,01$).

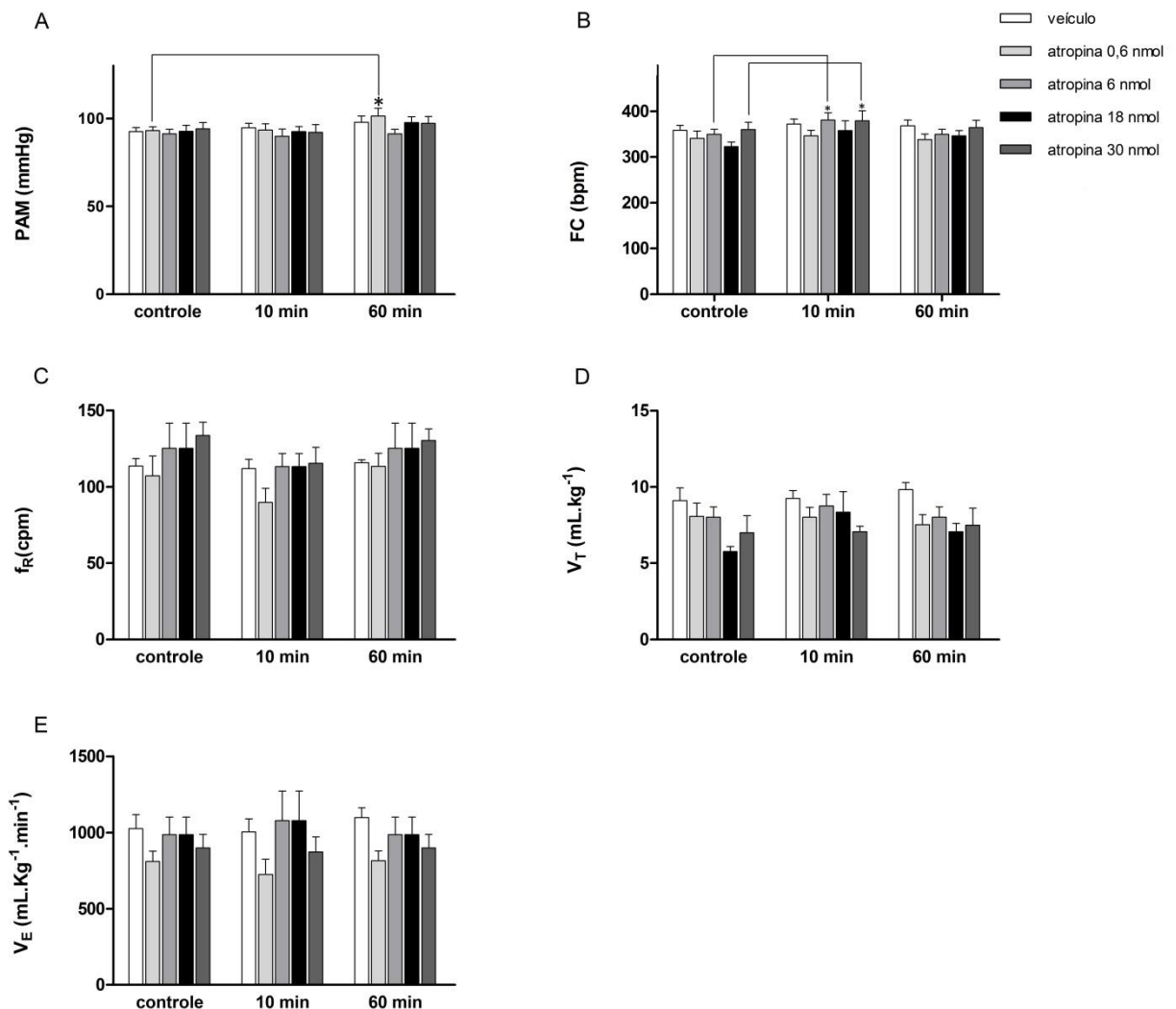


Figura 15: Efeitos da administração bilateral de diferentes doses de atropina no HD sobre os parâmetros cardiorrespiratórios basais. A) Pressão arterial média (PAM, mmHg); B) Frequência cardíaca (FC, bpm), C) Frequência respiratória (f_R , cpm), D) Volume corrente (V_T , mL.kg⁻¹); E) Volume minuto (V_E , mL.kg⁻¹.min⁻¹) antes (controle), 10 minutos e 60 minutos após a microinjeção bilateral de diferentes doses de atropina (0,6; 6; 18; 30 nmol em 500nL; n= 7-9/grupo). Os dados são expressos como média \pm erro padrão da média. ANOVA de duas vias para medidas repetidas. * $p < 0,05$ indica diferença estatisticamente significativa dos grupos atropina 6 e 18 nmol no tempo de 10 minutos em relação aos valores de FC na situação controle.

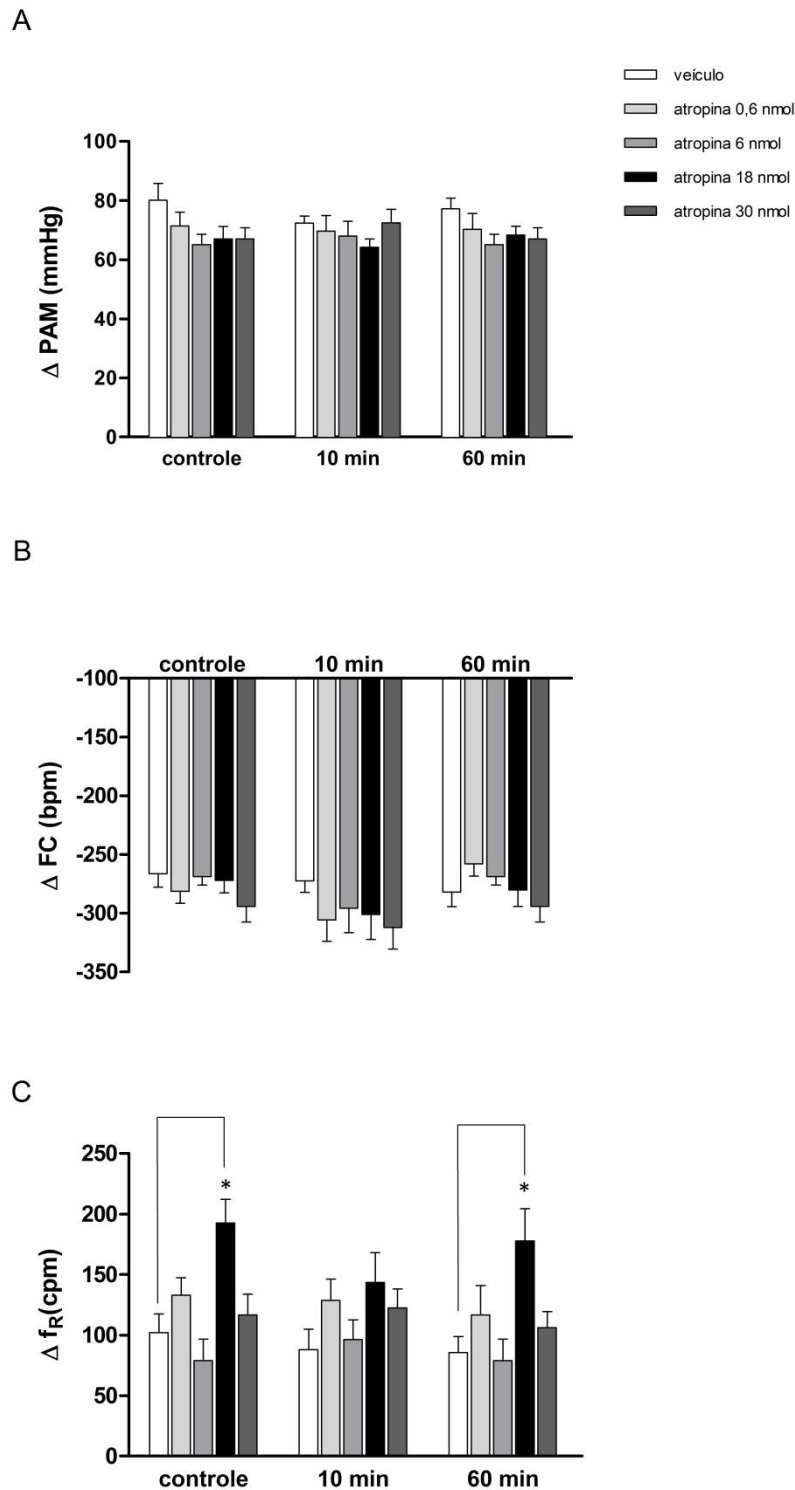


Figura 16: Variações de A) pressão arterial média (PAM, mmHg), B) frequência cardíaca (FC, batimentos por minuto), C) frequência respiratória (Δf_R , ciclos por minuto), frente à ativação do quimiorreflexo com infusão intravenosa de KCN ($40 \mu\text{g}$; $0,05 \text{ mL}$) antes (controle), 10 minutos e 60 minutos após a microinjeção bilateral de veículo ($n=6$) ou diferentes doses de atropina no HD (0,6; 6; 18; 30 nmol em 500nL ; $n= 7-9/\text{grupo}$). Os dados são expressos como média \pm erro padrão da média. ANOVA de duas vias para medidas repetidas. * $p<0,05$ indica diferença estatisticamente significativa do grupo atropina 18 nmol em relação ao grupo controle.

4.5 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO BILATERAL DO *J104129 FUMARATE* NO HD SOBRE OS PARÂMETROS CARDIORESPIRATÓRIOS BASAIS E INDUZIDOS PELA ATIVAÇÃO DO QUIMIORREFLEXO.

A administração bilateral do *J104129 fumarate* (n=8) no HD não produziu alteração significativa nos valores basais de PAM, FC, V_T , V_E e f_R em comparação aos animais administrados com veículo (n=9) (PAM: $F_{1,15} = 3,81$ $p > 0,05$; FC: $F_{1,15} = 1,15$ $p > 0,05$; V_T : $F_{1,15} = 0,11$; $p > 0,05$; V_E : $F_{1,15} = 0,01$; $p > 0,05$; f_R : $F_{1,15} = 0,27$, $p > 0,05$). Diferenças nos valores basais nos três momentos avaliados só foram observadas para o parâmetro FC (PAM: $F_{2,15} = 2,25$ $p > 0,05$; FC $F_{2,15} = 8,96$ $p < 0,01$; V_T : $F_{2,15} = 2,09$; $p > 0,05$; V_E : $F_{2,15} = 0,79$; $p > 0,05$; f_R : $F_{2,15} = 0,47$; $p > 0,05$). Não foi observado interação entre o tratamento e o tempo (PAM: $F_{2,15} = 0,36$; $p > 0,05$; FC: $F_{2,15} = 0,64$; $p > 0,05$; V_T : $F_{2,15} = 0,32$; $p > 0,05$; V_E : $F_{2,15} = 0,71$; $p > 0,05$; f_R : $F_{2,15} = 1,19$; $p > 0,05$) (Figura 17). A análise pós hoc dos valores de FC basal para o fator tempo mostraram que os valores do grupo veículo nos tempos de 10 ($p < 0,01$) e 60 ($p < 0,05$) minutos foram maiores do que os valores na situação controle.

A resposta pressora do quimiorreflexo não foi alterada nos animais administrados com *J104129 fumarate* em comparação aos animais administrados com veículo ($F_{1,15} = 3,46$; $p > 0,05$; ANOVA de duas vias). Não houve também diferença significativa nos diferentes tempos avaliados ($F_{2,15} = 0,90$; $p > 0,05$; ANOVA de duas vias) ou interação entre o tratamento e o tempo ($F_{2,15} = 0,67$; $p > 0,05$; ANOVA de duas vias) (Figura 18, A).

As respostas bradicárdicas de animais injetados com *J104129 fumarate* não diferiram dos animais administrados com veículo ($F_{1,15} = 0,004$; $p > 0,05$), mas foram observadas diferenças nos diferentes tempos ($F_{2,15} = 4,40$; $p < 0,05$) e interação entre o tratamento e o tempo ($F_{2,15} = 3,40$; $p < 0,05$) (Figura 18, B). A análise pós hoc da bradicardia reflexa para o fator tempo, mostrou que o grupo *J104129 fumarate* apresentou uma bradicardia maior no tempo de 10 minutos quando comparado com a situação controle ($p < 0,05$).

A resposta taquipnéica do quimiorreflexo não diferiu entre os grupos ($F_{1,15} = 1,50$; $p > 0,05$). Também não foram observadas diferenças estatisticamente

significantes em relação aos diferentes tempos ($F_{2,15}= 1,77$; $p>0,05$) ou interação entre o tratamento e o tempo ($F_{2,15}= 0,53$; $p>0,05$) (Figura 18, C).

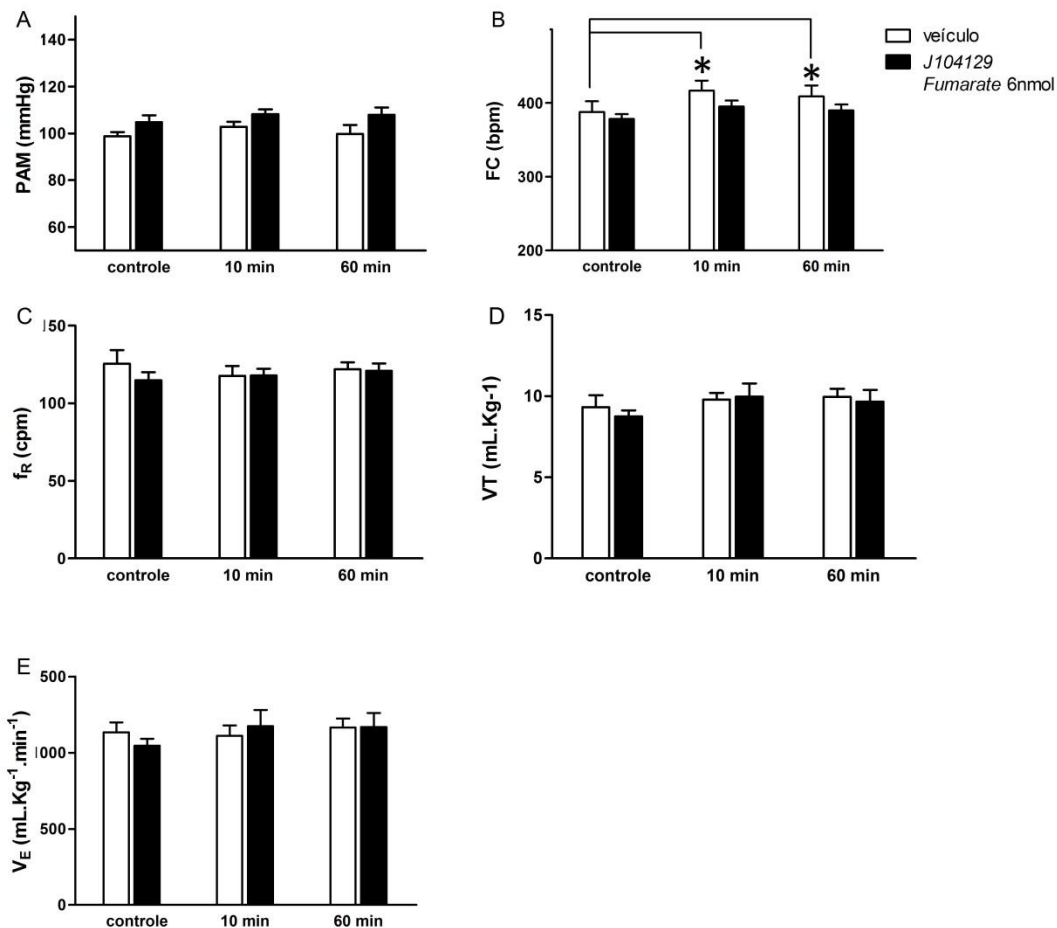


Figura 17: Efeitos da administração bilateral de *J104129 fumarate* no HD sobre os parâmetros cardiorrespiratórios basais. A) Pressão arterial média (PAM, mmHg); B) Frequência cardíaca (FC, bpm), C) Frequência respiratória (f_R , cpm), D) Volume corrente (V_T , mL.kg⁻¹); E) Volume minuto (V_E , mL.kg⁻¹.min⁻¹) antes (controle), 10 minutos e 60 minutos após a microinjeção bilateral de *J104129 fumarate* (6 nmol/500 nL) no HD (n=8) ou veículo (n=9). Os dados são expressos como média \pm erro padrão da média. ANOVA de duas vias para medidas repetidas. * $p < 0,05$ indica diferença estatisticamente significativa do grupo veículo nos tempos de 10 e 60 minutos em relação ao controle.

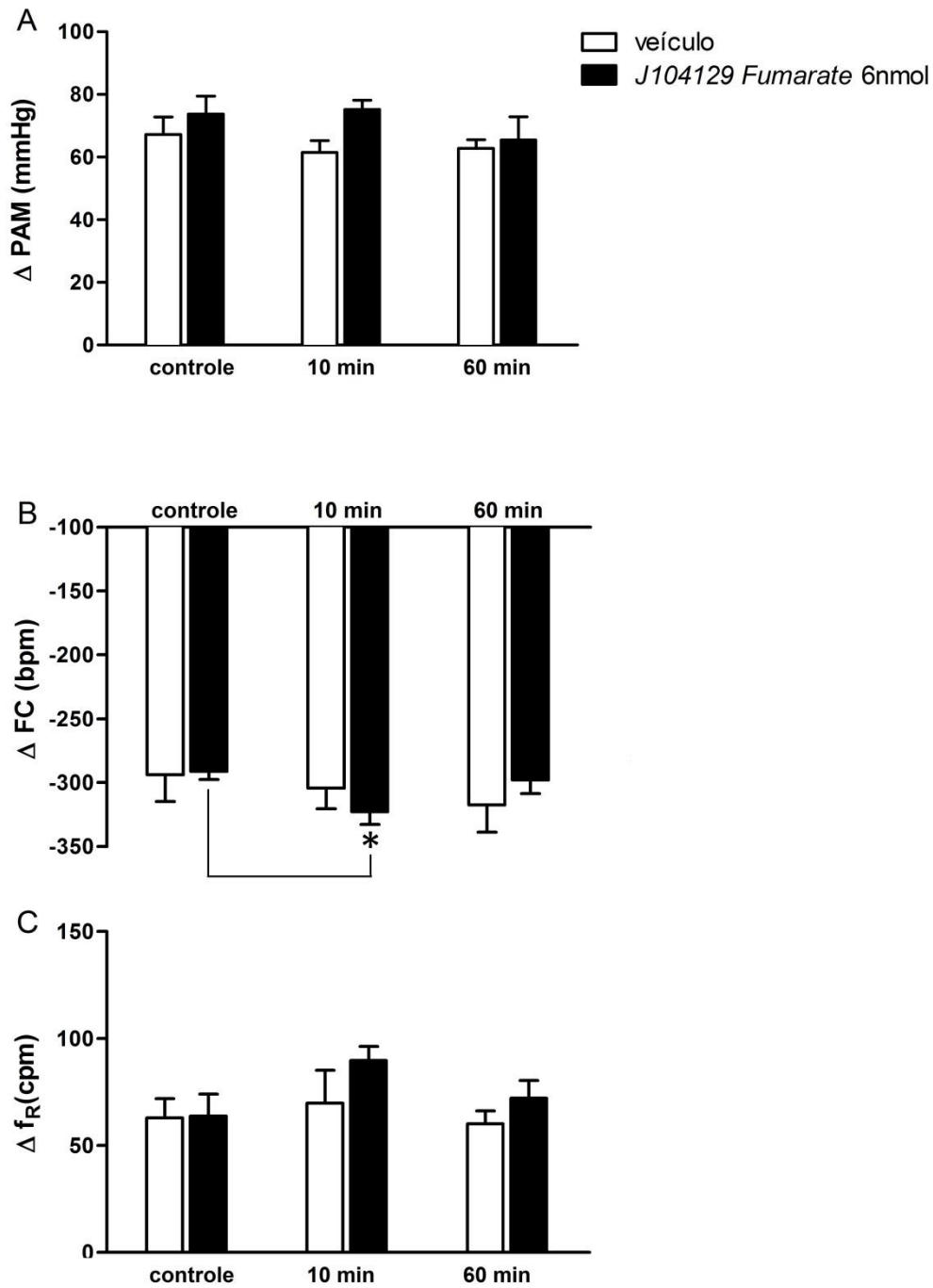


Figura 18: Variações de A) pressão arterial média (PAM, mmHg), B) frequência cardíaca (FC, batimentos por minuto), C) frequência respiratória (Δf_R , ciclos por minuto), frente à ativação do quimiorreflexo com infusão intravenosa de KCN ($40 \mu\text{g}$; $0,05 \text{ mL}$) antes (controle), 10 minutos e 60 minutos após a microinjeção bilateral de veículo ($n=9$) ou *J104129 fumarate* no HD (6 nmol em 500 nL ; $n=8$). Os dados são expressos como média \pm erro padrão da média. ANOVA de duas vias para medidas repetidas.

4.6 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO BILATERAL DE PIRENZEPINA NO HD SOBRE OS PARÂMETROS CARDIORESPIRATÓRIOS BASAIS E INDUZIDOS PELA ATIVAÇÃO DO QUIMIORREFLEXO.

Os valores basais de PAM, FC, V_T , V_E e f_R , não diferiram entre animais injetados com pirenzepina ou somente com veículo (PAM: $F_{1,15} = 0,003$, $p > 0,05$; FC: $F_{1,15} = 0,32$ $p > 0,05$; V_T : $F_{1,15} = 0,77$; $p > 0,05$; V_E : $F_{1,15} = 0,38$; $p > 0,05$; f_R : $F_{1,15} = 0,48$, $p > 0,05$). Foram observadas diferenças nos diferentes tempos avaliados somente para os valores de PAM e FC (PAM: $F_{2,15} = 7,76$, $p < 0,01$; FC: $F_{2,15} = 4,60$ $p < 0,05$; V_T : $F_{2,15} = 0,76$; $p > 0,05$; V_E : $F_{2,15} = 1,41$; $p > 0,05$; f_R : $F_{2,15} = 1,37$; $p > 0,05$) e para interação entre o tratamento e o tempo somente para os valores de PAM (PAM: $F_{2,15} = 4,60$, $p < 0,05$; FC: $F_{2,15} = 0,51$ $p > 0,05$; V_T : $F_{2,15} = 1,46$; $p > 0,05$; V_E : $F_{2,15} = 0,73$; $p > 0,05$; f_R : $F_{2,15} = 0,62$; $p > 0,05$). A análise pós hoc da FC basal mostrou que os valores no tempo de 10 minutos para o grupo pirenzepina, foram maiores do que os valores obtidos antes da injeção ($p < 0,05$) (Figura 19).

A magnitude da resposta pressora do quimiorreflexo não foi afetada pela administração de pirenzepina em comparação ao veículo ($F_{1,15} = 0,04$; $p > 0,04$; ANOVA de duas vias). Não houve também diferença significativa em relação ao tempo ($F_{2,15} = 0,15$; $p > 0,05$; ANOVA de duas vias) ou interação entre o tratamento e o tempo ($F_{2,15} = 2,15$; $p > 0,05$; ANOVA de duas vias) (Figura 20, A).

De modo similar, a ANOVA de duas vias mostrou que não houve diferença estatisticamente significativa quanto a resposta bradicárdica do quimiorreflexo entre os grupos ($F_{1,15} = 0,01$; $p > 0,05$), assim como não houve diferença em relação aos diferentes tempos testados ($F_{2,15} = 1,72$; $p > 0,05$) ou interação entre o tratamento e o tempo ($F_{2,15} = 0,17$; $p > 0,05$) (Figura 20, B).

A resposta taquipnéica frente à ativação do quimiorreflexo também não foi estatisticamente diferente entre os grupos ($F_{1,15} = 2,90$; $p > 0,05$), ou nos diferentes tempos ($F_{2,15} = 0,92$; $p > 0,05$), assim como não houve interação entre o tratamento e o tempo ($F_{2,15} = 0,27$; $p > 0,05$) (Figura 20, C).

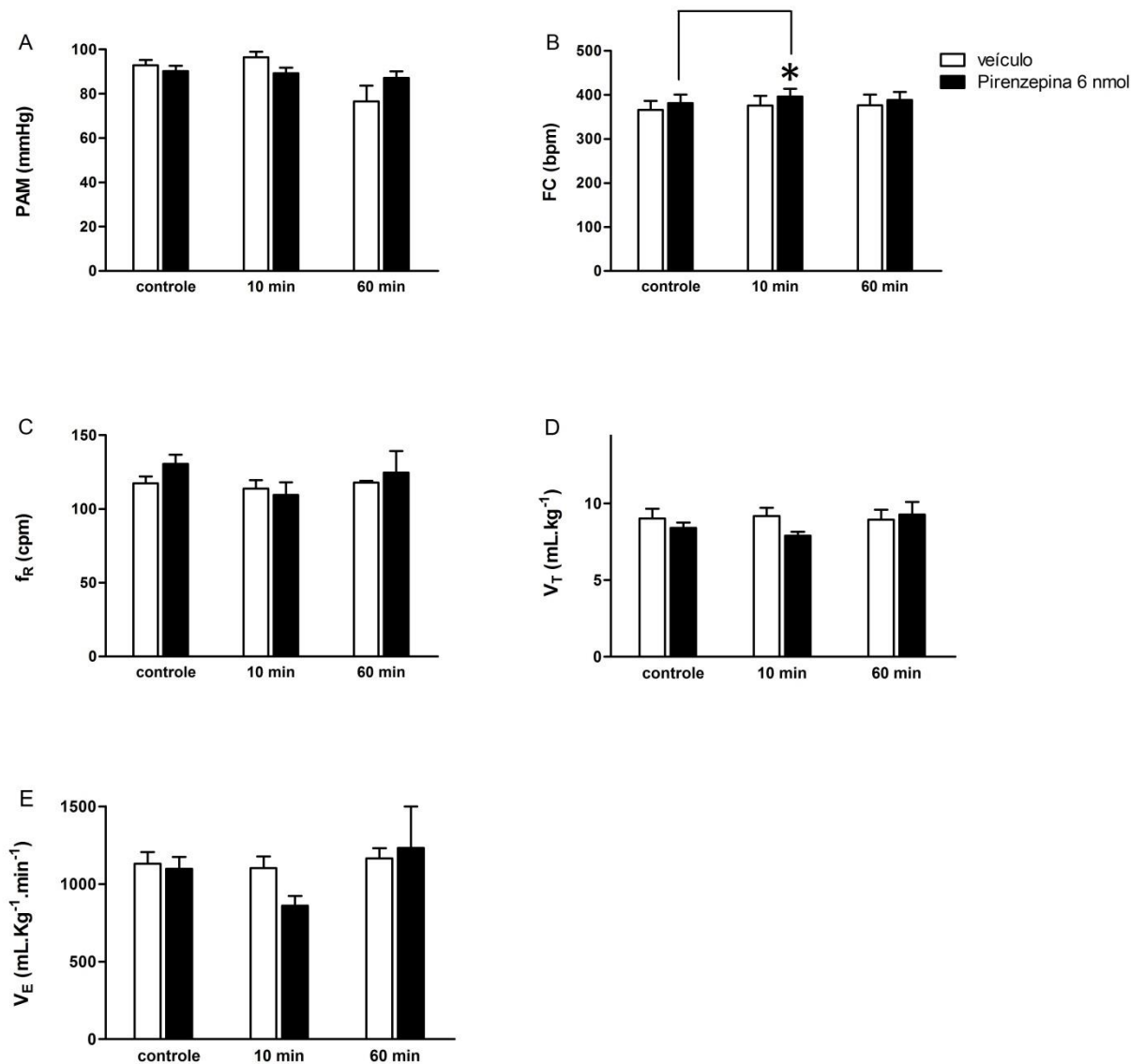


Figura 19: Efeitos da administração bilateral de pirenzepina no HD sobre os parâmetros cardiorrespiratórios basais. A) Pressão arterial média (PAM, mmHg); B) Frequência cardíaca média (FC, bpm), C) Frequência respiratória (f_R , cpm), D) Volume corrente (V_T , mL.kg⁻¹); E) Volume minuto (V_E , mL.kg⁻¹.min⁻¹), antes (controle), 10 minutos e 60 minutos após a microinjeção bilateral de pirenzepina (6 nmol/500 nL) no HD (n=9) ou veículo (n=8). Os dados são expressos como média \pm erro padrão da média. ANOVA de duas vias para medidas repetidas. *p<0,05 indica diferença estatisticamente significativa do grupo pirenzepina no tempo de 10 minutos em relação ao controle.

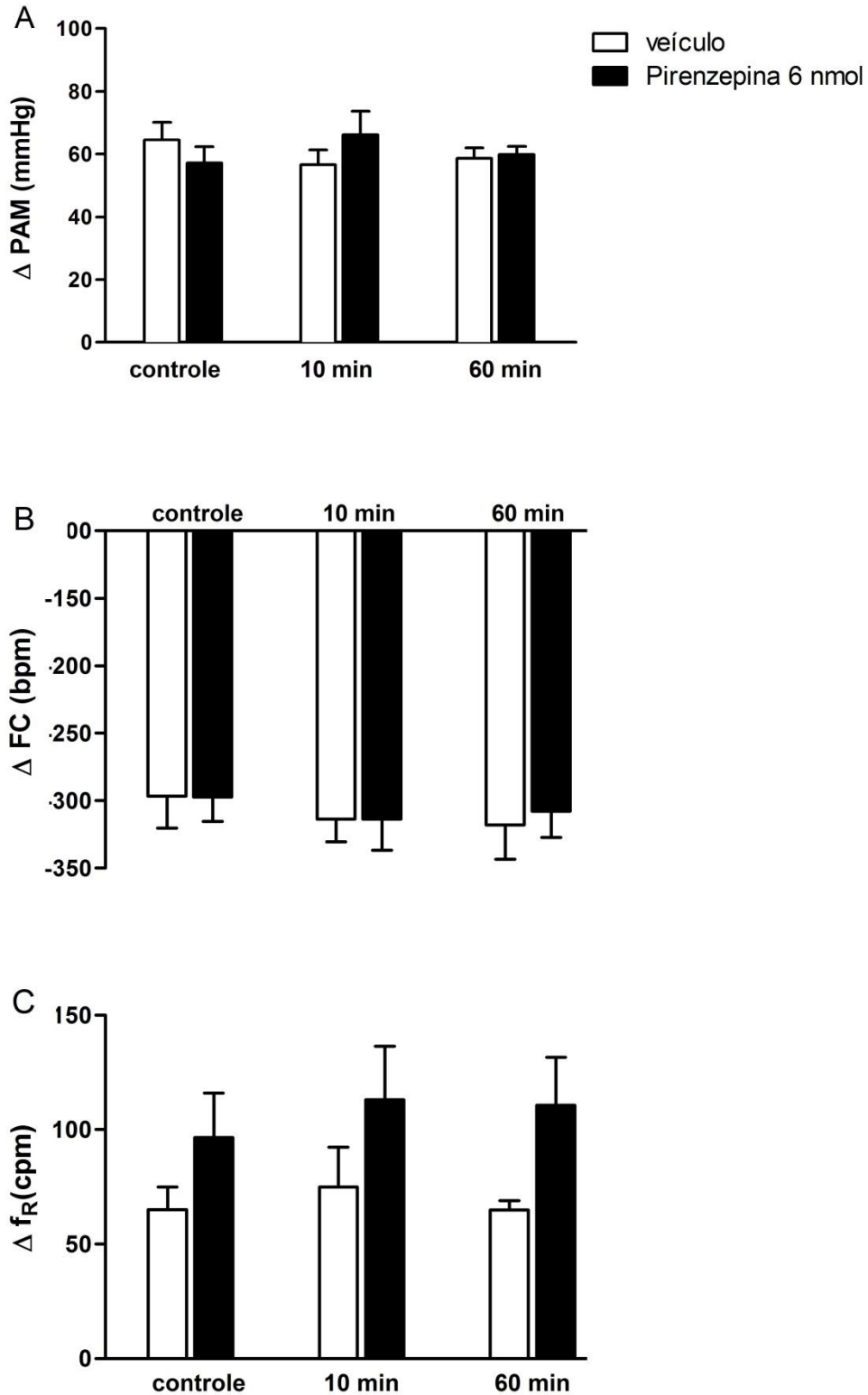


Figura 20: Variações de A) pressão arterial média (PAM, mmHg), B) frequência cardíaca (FC, batimentos por minuto), C) frequência respiratória (Δf_R , ciclos por minuto), frente à ativação do quimiorreflexo com infusão intravenosa de KCN (40 μg ; 0,05 mL) antes (controle), 10 minutos e 60 minutos após a microinjeção bilateral de veículo ($n=8$) ou pirenzepina no HD (6nmol em 500nL; $n=9$). Os dados são expressos como média \pm erro padrão da média. ANOVA de duas vias para medidas repetidas.

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

A modulação da neurotransmissão colinérgica no HD de ratos não-anestesiados, por meio do bloqueio da liberação de ACh ou por meio do bloqueio seletivo e não-seletivo de receptores muscarínicos, não alterou os parâmetros cardiorrespiratórios basais ou as respostas cardiorrespiratórias do quimiorreflexo.

Sabe-se que as respostas autonômicas cardiovasculares podem ser também estimuladas como parte de uma resposta comportamental mais complexa, como atividade física ou estresse. Essas mudanças são orquestradas por uma complexa rede de neurônios de estruturas suprabulbares presentes em áreas como córtex límbico, amígdala e hipotálamo que se projetam para os centros de integração autonômica (SALMAN, 2016).

Nosso grupo de pesquisa têm reunido estudos avaliando a participação de estruturas suprabulbares e límbicas na neuromodulação cardiovascular frente a estímulos aversivos, como o estresse de restrição e o medo condicionado ao contexto (GRANJEIRO et al., 2012; MORAES-NETO et al., 2014; RESSTEL et al., 2006; RESSTEL; CORRÊA, 2006; SCOPINHO et al., 2013). Está bem estabelecido que o estresse agudo ou estímulos aversivos promove respostas cardiovasculares caracterizadas por aumento da atividade simpática, da FC e da PA (SALMAN, 2016). Estudos do nosso grupo também tem investigado o papel de estruturas límbicas, tais como, hipocampo e córtex pré-frontal medial na modulação do baro ((FERREIRA-JUNIOR et al., 2013), (FERREIRA-JUNIOR et al., 2012), (FERREIRA-JUNIOR, 2015)) e do quimiorreflexo ((KUNTZE,L.B 2016), (KUNTZE et al., 2016)) mesmo na ausência de estímulos aversivos. Todavia, ao menos no tange ao sistema colinérgico, nenhum estudo havia investigado a participação deste sistema no hipocampo na modulação das respostas cardiorrespiratórias induzidas pela estimulação quimiorreflexa.

Estudos de imunohistoquímica revelam uma ampla população de receptores muscarínicos no SNC, e também no HD (LEVEY et al., 1995). De fato, o hipocampo é uma estrutura do sistema límbico altamente inervada pela neurotransmissão colinérgica provenientes do núcleo septal medial e da banda

diagonal de Broca (PAUL et al., 2015). Nele, estão presentes receptores colinérgicos muscarínicos e nicotínicos, já tendo sido identificado, por estudos moleculares, os 5 subtipos de receptores muscarínicos (PICCIOTTO; HIGLEY; MINEUR, 2012). Em nosso estudo, tanto o bloqueio da produção endógena de acetilcolina, por meio do bloqueio da captação da colina com hemicolínio, conforme já realizado em outro estudo (ANTERO, 2013), quanto o bloqueio de receptores muscarínicos com atropina não foi capaz de modificar o padrão da resposta do quimiorreflexo, bem como não alterou os níveis cardiorespiratórios basais. Esses dados sugerem que o sistema colinérgico do hipocampo não parece participar da modulação tônica e quimiorreflexa cardiorespiratória. Entretanto, como as duas ferramentas farmacológicas supracitadas, hemicolínio e atropina, agem de forma não seletiva, abolindo completamente a transmissão colinérgica ou bloqueando não seletivamente receptores muscarínicos, poderia se questionar, se a ausência de efeitos não se deveria a uma interferência indiscriminada sobre receptores pós-sinápticos ou auto-receptores. Estudos utilizando camungondos geneticamente modificados revelam a presença de autorreceptores muscarínicos inibitórios no HD (ZHANG et al., 2002). Além disso, dados de estudos funcionais apóiam a existência de auto-receptores muscarínicos em várias áreas encefálicas (BAGHDOYAN; LYDIC; FLEEGAL, 1998; DOUGLAS; BAGHDOYAN; LYDIC, 2001). A presença de autorreceptores é definida como receptores localizados pré-sinápticamente que respondem ao próprio neurotransmissor liberado pelo neurônio com a finalidade de controlar a liberação por mecanismo de *feedback*. Portanto, como nos estudos envolvendo microinjeção, não podemos exercer uma ação seletiva de modulação sobre receptores pós-sinápticos ou auto-receptores, é possível que isso seja um fator determinante da ausência de efeito frente à modulação farmacológica empregada. Os autorreceptores estão localizados nos terminais pré-sinápticos no hipocampo (MOOR et al., 1995), e o receptor muscarínico M₂ representa o subtipo predominante no hipocampo e no córtex cerebral (ZHANG et al., 2002).

Não podemos descartar também, a hipótese de que os volumes de microinjeção empregados não tenham sido capazes de bloquear completamente toda a extensão do HD e que isso seja um fator para a ausência de efeito, ainda que volumes semelhantes tenham sido empregados

em outros estudos do grupo e tenham exercido efeito tanto sobre o baro quanto sobre o quimiorreflexo (ANTERO, 2013; FERREIRA-JUNIOR, 2015; KUNTZE, 2016; KUNTZE et al., 2016).

Objetivando exercer uma ação mais discriminada sobre subtipos distintos de receptores muscarínicos, executamos também protocolos empregando drogas bloqueadoras seletivas de receptores M_1 e M_3 .

A escolha destes bloqueadores foi baseada em estudos anteriores de nosso grupo de pesquisa em que foi demonstrada a participação dos receptores muscarínicos M_1/M_3 do hipocampo na modulação de respostas ao MCC (ANTERO, 2013).

Os antagonistas escolhidos foram o *J104129 fumarate*, que possui afinidade semelhante para receptores muscarínicos do subtipo M_1 e M_3 e a pirenzepina, que na dose empregada, age seletivamente sobre o subtipo (M_1) (ANTERO, 2013). Nenhuma das drogas seletivas administradas no hipocampo foi capaz de modificar os níveis cardiorrespiratórios basais ou as respostas induzidas pela ativação dos quimiorreceptores periféricos, sugerindo que o sistema colinérgico no HD não parece participar da modulação autonômica cardiorespiratória.

Em contrapartida, estudos em gatos têm mostrado que a estimulação elétrica do hipocampo em mamíferos resulta em alterações autonômicas, de pressão arterial, frequência cardíaca, e mudanças comportamentais, como reações defensivas e agitação (MACLEAN; DELGADO, 1953). Estudo de Ruit e Neafsey (1988) em ratos também mostrou que a estimulação elétrica ou química com microinjeção de glutamato no HD ou do HV leva a diminuição da PAM, FC e frequência respiratória. Essas evidências apontam para uma potencial participação do hipocampo sobre o controle visceral. Todavia, nestes estudos a modulação do hipocampo sobre controle reflexo cardiorespiratório, assim como o papel do sistema colinérgico do HD na modulação destas respostas não foi investigado. Um estudo de Hori e colaboradores (1995), investigou a participação de três subtipos de receptores muscarínicos na mediação das respostas cardiovasculares induzidas pela microinjeção intra-HD de uminibidor reversível da AChE. No estudo mencionado, primeiramente, a neostigmina foi microinjetada no HD de ratos, e observou-se aumento da

pressão arterial e diminuição da frequência cardíaca. Em seguida, foram administrados metilatropina (antagonista não-seletivo de receptores muscarínicos), pirenzepina (antagonista seletivo de receptor muscarínico M_1), galamina (antagonista de receptor muscarínico M_2) ou 4-DAMP (antagonista de receptores muscarínicos M_1/M_3). Dentre as drogas citadas, apenas a pirenzepina foi capaz de bloquear os efeitos induzidos pela injeção intra-HD de neostigmina, sugerindo que a resposta pressora e bradicárdica seria mediada por receptor muscarínico do subtipo M_1 . Estudos recentes de Kuntze e colaboradores (KUNTZE, L.B 2016; KUNTZE, L.B et al., 2016) investigaram a participação do hipocampo na modulação das respostas quimiorreflexas. Neste estudo foi induzido o bloqueio do hipocampo dorsal e ventral com $CoCl_2$ e os efeitos sobre as respostas cardiorespiratórias quimiorreflexas foram avaliados. O $CoCl_2$ no HV, mas não no HD alterou a resposta bradicárdica do quimiorreflexo (KUNTZE, L.B et al., 2016). Todavia, o antagonismo de receptores NMDA no HD atenuou a resposta hipertensora e potencializou a resposta bradicárdica do quimiorreflexo (KUNTZE, L.B 2016). Os estudos de Kuntze e de Hori se contrapõem aos nossos resultados em que o bloqueio colinérgico no hipocampo não afetou os parâmetros cardiorespiratórios basais ou induzidos pela ativação quimiorreflexa.

Há evidências consistentes de que a neurotransmissão colinérgica presente no SNC exerce controle sobre a função cardiovascular (KUBO, 1998a). É relatado que a administração intracerebroventricular (i.c.v), incluindo ventrículo lateral, terceiro ventrículo e a cisterna magna, de agonistas colinérgicos ou de inibidores da AChE levam a resposta pressora (BREZENOFF; XIAO, 1989; KUBO, 1998b).

Entretanto, um interessante achado é que drogas que interferem na neurotransmissão colinérgica, como os antagonistas de receptores colinérgicos muscarínicos e depletors da acetilcolina, não produzem alterações cardiovasculares em ratos normotensos (BREZENOFF; CAPUTI, 1980; BREZENOFF; XIAO, 1989). No estudo de Brezenoff e colaboradores a injeção i.c.v de hemicolinio em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) foi capaz de diminuir a PAM e FC de maneira dose-dependente. No entanto, nesse mesmo trabalho, a microinjeção i.c.v de hemicolinio em ratos Wistar Kyoto (WKY) normotensos não foi capaz de diminuir a PAM. Ao mesmo tempo, relata-se que

a atividade da neurotransmissão colinérgica está aumentada em ratos SHR quando comparados com ratos normotensos (KUBO, 1998a; KUBO; TATSUMI, 1979). Esses dados sugerem que os neurônios colinérgicos centrais envolvidos na regulação da pressão sanguínea não parecem estar ativos tonicamente, mas parecem desempenhar um papel modulatório da função simpática em condições fisio-patológicas específicas, como o estado de hipertensão (KUBO, 1998b). Posteriormente, esses achados foram observados e confirmados, sugerindo que a resposta pressora é mediada por meio da estimulação de receptores muscarínicos centrais (KUBO et al., 2002). Apesar do fato dos estudos mencionados não terem avaliado o papel do sistema colinérgico no HD, é possível que um princípio semelhante se aplique a este núcleo, em que a transmissão colinérgica não desempenharia um papel primordial no estado de normotensão, como é o caso dos animais investigados em nosso estudo.

O envolvimento da neurotransmissão colinérgica na regulação do estresse também se mostra evidente a partir de estudos em que o estresse agudo ou estresse de restrição aumentaram a liberação de ACh ou induziram a expressão de genes que regulam a disponibilidade da ACh no hipocampo. (ANTERO, 2013; PAUL et al., 2015). De fato, o hipocampo é uma estrutura límbica envolvida na regulação do estresse e cognição (GILAD, 1987; HERMAN; CULLINAN, 1997; PAUL et al., 2015; PICCIOTTO; HIGLEY; MINEUR, 2012). A ativação da neurotransmissão colinérgica no hipocampo é considerada um aspecto importante nas respostas adaptativas frente ao estresse e é influenciada por estímulos hormonais e neurais (PAUL et al., 2015). A neurotransmissão colinérgica parece inicializar a ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) e conseqüentemente, influenciar a secreção de glicocorticoides (GILAD et.al 1987). Gilad e colaboradores (1985) demonstraram que a ativação do eixo HPA induzido pelo estresse de restrição em ratos, que resulta no aumento de corticosterona circulante, pode ativar a neurotransmissão colinérgica no hipocampo. Isso indica que os neurônios septo-hipocampais colinérgicos são sensíveis a mudanças de níveis de corticosterona livre. Portanto, o eixo HPA parece exercer um papel importante na adaptação ao estresse pela modulação da atividade hipocampal. Desse modo, a neurotransmissão colinérgica no HD estaria envolvida na regulação da resposta ao estresse por meio do eixo HHA.

Baseados nas evidências da literatura que demonstram que a ativação quimiorreflexa promove além de complexos ajustes cardiorespiratórios, também induz uma resposta comportamental importante (FRANCHINI; KRIEGER, 1993) e nas evidências de modulação colinérgica (FERREIRA-JUNIOR, 2015; HORI et al., 1995) e glutamatérgica (KUNTZE, LB 2016) hipocampal sobre a modulação tônica e reflexa, acreditávamos que a modulação do sistema colinérgico no HD afetaria de alguma maneira as respostas induzidas pelo quimiorreflexo, mesmo em condições não estressantes. Contrariamente a nossa hipótese inicial, nossos resultados indicam que os ajustes transitórios promovidos pela ativação quimiorreflexa com KCN, não parecem depender diretamente do sistema colinérgico hipocampal.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados do nosso estudo sugerem que a neurotransmissão colinérgica no HD não parece participar ativamente no processamento das respostas cardiorespiratórias induzidas pela ativação dos quimiorreceptores periféricos. Todavia, baseado nas evidências da literatura, não podemos descartar a mediação das respostas quimiorreflexas, por meio de outros sistemas de neurotransmissão existentes no HD, assim como não podemos descartar a participação do sistema colinérgico hipocampal na mediação de respostas reflexas em estados aversivos ou fisiopatológicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANTERO, L. **Receptores muscarínicos no hipocampo dorsal de ratos modulam a resposta emocional condicionada contextual** Receptores muscarínicos no hipocampo dorsal de ratos modulam a resposta emocional condicionada contextual. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2013.

BAGHDOYAN, H. A.; LYDIC, R.; FLEEGAL, M. A. M2 muscarinic autoreceptors modulate acetylcholine release in the medial pontine reticular formation. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 286, n. 3, p. 1446–1452, 1998.

BANNERMAN, D. M. et al. Regional dissociations within the hippocampus - Memory and anxiety. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 28, n. 3, p. 273–283, 2004.

BARROS, R. C. H. et al. Cardiovascular responses to chemoreflex activation with potassium cyanide or hypoxic hypoxia in awake rats. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**, v. 97, n. 2, p. 110–115, 2002.

BAST, T. et al. From rapid place learning to behavioral performance: A key role for the intermediate hippocampus. **PLoS Biology**, v. 7, n. 4, p. 0730–0746, 2009.

BERNTHAL, T. Chemo-reflex control of vascular reactions through the carotid body. **Am J Physiol**, v. 121, n. 1, p. 1–20, 1938.

BREZENOFF, H. E.; CAPUTI, A P. Intracerebroventricular injection of hemicholinium-3 lowers blood pressure in conscious spontaneously hypertensive rats but not in normotensive rats. **Life Sci**, v. 26, n. 13, p. 1037–1045, 1980.

BREZENOFF, H. E.; XIAO, Y. F. Acetylcholine in the posterior hypothalamic nucleus is involved in the elevated blood pressure in the spontaneously hypertensive rat. **Life Sciences**, v. 45, n. 13, p. 1163–1170, 1989.

BUCCAFUSCO, J. J. **Methods of BEHAVIOR ANALYSIS in NEUROSCIENCE**. 2nd. ed. [s.l.] Frontiers in Neuroscience, 2001. v. 3

CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J.; HAIBARA, A. S. Reflexos cardiovasculares e hipertensão arterial. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v. 8, n. 1, p. 30–40, 2001.

COSTA, K. M. et al. **Evolution and physiology of neural oxygen sensing** **Frontiers in Physiology**, 2014.

DAMPNEY, R. A. L.; HORIUCHI, J. Functional organisation of central cardiovascular

pathways: Studies using c-fos gene expression. **Progress in Neurobiology**, v. 71, n. 5, p. 359–384, 2003.

DENG, W.; AIMONE, J. B.; GAGE, F. H. New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? **Nature reviews. Neuroscience**, v. 11, n. 5, p. 339–50, 2010.

DOUGLAS, C. L.; BAGHDOYAN, H. A; LYDIC, R. M2 muscarinic autoreceptors modulate acetylcholine release in prefrontal cortex of C57BL/6J mouse. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 299, n. 3, p. 960–966, 2001.

DRORBAUGH, J. E.; FENN, W. O. A barometric method for measuring ventilation in newborn infants. **Pediatrics**, v. 16, n. 1, p. 81–7, jul. 1955.

ESPERIDIAO-ANTONIO, V. et al. Neurobiology of the emotions. **Revista De Psiquiatria Clinica**, v. 35, n. 2, p. 55–65, 2008.

FANSELOW, M. S.; DONG, H.-W. Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures? **Neuron**, v. 65, n. 1, p. 7–19, 2010.

FERREIRA-JUNIOR, N. C. et al. Medial prefrontal cortex endocannabinoid system modulates baroreflex activity through CB(1) receptors. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 302, n. 7, p. R876-85, abr. 2012.

FERREIRA-JUNIOR, N. C. et al. Medial prefrontal cortex N-methyl-D-aspartate receptor/nitric oxide/cyclic guanosine monophosphate pathway modulates both tachycardic and bradycardic baroreflex responses. **Journal of neuroscience research**, v. 91, n. 10, p. 1338–48, out. 2013.

FERREIRA-JUNIOR, N. C. **Envolvimento do hipocampo dorsal na modulação da atividade barorreflexa cardíaca: participação dos receptores NMDA , CB1 , TRPV1 , muscarínicos e do óxido nítrico** . [s.l.] Universidade de São Paulo, 2015.

FRANCHINI, K. . ; K. E. M. Carotid chemoreceptors influence arterial pressure in intact and aortic-denervated rats. **American Journal of Physiology**, v. 262, p. 677–683, 1992.

FRANCHINI, K. G.; KRIEGER, E. M. Cardiovascular responses of conscious rats to carotid body chemoreceptor stimulation by intravenous KCN. **Journal of the autonomic nervous system**, v. 42, n. 1, p. 63–9, jan. 1993.

FREET, C. S.; STONER, J. F.; TANG, X. Baroreflex and chemoreflex controls of sympathetic activity following intermittent hypoxia. **Autonomic neuroscience : basic & clinical**, v. 174, n. 1–2, p. 8–14, mar. 2013.

FURUYA, W. I. et al. Differential modulation of sympathetic and respiratory activities by cholinergic mechanisms in the nucleus of the solitary tract in rats. **Experimental physiology**, v. 99, n. 5, p. 743–58, 1 maio 2014.

GILAD, G. M. et al. Stress-induced activation of the hippocampal cholinergic system and the pituitary-adrenocortical axis. **Brain Research**, v. 347, n. 2, p. 404–408, 1985.

GILAD, G. M. The stress-induced response of the septo-hippocampal cholinergic system. A vectorial outcome of psychoneuroendocrinological interactions. **Psychoneuroendocrinology**, v. 12, n. 3, p. 167–184, 1987.

GRANJEIRO, E. M. et al. Prelimbic but not infralimbic cortex is involved in the pressor response to chemoreflex activation in awake rats. **Experimental physiology**, v. 96, n. 5, p. 518–27, maio 2011a.

GRANJEIRO, E. M. et al. Bed nucleus of the stria terminalis and the cardiovascular responses to chemoreflex activation. **Autonomic neuroscience: basic & clinical**, v. 167, n. 1–2, p. 21–6, 3 abr. 2012.

GRANJEIRO, E. M.; MACHADO, B. H. NO in the caudal NTS modulates the increase in respiratory frequency in response to chemoreflex activation in awake rats. **Respiratory physiology & neurobiology**, v. 166, n. 1, p. 32–40, 31 mar. 2009.

GUIMARÃES, G.; BELLI, J. Behavior of central and peripheral chemoreflexes in heart failure. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, p. 161–167, 2011.

HAIBARA, A. S. et al. NMDA receptors in NTS are involved in bradycardic but not in pressor response of chemoreflex. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 269, n. 4, p. H1421–H1427, 1 out. 1995.

HAIBARA, A. S.; BONAGAMBA, L. G.; MACHADO, B. H. Sympathoexcitatory neurotransmission of the chemoreflex in the NTS of awake rats. **The American journal of physiology**, v. 276, n. 1 Pt 2, p. R69–80, jan. 1999.

HERMAN, J. P.; CULLINAN, W. E. Neurocircuitry of stress: Central control of the hypothalamo- pituitary-adrenocortical axis. **Trends in Neurosciences**, v. 20, n. 2, p. 78–84, 1997.

HORI, H. et al. Pressor response induced by the hippocampal administration of neostigmine is suppressed by M1 muscarinic antagonist. **Life sciences**, v. 57, n. 20, 1995.

ITURRIAGA, R. Functional studies of acetylcholine, ATP and cytokine release from the human carotid body: the new frontier for oxygen chemoreception physiology. **Experimental physiology**, v. 99, n. 8, p. 1027–8, ago. 2014.

KARA, T.; NARKIEWICZ, K.; SOMERS, V. K. Chemoreflexes--physiology and clinical implications. **Acta physiologica Scandinavica**, v. 177, n. 3, p. 377–84, mar. 2003.

KRETZ, R. Local cobalt injection: A method to discriminate presynaptic axonal from postsynaptic neuronal activity. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 11, n. 2, p. 129–135, 1984.

KUBO, T. Cholinergic mechanism and blood pressure regulation in the central nervous system. **Brain Research Bulletin**, v. 46, n. 6, p. 475–481, 1998a.

KUBO, T. Cholinergic mechanism and blood pressure regulation in the central nervous system. **Brain Research Bulletin**, v. 46, n. 6, p. 475–481, ago. 1998b.

KUBO, T. et al. Activation of hypothalamic angiotensin receptors produces pressor responses via cholinergic inputs to the rostral ventrolateral medulla in normotensive and hypertensive rats. **Brain research**, v. 953, n. 1–2, p. 232–45, 25 out. 2002.

KUBO, T.; TATSUMI, M. Increased pressor responses to physostigmine in spontaneously hypertensive rats. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 306, n. 1, p. 81–83, 1979.

KUNTZE, L. . **Participação dos sistemas glutamatérgico e nitrérgico do hipocampo na modulação das respostas cardiovasculares ativadas pelo quimiorreflexo em ratos não-anestesiados**. [s.l.] University of São Paulo, 2016.

KUNTZE, L. B. et al. Ventral hippocampus modulates bradycardic response to peripheral chemoreflex activation in awake rats. **Experimental Physiology**, v. 101, n. 4, p. 482–493, 2016.

LEVEY, A. I. et al. Identification and Localization of Muscarinic Acetylcholine Proteins in Brain with Subtype-specific Antibodies. n. October, 1991.

LEVEY, A. I. et al. Expression of m1-m4 muscarinic acetylcholine receptor proteins in rat hippocampus and regulation by cholinergic innervation. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 15, n. 5 Pt 2, p. 4077–4092, 1995.

LINDAHL, S. G. E. Oxygen and Life on Earth. **Anesthesiology**, n. 1, p. 7–13, 2008.

MACHADO, B. H. et al. Autonomic processing of the cardiovascular reflexes in the nucleus tractus solitarii. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 30, n. 4, p. 533–543, 1997.

MACLEAN, P. D.; DELGADO, J. M. R. Electrical and chemical stimulation of frontotemporal portion of limbic system in the waking animal. **Electroencephalography and Clinical Neurophysiology**, v. 5, n. 1, p. 91–100, 1953.

MALIK, R. et al. Mapping the electrophysiological and morphological properties of CA1 pyramidal neurons along the longitudinal hippocampal axis. **Hippocampus**, v. 26, n. 3, p. 341–361, 2016.

MANSUKHANI, M. P.; WANG, S.; SOMERS, V. K. Chemoreflex physiology and implications for sleep apnoea: insights from studies in humans. **Experimental Physiology**, v. 100, n. 2, p. 130–135, 1 fev. 2015.

MARK, G. P.; RADA, P. V.; SHORS, T. J. Inescapable stress enhances extracellular acetylcholine in the rat hippocampus and prefrontal cortex but not the nucleus accumbens or amygdala. **Neuroscience**, v. 74, n. 3, p. 767–774, 1996.

MARSHALL, J. M. Peripheral chemoreceptors and cardiovascular regulation. **Physiological reviews**, v. 74, n. 3, p. 543–94, jul. 1994.

MAUAD, H.; MACHADO, B. H. Pressor response to unilateral carotid chemoreceptor activation is not affected by ipsilateral antagonism of excitatory amino acid receptors in the rostral ventrolateral medulla of awake rats. **Autonomic neuroscience: basic & clinical**, v. 91, n. 1–2, p. 26–31, 13 ago. 2001.

MEIBACH, R. C.; SIEGEL, A. Efferent connections of the hippocampal formation in the rat. **Brain Research**, v. 124, n. 2, p. 197–224, 1977.

MOOR, E. et al. Characterisation of muscarinic autoreceptors in the septo-hippocampal system of the rat: a microdialysis study. **European Journal of Pharmacology**, v. 294, n. 1, p. 155–161, 1995.

MORAES, D. J. A et al. Modulation of respiratory responses to chemoreflex activation by L-glutamate and ATP in the rostral ventrolateral medulla of awake rats. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 300, n. 6, p. R1476–R1486, 2011.

MORAES RESSEL, L. B.; DE AGUIAR CORRÊA, F. M.; GUIMARÃES, F. S. The expression of contextual fear conditioning involves activation of an NMDA receptor-nitric oxide pathway in the medial prefrontal cortex. **Cerebral Cortex**, v. 18, n. 9, p. 2027–2035, 2008.

MORAES-NETO, T. B. et al. Involvement of dorsal hippocampus glutamatergic and nitrenergic neurotransmission in autonomic responses evoked by acute restraint stress in rats. **Neuroscience**, v. 258, p. 364–73, 31 jan. 2014.

MORGANE, P. J.; GALLER, J. R.; MOKLER, D. J. A review of systems and networks of the limbic forebrain/limbic midbrain. **Progress in Neurobiology**, v. 75, n. 2, p. 143–160, 2005.

MORTOLA, J. P.; FRAPPELL, P. B. On the barometric method for measurements of ventilation, and its use in small animals. **Canadian journal of physiology and pharmacology**, v. 76, n. 10–11, p. 937–944, 1998.

MORTOLA, J. P.; FRAPPELL, P. B. Measurements of air ventilation in small vertebrates. **Respiratory Physiology and Neurobiology**, v. 186, n. 2, p. 197–205, 2013.

NATTIE, E.; LI, A. Central chemoreceptors: Locations and functions. **Comprehensive Physiology**, v. 2, n. 1, p. 221–254, 2012.

NURSE, C. A. Synaptic and paracrine mechanisms at carotid body arterial chemoreceptors. **The Journal of physiology**, v. 592, n. Pt 16, p. 3419–26, 15 ago. 2014.

PAUL, S. et al. Interaction of basal forebrain cholinergic neurons with the glucocorticoid system in stress regulation and cognitive impairment. **Frontiers in aging neuroscience**, v. 7, n. April, p. 43, 2015.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates: Hard Cover Edition**. [s.l.] Elsevier Science, 2006.

PICCIOTTO, M. R.; HIGLEY, M. J.; MINEUR, Y. S. Acetylcholine as a Neuromodulator: Cholinergic Signaling Shapes Nervous System Function and Behavior. **Neuron**, v. 76, n. 1, p. 116–129, 2012.

PRABHAKAR, N. R. O₂ sensing at the mammalian carotid body: why multiple O₂ sensors and multiple transmitters? **Experimental physiology**, v. 91, n. 1, p. 17–23, jan. 2006.

RESSTEL, L. B. M. et al. Involvement of medial prefrontal cortex neurons in behavioral and cardiovascular responses to contextual fear conditioning. **Neuroscience**, v. 143, n. 2, p. 377–85, 1 dez. 2006.

RESSTEL, L. B. M. et al. Effects of reversible inactivation of the dorsal hippocampus on the behavioral and cardiovascular responses to an aversive conditioned context. **Behavioural pharmacology**, v. 19, n. 2, p. 137–44, 2008.

RESSTEL, L. B. M.; CORRÊA, F. M. A. Injection of l-glutamate into medial prefrontal cortex induces cardiovascular responses through NMDA receptor - nitric oxide in rat. **Neuropharmacology**, v. 51, n. 1, p. 160–167, 2006.

RESSTEL LEONARDO, JOCA SAMIA , CORRÊA FERNANDO MORGAN, G. F. S. Effects of reversible inactivation of the dorsal hippocampus on the behavioral and cardiovascular responses to an aversive conditioned context. **Behavioural**

pharmacology, p. 137–144, 2008.

RISOLD, P. Y.; SWANSON, L. W. Connections of the rat lateral septal complex. **Brain Research Reviews**, v. 24, n. 2–3, p. 115–195, 1997.

ROSS, C. A. et al. 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. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 4, n. 2, p. 474–94, fev. 1984.

RUIT, K. G.; NEAFSEY, E. J. Cardiovascular and respiratory responses to electrical and chemical stimulation of the hippocampus in anesthetized and awake rats. **Brain Research**, v. 457, n. 2, p. 310–321, ago. 1988.

SALMAN, I. M. **Major Autonomic Neuroregulatory Pathways Underlying Short- and Long-Term Control of Cardiovascular Function** **Current Hypertension Reports**, mar. 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26838031>>. Acesso em: 16 jun. 2016

SCOPINHO, A. A et al. Dorsal and ventral hippocampus modulate autonomic responses but not behavioral consequences associated to acute restraint stress in rats. **PloS one**, v. 8, n. 10, p. e77750, jan. 2013.

SEQUEIRA, H. et al. Cortical control of somato-cardiovascular integration: neuroanatomical studies. **Brain Research Bulletin**, v. 53, n. 1, p. 87–93, set. 2000.

SPIACCI, G. B. L. et al. Dorsal hippocampus cannabinoid type 1 receptors modulate the expression of contextual fear conditioning in rats: Involvement of local glutamatergic/nitroergic and GABAergic neurotransmissions. **European neuropsychopharmacology: the journal of the European College of Neuropsychopharmacology**, p. 1–11, 2016.

TAKAKURA, A. C. T. et al. Peripheral chemoreceptor inputs to retrotrapezoid nucleus (RTN) CO₂-sensitive neurons in rats. **The Journal of physiology**, v. 572, n. Pt 2, p. 503–23, 2006.

TAUPIN, P. **The Hippocampus Neurotransmission and Plasticity in the Nervous System**. [s.l.: s.n.].

VASQUEZ, E. C. et al. Neural reflex regulation of arterial pressure in pathophysiological conditions: interplay among the baroreflex, the cardiopulmonary reflexes and the chemoreflex. v. 30, p. 521–532, 1997.

ZHANG, W. et al. Characterization of central inhibitory muscarinic autoreceptors by the

use of muscarinic acetylcholine receptor knock-out mice. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 22, n. 5, p. 1709–1717, 2002.

ANEXO

ANEXO**ANEXO 1 – CÓPIA DA APROVAÇÃO DO PROJETO DE PESQUISA NA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº. **013/2015**, relativo ao projeto de pesquisa intitulado **“Estudo da participação da neurotransmissão colinérgica no hipocampo dorsal na modulação de respostas cardiovasculares e respiratórias do quimiorreflexo.”** que tem como responsável o (a) docente **Karla Nívea Sampaio**, está de acordo com os princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFES), tendo sido aprovado na reunião ordinária de 08/05/15.



Presidente do
Comitê de Ética no Uso de Animais
CEUA/UFES

Vitória (ES), 08 de maio de 2015.