

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE ARARAQUARA

RAFAELA MOREIRA BARBOSA

**EFEITO DA INJEÇÃO DE ADRENOMEDULINA COMBINADA OU NÃO COM
GLUTAMATO NO BULBO ROSTROVENTROLATERAL DE RATOS
NORMOTENSOS E ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS NÃO ANESTESIADOS.**

Araraquara

2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE ARARAQUARA

**EFEITO DA INJEÇÃO DE ADRENOMEDULINA COMBINADA OU NÃO COM
GLUTAMATO NO BULBO ROSTROVENTROLATERAL DE RATOS
NORMOTENSOS E ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS NÃO ANESTESIADOS.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Curso de Graduação em Farmácia-
Bioquímica da Faculdade de Ciências
Farmacêuticas de Araraquara, da Universidade
Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” –
UNESP, para obtenção do grau de
Farmacêutica-Bioquímica.

Aluno: Rafaela Moreira Barbosa

Orientador: Profª. Dra. Débora Simões de
Almeida Colombari

Araraquara

2012

AGRADECIMENTOS

À Deus, por sempre ter me acompanhado e me abençoado nessa minha caminhada.

Aos meus pais e às minhas irmãs, pela dedicação, confiança e pelo carinho, que me ajudaram a ser o que sou.

Às pessoas que eu amo, pelo companheirismo e lealdade.

À Profa. Dra. Débora Simões de Almeida Colombari, pela ótima orientação dada durante a execução deste trabalho.

À todas as pessoas do Laboratório de Fisiologia, que também participaram direta ou indiretamente deste trabalho.

E ao CNPq/PIBIC, por financiar o projeto de pesquisa durante minha iniciação científica.

SUMÁRIO

1. RESUMO	5
2. LISTA DE FIGURAS	7
3. LISTA DE ABREVIATURAS	9
4. INTRODUÇÃO	10
5. OBJETIVOS	16
6. MATERIAIS E MÉTODOS	17
6.1. Animais	17
6.2. Implante de cânulas na região rostroventrolateral do bulbo (RVL)	17
6.3. Drogas	18
6.4. Registro da pressão arterial e da frequência cardíaca (FC) em animais não anestesiados e administração endovenosa de drogas	18
6.5. Injeção de drogas no RVL	19
6.6. Histologia encefálica para localização dos pontos de injeções	19
6.7. Apresentação dos resultados e estatística	20
7. EXPERIMENTOS REALIZADOS	21
7.1. Administração unilateral de ADM no RVL e análise da pressão arterial, da FC e da resposta pressora do glutamato (GLU) em ratos normotensos não anestesiados	21
7.2. Administração unilateral de ADM no RVL e análise da pressão arterial, da FC e da resposta pressora do glutamato (GLU) em SHR não anestesiados	21
7.3. Administração bilateral de ADM no RVL e análise do quimiorreflexo em ratos normotensos não anestesiados	22
7.4. Administração bilateral de ADM no RVL e análise do quimiorreflexo em SHR não anestesiados	22

8. RESULTADOS	24
8.1. <i>Efeitos da ADM injetada no RVL sobre a pressão arterial e a FC e sobre a resposta pressora do GLU em ratos normotensos não anestesiados</i>	24
8.2. <i>Efeitos da ADM injetada no RVL sobre a pressão arterial e FC e sobre a resposta pressora do GLU em SHR não anestesiados</i>	28
8.3. <i>Efeitos da ADM injetada bilateralmente no RVL sobre a pressão arterial e sobre a resposta do quimiorreflexo em ratos normotensos não anestesiados.</i>	31
8.4. <i>Efeitos da ADM injetada bilateralmente no RVL sobre a pressão arterial e sobre a resposta do quimiorreflexo em SHR não anestesiados</i>	33
9. HISTOLOGIA	35
10. DISCUSSÃO	36
11. CONCLUSÃO	38
12. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39

1. RESUMO

O bulbo rostroventrolateral (RVL) é uma estrutura importante para o controle cardiovascular. Em ratos espontaneamente hipertensos (SHR), há evidências de que a transmissão glutamatérgica descendente do RVL aos neurônios pré-ganglionares simpáticos é maior quando comparada com os ratos Wistar Kyoto (WKY). A adrenomedulina (ADM) é um peptídeo de 52 aminoácidos que tem como funções: vasodilatação, broncodilatação e neurotransmissão no sistema nervoso central (SNC). Dados da literatura têm demonstrado que a ADM quando microinjetada no RVL de ratos normotensos anestesiados ou normotensos não anestesiados promove aumento da pressão arterial. Ademais, também já foi demonstrado que a microinjeção bilateral no RVL do antagonista de ADM (adrenomedulina 22-52) em SHR anestesiados foi capaz de reduzir significativamente a pressão arterial, enquanto que não foi observado alterações da pressão arterial em ratos normotensos. Uma vez que foi descrito que em SHR há um maior número de receptores de ADM no RVL quando comparado com ratos normotensos, esses dados obtidos são convergentes com a idéia de que maior número de receptores de ADM no RVL de SHR possam ser um dos fatores responsáveis pela hipertensão nestes animais. Entretanto, até o momento, não sabemos os efeitos da ADM no RVL de SHR não anestesiados, uma vez que a anestesia pode interferir com a resposta cardiovascular. Estudos anteriores demonstraram que o efeito pressor da ADM no RVL são dependentes de receptores glutamatérgicos, sugerindo uma interação entre a ADM e o glutamato (GLU). Assim, seria interessante estudar a interação entre ADM e a neurotransmissão glutamatérgica no RVL. Por isso, o presente estudo teve como objetivo estudar os efeitos da microinjeção de ADM no RVL e seu efeito sobre a resposta pressora do GLU em ratos normotensos e SHR conscientes. Os efeitos da ADM na resposta do quimiorreflexo também foi estudada.

Para realizar este trabalho, foram utilizados ratos normotensos e SHR com cânulas de aço inoxidável implantadas no RVL. A pressão arterial pulsátil (PAP), a pressão arterial média (PAM) e a frequência cardíaca (FC) foram analisadas nos animais, que receberam salina (NaCl 0,15 M/100 nL), GLU (1 nmol), ADM (0,1 nmol) e mais duas doses de GLU, 5 minutos e 20 minutos após a microinjeção de ADM. Nos animais normotensos, a ADM causou um aumento significativo da PAM (15 ± 4 mmHg vs. salina: -1 ± 1 mmHg e 20 ± 8 mmHg vs. salina: $-2,0 \pm 1$ mmHg; $p < 0,05$) e a mesma não alterou a resposta pressora do GLU (GLU 5 minutos após ADM: 36 ± 6 mmHg vs. GLU antes ADM: 35 ± 6 mmHg e GLU 20 minutos após ADM: 24 ± 8 mmHg vs. GLU antes ADM: 24 ± 5 mmHg). Em SHR, a ADM causou um discreto aumento significativo da PAM (10 ± 1 mmHg vs. controle: $-1 \pm 0,2$ mmHg; $p < 0,05$) e a mesma não alterou a resposta pressora do GLU (GLU 20 minutos após ADM: 29 ± 2 mmHg vs. GLU 5 minutos após ADM: 25 ± 3 mmHg vs. GLU antes ADM: 38 ± 3 mmHg). Não houve alteração da resposta pressora do quimiorreflexo após a ADM no RVL de ratos normotensos ou SHR.

Nossos resultados sugerem que em ratos normotensos e hipertensos acordados a ADM microinjetada no RVL também produz aumento da PAM, como observado em ratos anestesiados. Diferente da nossa hipótese, ADM não altera a resposta pressora do GLU, sugerindo que em ratos normotensos e hipertensos não anestesiados a interação entre ADM e GLU no RVL pode não ocorrer. Ainda não temos dados suficientes para concluir a ausência de efeitos da ADM sobre a resposta simpatoexcitatória do quimiorreflexo.

2. LISTA DE FIGURAS

Figura I: Corte longitudinal do encéfalo de um rato, mostrando a localização do RVL e um esquema simplificando o barorreflexo mediado por essa região.....12

Figura II: Mudanças na PAM induzidas pela microinjeção de salina e ADM no RLV em ratos normotensos não anestesiados. Os resultados foram expressos como média $\pm$ EPM. Teste *t* de Student; $p < 0,05$. $n = 5$25

Figura III: Mudanças na PAM induzidas pela microinjeção de GLU no RLV em ratos normotensos não anestesiados, antes e 5 min após ADM 0,1 nmol também no RVL. Os resultados foram expressos como média $\pm$ EPM. Anova de uma via para medidas repetidas. $n = 5$25

Figura IV: Traçado representativo mostrando mudanças na PAP, PAM e FC induzida pelo GLU antes e 5 min depois de ADM no RVL em ratos normotensos não anestesiados.....26

Figura V: Mudanças na PAM induzidas pela microinjeção de salina e ADM no RLV em ratos normotensos não anestesiados. Os resultados foram expressos como média $\pm$ EPM. Teste *t* de Student; $p < 0,05$. $n = 8$27

Figura VI: Mudanças na PAM induzidas pela microinjeção de GLU no RLV em ratos normotensos não anestesiados, antes e 20 min após ADM 0,1 nmol também no RVL. Os resultados foram expressos como média $\pm$ EPM. Anova de uma via, medidas repetidas. $n = 8$27

Figura VII: Mudanças na PAM induzidas pela microinjeção de salina e ADM no RLV em SHR não anestesiados. Os resultados foram expressos como média $\pm$ EPM. Teste <i>t</i> de Student; $p < 0,05$. $n = 5$	29
Figura VIII: Mudanças na PAM induzidas pela microinjeção de GLU no RLV em SHR não anestesiados, antes, 5 e 20 min após ADM 0,1 nmol também no RVL. Os resultados foram expressos como média $\pm$ EPM. Anova de uma via, medidas repetidas. $n = 5$	29
Figura IX: Traçado representativo mostrando mudanças na PAP, PAM e FC induzida pelo GLU antes, 5 e 20 min depois de ADM no RVL em ratos SHR não anestesiados.....	30
Figura X: Mudanças na PAM e FC induzidas pela administração de KCN (40 μ g/0,1 mL) em ratos normotensos não anestesiados, antes e após ADM 0,1 nmol também no RVL de ratos normotensos. Os resultados foram expressos como média $\pm$ EPM. Anova de uma via, medidas repetidas; $p < 0,05$. $n = 5$	32
Figura XI: Mudanças na PAM e FC induzidas pela administração de KCN (40 μ g/0,1 mL) em ratos SHR não anestesiados, antes e após ADM 0,1 nmol também no RVL de ratos SHR. Os resultados foram expressos como média $\pm$ EPM. Anova de uma via, medidas repetidas. $n = 4$	34
Figura XII: Fotomicrografia representativa do grupo mostrando o sítio de microinjeção unilateral no RVL (seta). NA = núcleo ambíguo.....	35

3. LISTA DE ABREVIATURAS

ADM	adrenomedulina
RVL	bulbo rostroventrolateral
SHR	rato espontaneamente hipertenso
FC	frequência cardíaca
GLU	glutamato
icv	intracerebroventricular
NaCN	cianeto de sódio
PVN	núcleo paraventricular do hipotálamo
PAM	pressão arterial média
PAP	pressão arterial pulsátil
SNC	sistema nervoso central
WKY	Wistar Kyoto

4. INTRODUÇÃO

A pressão arterial alta, hipertensão, atinge 1/3 da população dos países ocidentais. A hipertensão triplica o risco de doenças coronarianas, aumenta o risco de infarto e de insuficiência cardíaca congestiva (eg, www.heartstats.org). Existem duas linhas científicas diferentes que discutem os possíveis mecanismos para o desenvolvimento e manutenção da hipertensão. Primeiramente, há a clássica linha “Guytoniana”, a qual sustenta que alterações na função do rim aciona o gatilho para a hipertensão. A segunda linha sustenta que o conceito de hipertensão “neurogênica” seja um resultado de alterações na função de áreas do sistema nervoso central (SNC) que levariam a uma disfunção da atividade do sistema nervoso autônomo. Entretanto, é possível que ambas as linhas sejam simplistas, uma vez que a hipertensão é uma síndrome sistêmica multifatorial, poligenética, com os níveis de pressão arterial elevados sendo mantidos por meio de alterações de vários mecanismos regulatórios por todo o organismo. De fato, clinicamente, as terapias que utilizam apenas uma droga no controle da hipertensão normalmente falham em restabelecer a pressão arterial em níveis normais em vários pacientes com hipertensão essencial. Desta forma, novos estudos sobre a hipertensão neurogênica se fazem necessários, como discutido por Mann (Mann, 2003).

Vale a pena ressaltar que embora não exista um modelo animal perfeito de hipertensão, tem sido sugerido que o rato espontaneamente hipertenso (SHR) é um modelo animal que pode ser comparado à hipertensão essencial em humanos (Trippodo e Frohlich, 1981). Os SHR são geneticamente programados e constituem um modelo animal de hipertensão amplamente utilizado. A hipertensão observada nos SHR tem paralelo com a hipertensão essencial que ocorre em humanos, tais como, 1) disfunção autonômica (atividade simpática aumentada que ocorre antes do início da hipertensão e é mantida no estado

hipertensivo); 2) lesão tecidual em órgão alvo (hipertrofia cardíaca, disfunção renal e endotelial) e 3) sensibilidade aumentada aos inibidores da enzima conversora de angiotensina (Morishita *et al.*, 1995). Ademais, em SHR, a hipertensão se desenvolve com o desenvolvimento (idade) do animal, sem necessidade de alteração na dieta alimentar ou de estímulo ambiental (Trippodo e Frohlich, 1981).

Controle central da pressão arterial

Uma série de evidências experimentais mostra que estruturas bulbares e hipotalâmicas regulam o fluxo motor autonômico cardiovascular e que o aumento da atividade simpática está associado com a hipertensão em modelos animais e em humanos (Esler *et al.*, 2001; Guyenet, 2006; Mann, 2003; Pettersson *et al.*, 1986). Das estruturas bulbares importantes para o controle cardiovascular podemos citar o bulbo rostroventrolateral (RVL).

Situado na porção anterior do bulbo, imediatamente caudal ao núcleo do nervo facial, o RVL é uma região chave para o controle cardiovascular [revisão em (Dampney, 1994; Guyenet, 2006)]. A lesão aguda do RVL ou sua inibição promove uma queda abrupta da pressão arterial para níveis iguais aos observados após a transsecção espinal (Alexander, 1946; Feldberg e Guertzenstein, 1986). O RVL é o principal sítio de neurônios pré-motores bulbo-espinhais que inervam os neurônios pré-ganglionares simpáticos na coluna intermédio lateral da medula espinal (**Figura I**). De fato, muito do tônus simpático destinado ao coração e às arteríolas é gerado no RVL, o qual também sofre profunda modulação do barorreflexo (Dampney, 1994; Guyenet, 2006). Ademais, o RVL desempenha uma função essencial em mediar respostas simpatoexcitatórias que são evocadas por estruturas supra-medulares tais como o núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) (Alexander, 1946; Tagawa e Dampney,

1999; Yang *et al.*, 2001; Yang e Coote, 1998). Em SHR, há evidências de que a transmissão glutamatérgica descendente do RVL aos neurônios pré-ganglionares simpáticos é maior quando comparada com os ratos WKY (pares normotensos dos SHR). Isto poderia ser decorrente de um aumento da transmissão glutamatérgica nos neurônios do RVL em SHR (Ito *et al.*, 2000), que por sua vez poderia ser em parte devido ao aumento da atividade de neurônios do PVN (Yang *et al.*, 2001). Outros neurotransmissores podem também estar envolvidos no desenvolvimento da hipertensão, no RVL.

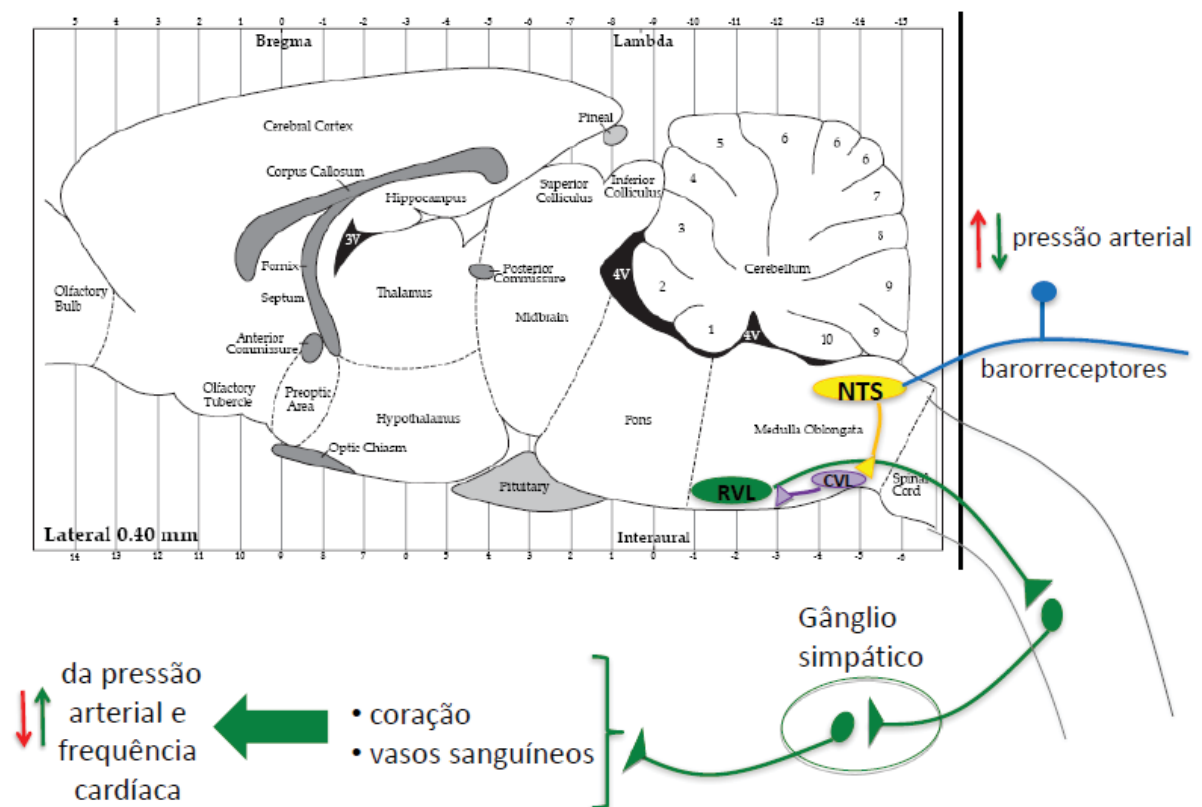


Figura I: Corte longitudinal do encéfalo de um rato, mostrando a localização do RVL e um esquema simplificando o barorreflexo mediado por essa região.

Adrenomedulina e pressão arterial

A adrenomedulina (ADM) é um peptídeo de 52 aminoácidos que tem como funções: vasodilatação, broncodilatação e neurotransmissão no SNC. A ADM foi inicialmente isolada de feocromocitoma humano e é um dos mais potentes peptídeos hipotensores (Kitamura *et al.*, 1993). Abundantes sítios específicos de ligação para ADM foram observados no tecido periférico, bem como no SNC, (Sakata *et al.*, 1994; Serrano *et al.*, 2002; Ueta *et al.*, 1999). Esta evidência sugere que a ADM central pode agir em neurônios do SNC como um neurotransmissor/neuromodulador, envolvendo a rede neural para produzir várias respostas fisiológicas. É interessante notar que a administração de ADM intracerebroventricular (icv) ou no RVL provoca hipertensão (Saita *et al.*, 1998; Shan e Krukoff, 2001; Xu e Krukoff, 2004). Dados da literatura têm demonstrado que a ADM quando microinjetada no RVL de ratos normotensos anestesiados (Xu e Krukoff, 2004) promove aumento da pressão arterial e parece que a via da proteína quinase A está envolvida neste efeito (Xu e Krukoff, 2006), sugerindo que esses receptores sejam acoplados à proteína G. No RVL de SHR parece ter uma maior expressão de receptores para a ADM e o bloqueio desses receptores pelo uso de um antagonista promove uma diminuição da pressão arterial em SHR, mas não em ratos normotensos (Colombari *et al.*, 2009). Uma vez que foi descrito que SHR há um maior número de receptores de ADM no RVL quando comparado com ratos normotensos, os dados obtidos em nosso laboratório são convergentes com a idéia de que maior número de receptores de ADM no RVL de SHR possa ser um dos fatores responsáveis pela hipertensão nestes animais.

Em conjunto, os dados acima citados demonstram que a ADM produz efeitos pressores quando microinjetada no RVL de ratos normotensos anestesiados e que o antagonista de ADM microinjetado bilateralmente no RVL reduz a pressão arterial basal em SHR anestesiados. Entretanto, até o momento, não sabemos os efeitos da ADM no RVL de

ratos normotensos e SHR não anestesiados, uma vez que a anestesia pode interferir com a resposta cardiovascular.

Xu *et al.* (Xu e Krukoff, 2004) demonstraram que o efeito pressor da ADM no RVL são dependentes de receptores glutamatérgicos, sugerindo uma interação entre a ADM e o glutamato (GLU), um dos mais importantes neurotransmissores excitatórios do sistema nervoso central. Recentemente foi demonstrado que o peptídeo angiotensina II, quando microinjetado no RVL em doses que não são pressoras, aumenta a resposta pressora do GLU, sugerindo uma modulação angiotensinérgica da resposta do GLU no RVL em ratos normotensos (Vieira *et al.*, 2010). Assim, seria interessante estudar a interação entre ADM e a neurotransmissão glutamatérgica no RVL. É lícito supor que a ADM facilite a resposta pressora do GLU no RVL em ratos normotensos e SHR, podendo a facilitação ser maior nos SHR.

Os neurônios do RVL podem ser ativados por cianeto de sódio (NaCN) ou por hipóxia induzida pela mistura de 3% O₂ e 97% N₂, (Koganezawa e Terui, 2007). A exposição direta de CN em fatias do RVL (*slices*) pode ativar os neurônios do RVL (Wang *et al.*, 2001). Outros estudos demonstraram que a expressão de ADM é maior no córtex de ratos submetidos a hipóxia-hipobárica (Serrano *et al.*, 2008) e que camundongos transgênicos *knockout* para ADM no encéfalo são menos resistentes à hipóxia hipobárica do que os camundongos selvagens (*wild type*), demonstrando uma função neuroprotetora da ADM no SNC (Fernandez *et al.*, 2008). Desta forma, é possível que a ADM interfira com as respostas do quimiorreflexo (hipertensão e bradicardia). De fato, dados do nosso laboratório em colaboração com o laboratório do Dr. David Murphy e Dr. Julian Paton (ambos da *University of Bristol*) demonstraram em uma preparação *in situ* artificialmente perfundidas, denominada de *Working Heart-Brainstem Preparation* (WHBP), (Paton, 1996) que a injeção bilateral de

ADM potencializou a resposta do quimiorreflexo induzida por NaCN (Colombari *et al.*, 2011).

Diante das evidências descritas, a ADM no RVL pode estar envolvida com o controle cardiovascular da hipertensão.

5. OBJETIVOS

Verificar em ratos normotensos e SHR não anestesiados os efeitos da microinjeção de ADM no RVL e a influência da ADM no RVL nas respostas pressoras do GLU também no RVL em ratos normotensos e SHR.

Verificar em ratos normotensos e SHR não anestesiados os efeitos da microinjeção de ADM no RVL sobre a resposta do quimiorreflexo.

6. MATERIAIS E MÉTODOS

6.1. Animais

Foram utilizados ratos Holtzman (normotensos), pesando entre 280 a 320 g, com PAM basal = 112 ± 2 mmHg e FC basal = 339 ± 19 bpm e SHR (12 a 16 semanas), com PAM basal = 184 ± 5 mmHg e FC basal = 384 ± 6 bpm, fornecidos pelo Biotério das Faculdades de Odontologia e Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, câmpus de Araraquara. SHR desenvolvem hipertensão a partir da 8ª semana de vida, ou seja, com 12-16 semanas já estavam hipertensos. Os animais foram mantidos com água de torneira e ração granulada (Purina) *ad libitum* em gaiolas individuais. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética desta mesma faculdade (processo CEEA 09/2010).

6.2. Implante de cânulas na região rostroventrolateral do bulbo (RVL)

Os animais foram anestesiados com quetamina (80 mg/kg de peso corporal) e xilazina (7 mg/kg de peso corporal) e adaptados a um aparelho estereotáxico (modelo Kopf 900). Após a incisão longitudinal da pele e do tecido subcutâneo da cabeça, o perióstio foi afastado, as suturas de bregma e lambda foram expostas, e serviram como referência para nivelamento da cabeça do animal. Determinado o ponto de introdução da cânula de aço inoxidável (15 x 0,7 mm d.i.), foi executada a trepanação da abóbada com auxílio de uma broca esférica. Através desse orifício, a cânula foi introduzida baseada nos parâmetros estereotáxicos do Atlas de Paxinos e Watson (Paxinos e Watson, 1986), a saber: AP = 4,6 mm caudal à sutura lambdóide; L= 1,8 mm lateral à sutura lambdoide e V = 6,5 mm abaixo da superfície do osso. As cânulas uni ou bilaterais foram fixadas nas cabeças dos ratos com

parafusos e resina acrílica e uma dose profilática de penicilina (50.000 UI, intramuscularmente) e uma dose de antiinflamatório (cetoprofeno 1%, 0,1 ml/rato, subcutaneamente) foram administradas.

6.3. Drogas

As drogas utilizadas neste trabalho foram:

- adrenomedulina (0,1 nmol /100 nL), American Peptides, USA
- glutamato (1 nmol/100 nL), Sigma, USA
- KCN (40 µg/0,1 mL), Sigma, USA

Adrenomedulina, glutamato e KCN foram dissolvidos em salina (NaCl 0,15 M)

6.4. Registro da pressão arterial e da frequência cardíaca (FC) em animais não anestesiados e administração endovenosa de drogas

Cinco a sete dias após o implante de cânulas no RVL, no dia anterior ao experimento, os animais foram anestesiados com uma mistura de quetamina (80 mg/kg de peso corporal) e xilazina (7 mg/kg de peso corporal) para a canulação da artéria e veia femorais para o registro da pressão arterial, da FC e injeção de KCN, respectivamente. As cânulas consistem em tubos de polietileno PE-10 soldados a tubos de polietileno PE-50. No final da canulação da artéria e veia femorais, as cânulas foram exteriorizadas e suturadas na pele do dorso do animal. No dia seguinte, a cânula da artéria femoral foi conectada a um transdutor de pressão (Stathan Gould) e acoplado a um amplificador (ETH-200, CB SCIENCES INC) e a um sistema de aquisição e análise de dados (PowerLab,

ADInstruments). A PAP, PAM e FC foram registradas simultaneamente. A PAM foi calculada a partir do sinal de PAP. A FC foi calculada como a frequência instantânea do sinal de PAP. Pela cânula da veia femoral foram feitas injeções em bolus de KCN (40 μ g/0,1 ml/rato).

6.5. Injeção de drogas no RVL

As injeções no RVL foram feitas com seringa de microlitro Hamilton (1 μ l), conectada a uma cânula injetora de aço inoxidável com 18,5 mm de comprimento (3,5 mm a mais que a cânula guia implantada no RVL), através de um tubo de polietileno (PE-10). O volume injetado foi de 100 nL.

6.6. Histologia encefálica para localização dos pontos de injeções

No final dos experimentos, sob anestesia profunda, o coração dos animais foi exposto cirurgicamente e foi realizada primeiramente perfusão de solução de formalina a 10%. A seguir, os encéfalos foram retirados e mergulhados no mesmo agente fixador por pelo menos 72 h. Posteriormente, utilizando um micrótomo de congelamento (Leica SM 2000 R) os cérebros foram seccionados em cortes coronais de 50 μ m, corados pela técnica de Nissl para posterior análise no microscópio óptico. Foram considerados apenas os resultados dos ratos com histologia positiva, sendo os resultados dos ratos com histologia negativa descartados.

6.7. Apresentação dos resultados e estatística

Os resultados foram tabelados. Os dados foram expressos como média $\pm$ EPM e analisados através de análise de variância, associadas ao teste de Student-Newman-Keuls ou teste t de Student, conforme o indicado. Diferenças foram consideradas significantes para $p < 0,05$.

7. EXPERIMENTOS REALIZADOS

7.1. Administração unilateral de ADM no RVL e análise da pressão arterial, da FC e da resposta pressora do glutamato (GLU) em ratos normotensos não anestesiados

No dia do experimento, 5 a 7 dias após o implante de cânulas em direção ao RVL, foram registradas as PAP, PAM e FC, conforme descrito anteriormente. Em um grupo de animais, inicialmente (tempo zero), os animais receberam sequencialmente no RVL uma microinjeção de NaCl 0,15 M (100 nL). Após 10 minutos, foi realizada no RVL uma microinjeção de GLU (1 nmol/100 nL). Novamente após 10 minutos, foi realizada no RVL uma microinjeção de uma dose pressora de 0,1 nmol/100 nL de ADM. Passados 5 minutos da microinjeção de ADM, GLU foi novamente microinjetado no RVL e o efeito pressor foi analisado. Em um segundo grupo de animais, foi seguido o mesmo protocolo descrito acima, com a diferença que a última microinjeção de GLU foi realizada 20 minutos após a microinjeção de ADM. Todas as microinjeções foram realizadas ipsilaterais.

7.2. Administração unilateral de ADM no RVL e análise da pressão arterial, da FC e da resposta pressora do glutamato (GLU) em SHR não anestesiados.

No dia do experimento, 5 a 7 dias após o implante de cânulas em direção ao RVL, foram registradas as PAP, PAM e FC, conforme descrito anteriormente. Em um grupo de animais, inicialmente (tempo zero), os animais receberam sequencialmente no RVL uma microinjeção de NaCl 0,15 M (100 nL). Após 10 minutos, foi realizada no RVL uma microinjeção de GLU (1 nmol/100 nL). Novamente após 10 minutos, foi realizada no RVL uma microinjeção de uma dose pressora de 0,1 nmol/100 nL de ADM. Passados 5 e 20

minutos da microinjeção de ADM, GLU foi novamente microinjetado no RVL e o efeito pressor foi analisado. Todas as microinjeções foram realizadas ipsilaterais

7.3. Administração bilateral de ADM no RVL e análise do quimiorreflexo em ratos normotensos não anestesiados

No dia do experimento, 5 a 7 dias após o implante de cânulas bilaterais em direção ao RVL, foram registradas as PAP, PAM e FC, conforme descrito anteriormente. Em um grupo de animais, inicialmente (tempo zero), os animais receberam sequencialmente 3 injeções iv de KCN (40 μ g/0,1 ml/rato), para estimular o quimiorreflexo, com diferença de 5 min entre cada injeção. Após 5 e 15 min da administração da última injeção de KCN, foram microinjetados bilateralmente no RVL, respectivamente, salina (NaCl 0,15 M, 100 nL) e ADM (0,1 nmol/100 nL). Decorridos 10-15 min, as 3 injeções de KCN foram realizadas novamente.

7.4. Administração bilateral de ADM no RVL e análise do quimiorreflexo em SHR não anestesiados

No dia do experimento, 5 a 7 dias após o implante de cânulas bilaterais em direção ao RVL, foram registradas as PAP, PAM e FC, conforme descrito anteriormente. Em um grupo de animais, inicialmente (tempo zero), os animais receberam sequencialmente 3 injeções iv de KCN (40 μ g/0,1 ml/rato), para estimular o quimiorreflexo, com diferença de 5 min entre cada injeção. Após 5 e 15 min da administração da última injeção de KCN, foram microinjetados bilateralmente no RVL, respectivamente, salina (NaCl 0,15 M, 100 nL) e

ADM (0,1 nmol/100 nL). Decorridos 10-15 min, as 3 injeções de KCN foram realizadas novamente.

8. RESULTADOS

8.1. Efeitos da ADM injetada no RVL sobre a pressão arterial e a FC e sobre a resposta pressora do GLU em ratos normotensos não anestesiados

Na **Figura II** verifica-se que a microinjeção de ADM no RVL causou uma resposta pressora em ratos normotensos não anestesiados (15 ± 4 mmHg vs. salina: -1 ± 1 mmHg) e que a resposta pressora do GLU não foi alterada após 5 minutos da microinjeção de ADM (GLU 5 minutos após ADM: 36 ± 6 mmHg vs. GLU antes ADM: 35 ± 6 mmHg), **Figura III**. Um traçado representativo deste grupo está apresentado na **Figura IV**.

Na **Figura V** (segundo grupo de animais), verifica-se novamente que a microinjeção de ADM no RVL causou uma resposta pressora em ratos normotensos não anestesiados (20 ± 8 mmHg vs. salina: $-2,0 \pm 1$ mmHg) e que a resposta pressora do GLU não foi alterada após 20 minutos da microinjeção de ADM (GLU 20 minutos após ADM: 24 ± 8 mmHg vs. GLU antes ADM: 24 ± 5 mmHg), **Figura VI**.

Não houve alteração sobre a FC

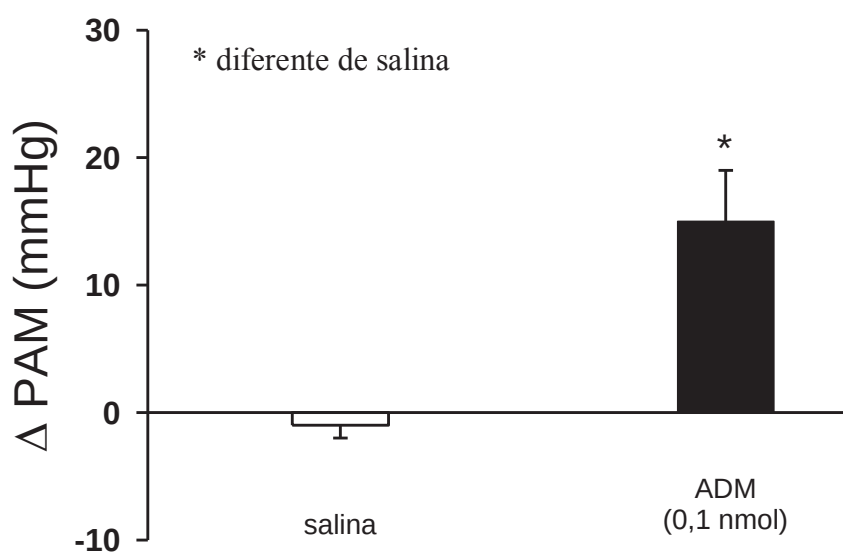


Figura II: Mudanças na PAM induzidas pela microinjeção de salina e ADM no RLV em ratos normotensos não anestesiados. Os resultados foram expressos como média $\pm$ EPM. Teste t de Student; $p < 0,05$. $n = 5$.

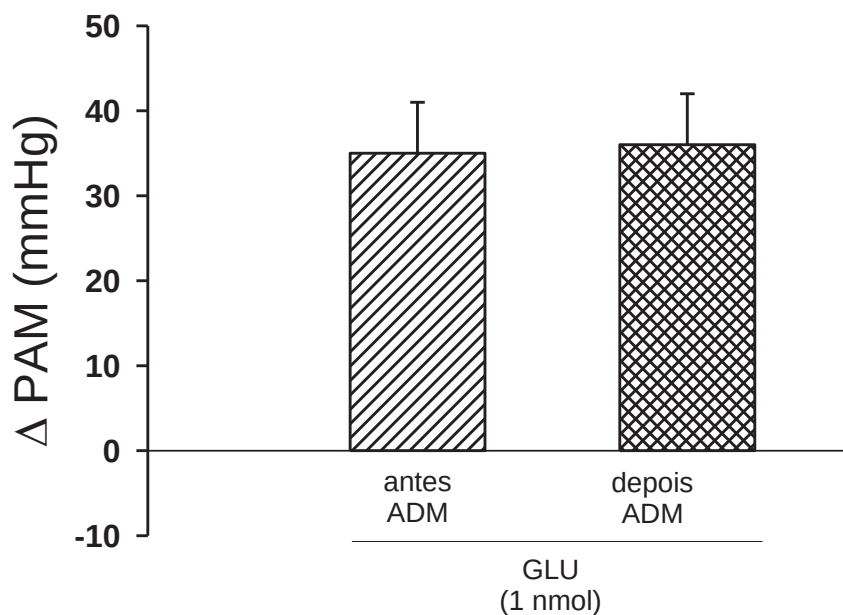


Figura III: Mudanças na PAM induzidas pela microinjeção de GLU no RLV em ratos normotensos não anestesiados, antes e 5 min após ADM 0,1 nmol também no RVL. Os resultados foram expressos como média $\pm$ EPM. Anova de uma via para medidas repetida. $n = 5$.

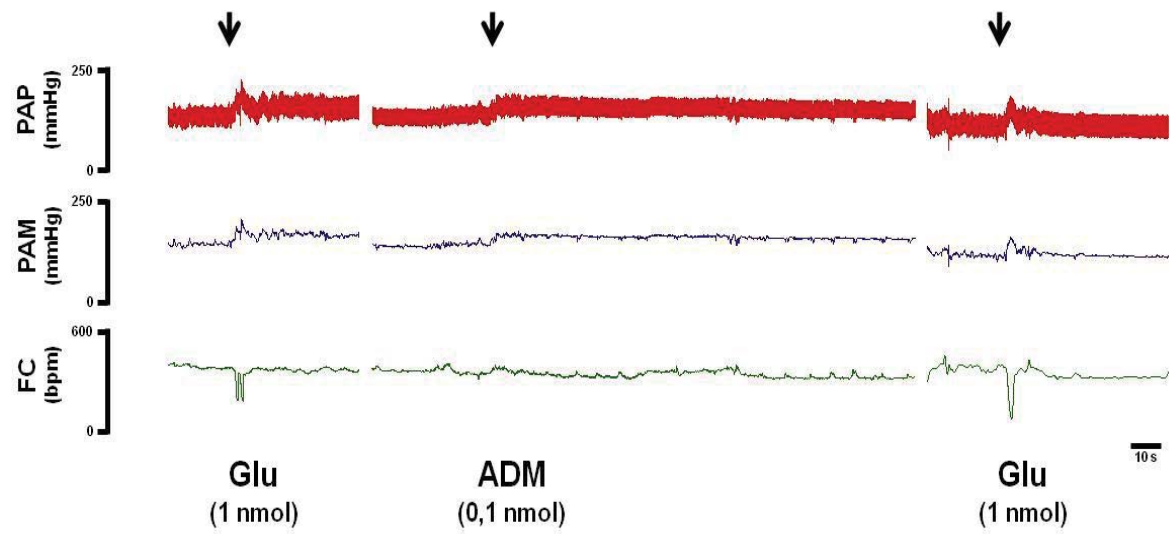


Figura IV: Traçado representativo mostrando mudanças na PAP, PAM e FC induzida pelo GLU antes e 5 min depois de ADM no RVL em ratos normotensos não anestesiados.

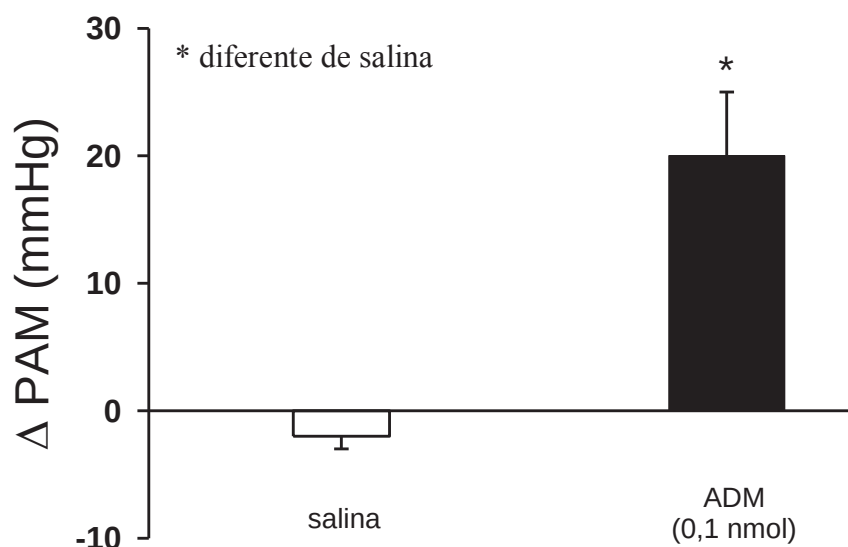


Figura V: Mudanças na PAM induzidas pela microinjeção de salina e ADM no RLV em ratos normotensos não anestesiados. Os resultados foram expressos como média $\pm$ EPM.

Teste *t* de Student; $p < 0,05$. $n = 8$.

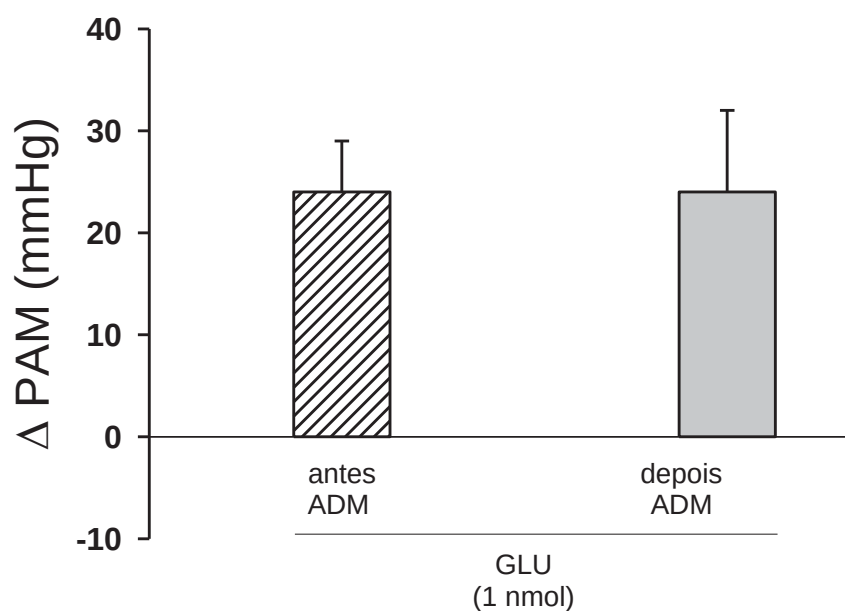


Figura VI: Mudanças na PAM induzidas pela microinjeção de GLU no RLV em ratos normotensos não anestesiados, antes e 20 min após ADM 0,1 nmol também no RVL. Os resultados foram expressos como média $\pm$ EPM. Anova de uma via, medidas repetidas. $n = 8$.

8.2. Efeitos da ADM injetada no RVL sobre a pressão arterial e FC e sobre a resposta pressora do GLU em SHR não anestesiados

Na **Figura VII** verifica-se que a microinjeção de ADM no RVL causou uma discreta resposta pressora em SHR não anestesiados (10 ± 1 mmHg vs. salina: $-1 \pm 0,2$ mmHg). Não houve significância entre as respostas pressoras do GLU antes e 5 e 20 min após a microinjeção de ADM no RVL (**Figura VIII**). Um traçado representativo deste grupo está apresentado na **Figura IX**.

Não houve alteração sobre a FC.

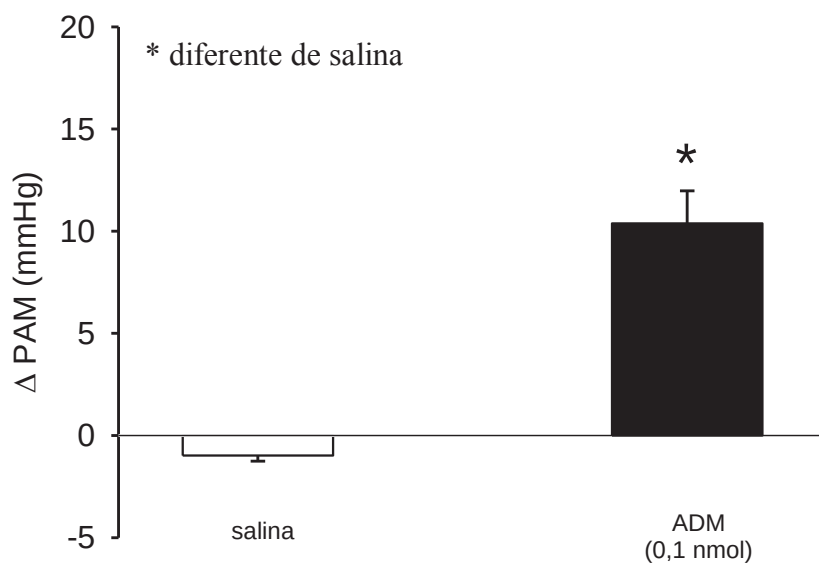


Figura VII: Mudanças na PAM induzidas pela microinjeção de salina e ADM no RLV em SHR não anestesiados. Os resultados foram expressos como média $\pm$ EPM. Teste *t* de Student; $p < 0,05$. $n = 5$.

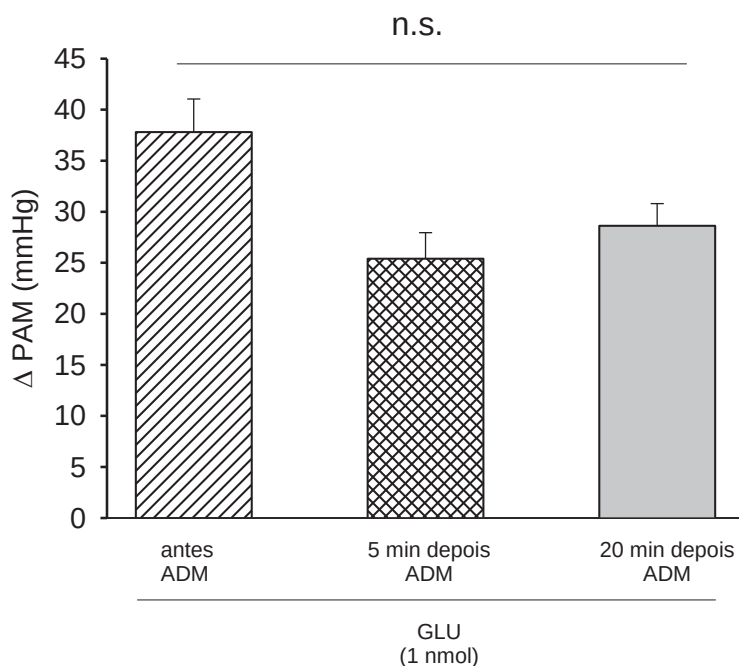


Figura VIII: Mudanças na PAM induzidas pela microinjeção de GLU no RLV em SHR não anestesiados, antes, 5 e 20 min após ADM 0,1 nmol também no RVL. Os resultados foram expressos como média $\pm$ EPM. Anova de uma via, medidas repetidas. $n = 5$.

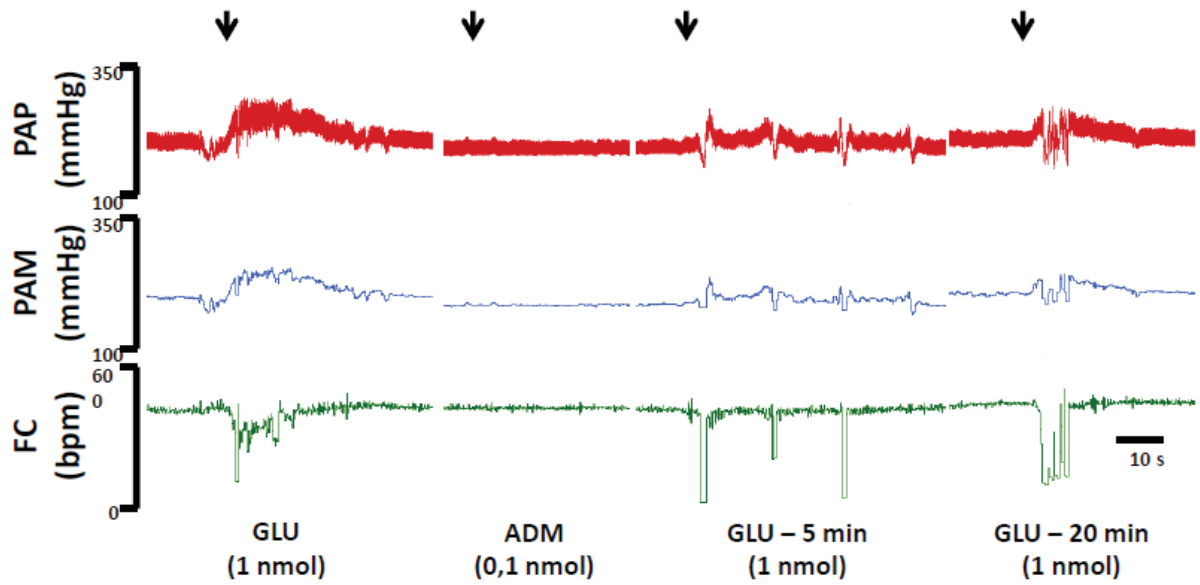


Figura IX: Traçado representativo mostrando mudanças na PAP, PAM e FC induzida pelo GLU antes, 5 e 20 min depois de ADM no RVL em SHR não anestesiados

8.3. Efeitos da ADM injetada bilateralmente no RVL sobre a pressão arterial e sobre a resposta do quimiorreflexo em ratos normotensos não anestesiados.

Na **Figura X** podemos observar que a resposta pressora induzida pela ativação do quimiorreflexo não foi diferente antes e após a ADM no RVL de ratos normotensos. Houve uma redução da resposta bradicardica induzida pela ativação do quimiorreflexo com KCN.

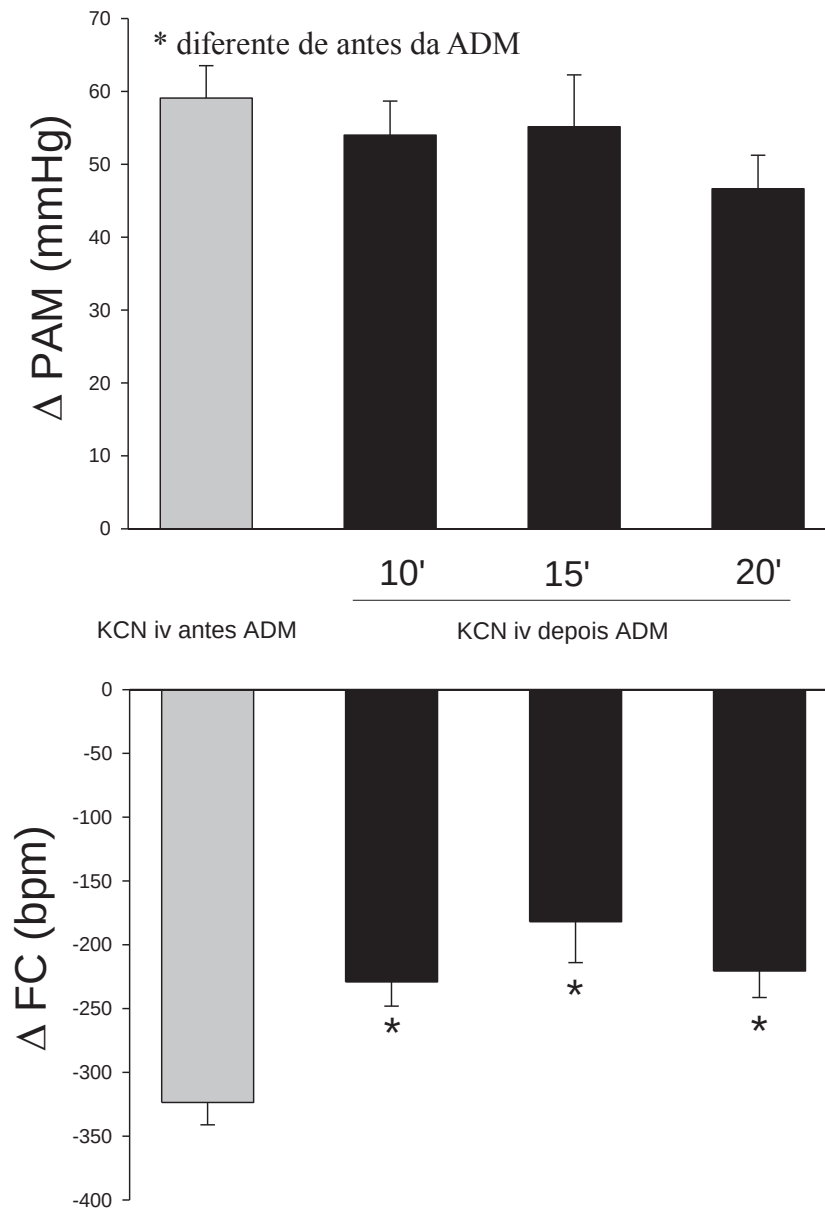


Figura X: Mudanças na PAM e FC induzidas pela administração de KCN (40 μ g/0,1 mL) em ratos normotensos não anestesiados, antes e após ADM 0,1 nmol também no RVL de ratos normotensos. Os resultados foram expressos como média $\pm$ EPM. Anova de uma via, medidas repetidas; $p < 0,05$. $n = 5$.

8.4. Efeitos da ADM injetada bilateralmente no RVL sobre a pressão arterial e sobre a resposta do quimiorreflexo em SHR não anestesiados.

Na **Figura XI** podemos observar que a resposta pressora induzida pela ativação do quimiorreflexo não foi diferente antes e após a ADM no RVL de SHR. Não houve alteração na resposta bradicárdica induzida pela ativação do quimiorreflexo com KCN.

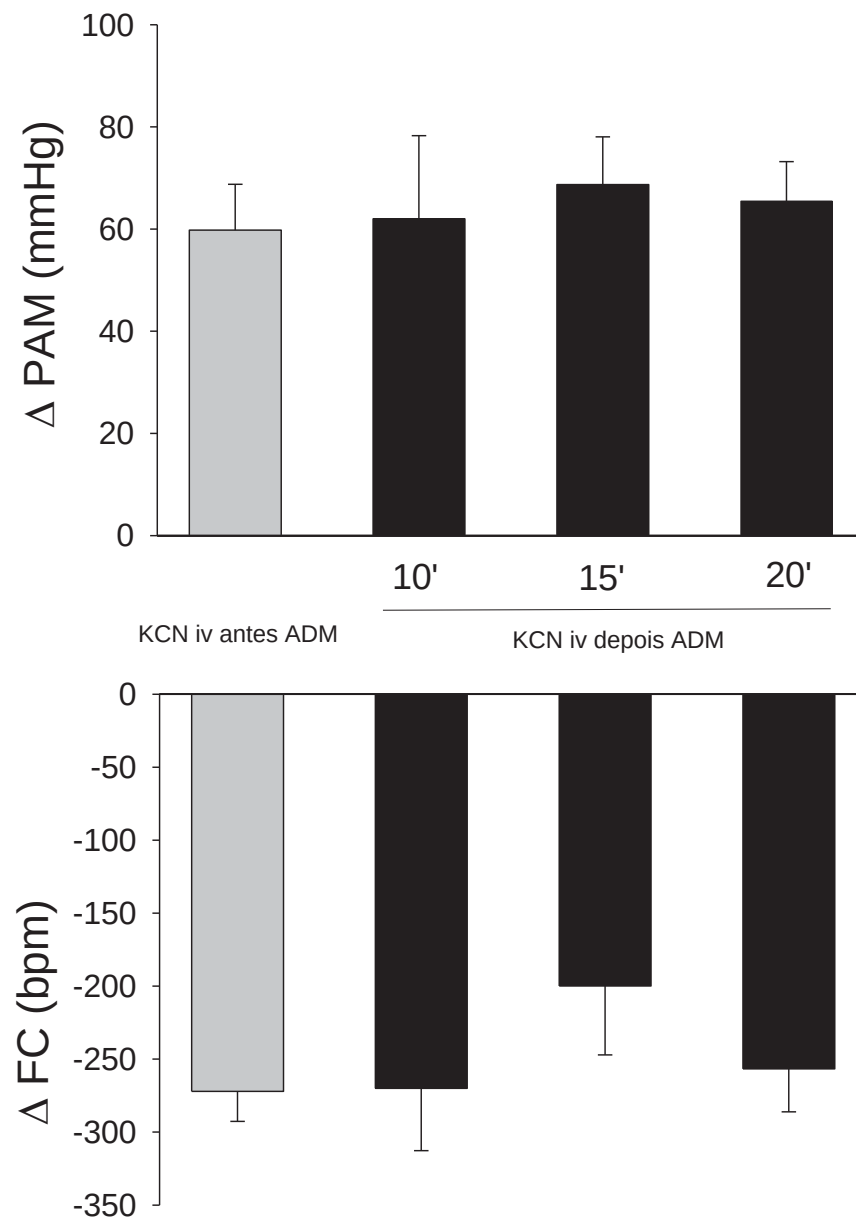


Figura XI: Mudanças na PAM e FC induzidas pela administração de KCN (40 μ g/0,1 mL) em ratos SHR não anestesiados, antes e após ADM 0,1 nmol também no RVL de ratos SHR. Os resultados foram expressos como média $\pm$ EPM. Anova de uma via, medidas repetidas. n = 4.

9. HISTOLOGIA

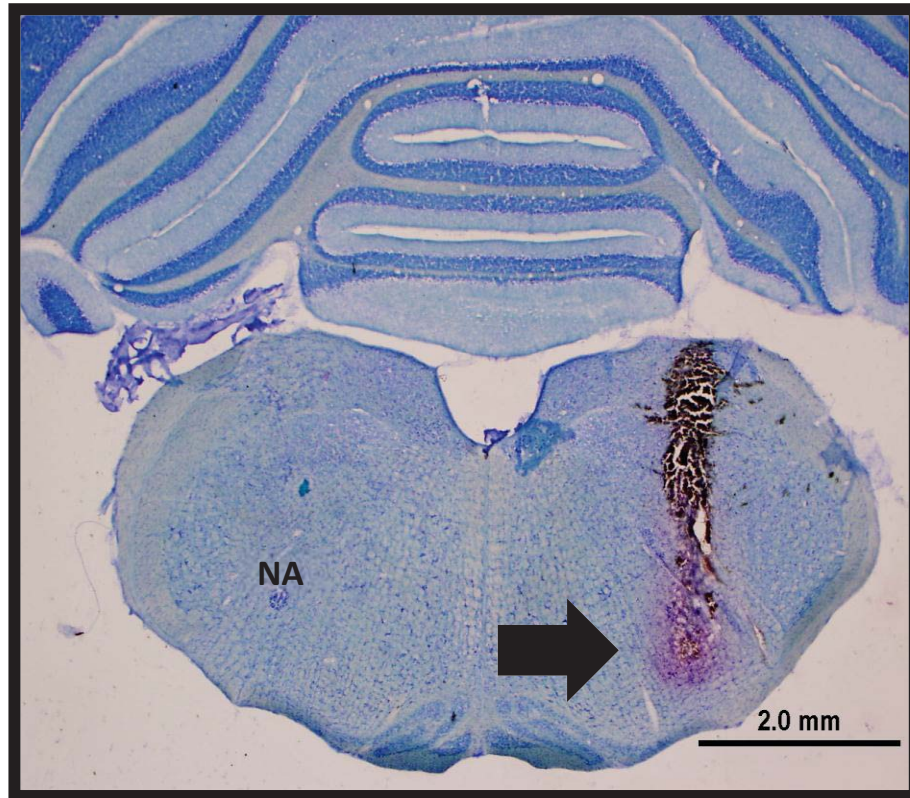


Figura XII: Fotomicrografia representativa do grupo mostrando o sítio de microinjeção unilateral no RVL (seta). NA = núcleo ambíguo.

10. DISCUSSÃO

Os resultados deste trabalho mostram que a ADM microinjetada no RVL de ratos normotensos e SHR não anestesiados provoca um aumento da PAM. Além disso, os resultados mostram que a ADM microinjetada no RVL de ratos normotensos e SHR não anestesiados não altera a resposta pressora do GLU, também microinjetado no RVL. A resposta pressora do quimiorreflexo não foi alterada pela ADM no RVL.

Dados anteriores da literatura já demonstraram que a administração de ADM icv ou no RVL, causa hipertensão (Saita *et al.*, 1998; Shan e Krukoff, 2001; Xu e Krukoff, 2004). Pelo menos para as injeções feitas icv, mostrou-se que a hipertensão é decorrente de um aumento da atividade simpática e liberação de vasopressina (Saita *et al.*, 1998; Shan e Krukoff, 2001; Taylor *et al.*, 2005). A ADM administrada icv promove aumento na expressão da proteína Fos (marcador de ativação neuronal) no PVN e no núcleo supra-óptico (Shan e Krukoff, 2001; Ueta *et al.*, 2001). A ADM microinjetada no RVL promove aumentos na pressão arterial em ratos normotensos anestesiados (Xu e Krukoff, 2004) e um aumento na frequência de disparos nestes neurônios quando aplicada no banho em experimentos de patch-clamp em cortes de RVL (Ming-Xin *et al.*, 2008). No presente estudo demonstramos que em ratos acordados a ADM microinjetada no RVL de ratos normotensos ou SHR produz aumento da pressão arterial. Entretanto, diferente da nossa hipótese, não houve uma maior resposta pressora a ADM em SHR comparados aos ratos normotensos.

Dados da literatura demonstraram que a ADM promove seus efeitos modulando a neurotransmissão glutamatérgica (Xu e Krukoff, 2004). Ademais, em SHR há evidências de que a transmissão glutamatérgica descendente do RVL aos neurônios pré-ganglionares simpáticos é maior quando comparada com os ratos WKY. Isto poderia ser decorrente de um

aumento da transmissão glutamatérgica nos neurônios do RVL em SHR (Ito *et al.*, 2000), que por sua vez poderia ser em parte devido ao aumento da atividade de neurônios do PVN (Yang *et al.*, 2001). Outro dado da literatura mostrou que a injeção prévia de angiotensina II no RVL, em doses que não alteravam a pressão arterial, era capaz de potencializar os efeitos pressores do GLU também microinjetado no RVL em ratos acordados e normotensos (Vieira *et al.*, 2010). Neste sentido supomos que a administração de ADM no RVL poderia potencializar os efeitos do GLU em ratos normotensos e principalmente em ratos hipertensos. Entretanto, na dose utilizada, não percebemos nenhuma alteração na resposta pressora do GLU. É possível que doses um pouco maiores de ADM pudessem ter um efeito estimulatório sobre a neurotransmissão glutamatérgica. Mais experimentos são necessários para podemos explicar a ausência de efeito. Por outro lado, é possível que em ratos acordados a ADM não interfira com a neurotransmissão glutamatérgica como ocorre em ratos anestesiados (Xu e Krukoff, 2004).

Finalmente, dados anteriores do nosso laboratório demonstraram que a resposta simpatoexcitatória do quimiorreflexo ativado com NaCN foi potencializada após a microinjeção bilateral de ADM em SHR submetidos a preparação *in situ* perfundida artificialmente (Colombari *et al.*, 2011). Observamos que em ratos normotensos e em SHR não houve alteração da resposta simpatoexcitatória (aumento da pressão arterial) do quimiorreflexo. Mais uma vez, é possível que a dose de ADM utilizada não tenha sido suficiente para causar uma sensibilização na área RVL e promover aumento da resposta simpatoexcitatória do quimiorreflexo.

11. CONCLUSÃO

Nossos resultados sugerem que em ratos normotensos e hipertensos acordados a ADM microinjetada no RVL também produz aumento da PAM, como observado em ratos anestesiados. Diferente da nossa hipótese, ADM não altera a resposta pressora do GLU, sugerindo que em ratos normotensos e hipertensos não anestesiados a interação entre ADM e GLU no RVL pode não ocorrer. Ainda não temos dados suficientes para concluir a ausência de efeitos da ADM sobre a resposta simpatoexcitatória do quimiorreflexo.

12. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alexander, R. S., 1946, TONIC AND REFLEX FUNCTIONS OF MEDULLARY SYMPATHETIC CARDIOVASCULAR CENTERS: *Journal of Neurophysiology*, v. 9, no. 3, p. 205-217.
2. Colombari, DSA, E Colombari, D Murphy, J F R Paton. Peripheral chemoreflex-induced long term facilitation fo sympathetic nerve activity: role of adrenomedullin in the rostral ventrolateral medulla. *The International Society for Autonomic Neuroscience (ISAN)* . 2011.
3. Colombari, DSA, S Milosavljevic, E Colombari, N Japundzic-Zigon, J F R Paton, D Murphy. Hypotensive action of adrenomedulla (ADM) receptor blockade in the rostral ventrolateral medulla of spontaneously hypertensive rats. *Experimental Biology Abstrac Book* . 2009.
4. Dampney, R. A. L., 1994, Functional organization of central pathways regulating the cardiovascular system: *Physiological Reviews*, v. 74, no. 2, p. 323-364.
5. Esler, M., M. Rumantir, D. Kaye, and G. Lambert, 2001, The sympathetic neurobiology of essential hypertension: disparate influences of obesity, stress, and noradrenaline transporter dysfunction?: *Am J Hypertens.*, v. 14, no. 6 Pt 2, p. 139S-146S.

6. Feldberg, W., and P. G. Guertzenstein, 1986, Blood pressure effects of leptazol applied to the ventral surface of the brain stem of cats: *J.Physiol.*, v. 372, p. 445-456.
7. Fernandez, A. P., J. Serrano, L. Tessarollo, F. Cuttitta, and A. Martinez, 2008, Lack of adrenomedullin in the mouse brain results in behavioral changes, anxiety, and lower survival under stress conditions: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, v. 105, no. 34, p. 12581-12586.
8. Guyenet, P. G., 2006, The sympathetic control of blood pressure: *Nat.Rev Neurosci*, v. 7, no. 5, p. 335-346.
9. Ito, S., K. Komatsu, K. Tsukamoto, and A. F. Sved, 2000, Excitatory amino acids in the rostral ventrolateral medulla support blood pressure in spontaneously hypertensive rats: *Hypertension*, v. 35, no. part2, p. 413-417.
10. Kitamura, K., K. Kangawa, M. Kawamoto, Y. Ichiki, S. Nakamura, H. Matsuo, and T. Eto, 1993, Adrenomedullin: a novel hypotensive peptide isolated from human pheochromocytoma: *Biochem.Biophys.Res Commun.*, v. 192, no. 2, p. 553-560.
11. Koganezawa, T., and N. Terui, 2007, Differential responsiveness of RVLM sympathetic premotor neurons to hypoxia in rabbits: *AJP - Heart and Circulatory Physiology*, v. 292, no. 1, p. H408-H414.
12. Mann, S. J., 2003, Neurogenic essential hypertension revisited: the case for increased clinical and research attention: *Am J Hypertens.*, v. 16, no. 10, p. 881-888.

13. Ming-Xin, F., L. Xia, W. Jin, C. Yin-Xiang, S. Lin-Lin, and Z. Da-Niam, 2008, Effect of adrenomedullin on the activity of barosensitive neurons in the rostral ventrolateral medulla of rats: *Acta Physiologica Sinica*, v. 58, no. 3, p. 193-200.
14. Morishita, R. et al., 1995, Effect of an antihypertensive drug on brain angiotensin II levels in renal and spontaneously hypertensive rats: *Clin.Exp Pharmacol.Physiol*, v. 22, no. 9, p. 665-669.
15. Paton, J. F., 1996, A working heart-brainstem preparation of the mouse: *J Neurosci Methods*, v. 65, no. 1, p. 63-68.
16. Paxinos, G., and C. Watson, 1986, *The rat brain in stereotaxic coordinates* San Diego, Academic Press, Inc.
17. Pettersson, A., J. Hedner, S.-E. Ricksten, A. C. Towle, and T. Hedner, 1986, Acute volume expansion as a physiological stimulus for the release of atrial natriuretic peptides in the rat: *Life Sci.*, v. 38, p. 1127-1133.
18. Saita, M., A. Shimokawa, T. Kunitake, K. Kato, T. Hanamori, K. Kitamura, T. Eto, and H. Kannan, 1998, Central actions of adrenomedullin on cardiovascular parameters and sympathetic outflow in conscious rats: *AJP - Legacy*, v. 274, no. 4 Pt 2, p. R979-R984.

19. Sakata, J., T. Shimokubo, K. Kitamura, M. Nishizono, Y. Iehiki, K. Kangawa, H. Matsuo, and T. Eto, 1994, Distribution and characterization of immunoreactive rat adrenomedullin in tissue and plasma: *FEBS lett.*, v. 352, no. 2, p. 105-108.

20. Serrano, J. et al., 2002, Adrenomedullin in the central nervous system: *Micros.Res.Tech.*, v. 57, p. 76-90.

21. Serrano, J., A. P. Fernandez, J. Sanchez, J. Rodrigo, and A. Martinez, 2008, Adrenomedullin expression is up-regulated by acute hypobaric hypoxia in the cerebral cortex of the adult rat: *Brain Pathol.*, v. 18, no. 3, p. 434-442.

22. Shan, J., and T. L. Krukoff, 2001, Intracerebroventricular adrenomedullin stimulates the hypothalamic-pituitary-adrenal axis, the sympathetic nervous system and production of hypothalamic nitric oxide: *J Neuroendocrinol*, v. 13, no. 11, p. 975-984.

23. Tagawa, T., and R. A. L. Dampney, 1999, AT₁ receptors mediate excitatory inputs to rostral ventrolateral medulla pressor neurons from hypothalamus: *Hypertension*, v. 34, p. 1301-1307.

24. Taylor, M. M., J. R. Baker, and W. K. Samson, 2005, Brain-derived adrenomedullin controls blood volume through the regulation of arginine vasopressin production and release: *AJP - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, v. 288, no. 5, p. R1203-R1210.

25. Trippodo, N. C., and E. D. Frohlich, 1981, Similarities of genetic (spontaneous) hypertension. Man and rat: *Circulation Research*, v. 48, no. 3, p. 309-319.
26. Ueta, Y. et al., 1999, Adrenomedullin-like immunoreactivity in the rat hypothalamo-neurohypophysial tract: *Peptides*, v. 20, no. 2, p. 199-204.
27. Ueta, Y., Y. Hara, K. Kitamura, K. Kangawa, T. Eto, Y. Hattori, and H. Yamashita, 2001, Actions sites of adrenomedullin in the rat brain: functional mapping by Fos expression: *Peptides*, v. 22, p. 1817-1824.
28. Vieira, A. A., E. Colombari, L. A. De Luca Jr, D. S. A. Colombari, P. M. De Paula, and J. V. Menani, 2010, Importance of angiotensinergic mechanisms for the pressor response to l-glutamate into the rostral ventrolateral medulla: *Brain Research*, v. 1322, p. 72-80.
29. Wang, G., P. Zhou, M. A. Repucci, E. V. Golanov, and D. J. Reis, 2001, Specific actions of cyanide on membrane potential and voltage-gated ion currents in rostral ventrolateral medulla neurons in rat brainstem slices: *Neurosci Lett.*, v. 309, no. 2, p. 125-129.
30. Xu, Y., and T. L. Krukoff, 2004, Adrenomedullin in the rostral ventrolateral medulla increases arterial pressure and heart rate: roles of glutamate and nitric oxide: *AJP - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, v. 287, no. 4, p. R729-R734.

31. Xu, Y., and T. L. Krukoff, 2006, Adrenomedullin in the rostral ventrolateral medulla inhibits baroreflex control of heart rate: a role for protein kinase A: *Br.J Pharmacol.*, v. 148, no. 1, p. 70-77.
32. Yang, Z., D. Bertram, and J. H. Coote, 2001, The role of glutamate and vasopressin in the excitation of RVL neurones by paraventricular neurones: *Brain Research*, v. 908, no. 1, p. 99-103.
33. Yang, Z., and J. H. Coote, 1998, Influence of the hypothalamic paraventricular nucleus on cardiovascular neurones in the rostral ventrolateral medulla of the rat: *J.Physiol.*, v. 513, no. 2, p. 521-530.