

# UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

# CARACTERIZAÇÃO DAS ALTERAÇÕES HEMODINÂMICAS OCASIONADAS PELO REFLEXO PRESSÓRICO AO EXERCÍCIO EM RATOS NORMOTENSOS E HIPERTENSOS: PARTICIPAÇÃO DO RVLM E POSSÍVEIS MECANISMOS PERIFÉRICOS

LAÍLA MILHOMEM SILVEIRA

GOIÂNIA-GO 2019







### TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Golás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

[x] Dissertação [] Tese 1. Identificação do material bibliográfico:

2. Identificação da Tese ou Dissertação:

Nome completo do autor: Laíla Milhomem Silveira

Título do trabalho: CARACTERIZAÇÃO DAS ALTERAÇÕES HEMODINÂMICAS OCASIONA-DAS PELO REFLEXO PRESSÓRICO AO EXERCÍCIO EM RATOS NORMOTENSOS E HIPER-TENSOS: PARTICIPAÇÃO DO RVLM E POSSÍVEIS MECANISMOS PERIFÉRICOS

Informações de acesso ao documento:

[ ] NÃO1 Concorda com a liberação total do documento [ x ] SIM

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arguivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.

Assinatura do(a) autor(a)2

Ciente e de acordo:

Data: 11/09/19

Assinatura do(a) orientador(a)<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo. Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capitulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

<sup>2</sup> A assinatura deve ser escaneada.

## LAÍLA MILHOMEM SILVEIRA

# CARACTERIZAÇÃO DAS ALTERAÇÕES HEMODINÂMICAS OCASIONADAS PELO REFLEXO PRESSÓRICO AO EXERCÍCIO EM RATOS NORMOTENSOS E HIPERTENSOS: PARTICIPAÇÃO DO RVLM E POSSÍVEIS MECANISMOS PERIFÉRICOS

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas do Instituto de Ciências Biológicas da associada Universidade Federal de Goiás, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Área de Concentração: Fisiologia

Orientador: Prof. Dr. Daniel Alves Rosa

GOIÂNIA-GO 2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Silveira, Laíla Milhomem CARACTERIZAÇÃO DAS ALTERAÇÕES HEMODINÂMICAS OCASIONADAS PELO REFLEXO PRESSÓRICO AO EXERCÍCIO EM RATOS NORMOTENSOS E HIPERTENSOS: PARTICIPAÇÃO DO RVLM E POSSÍVEIS MECANISMOS PERIFÉRICOS [manuscrito] / Laíla Milhomem Silveira 2019. ix, 66 f.
Orientador: Prof. Dr. Daniel Alves Rosa. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Goiânia, 2019. Bibliografia. Anexos. Inclui siglas, abreviaturas, gráfico, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.
<ol> <li>Reflexo pressórico ao exercício. 2. Exercício. 3. Sistema Nervoso Autonômico. 4. Sistema cardiovascular. I. Rosa, Daniel Alves, orient. II. Título.</li> </ol>
CDU 612



### SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

1

## ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE Nº 13

Aos vinte e oito dias do mês de junho do ano de dois mil e dezenove, às 2 catorze horas, no Anfiteatro do Instituto de Ciências Biológicas IV da 3 Universidade Federal de Goiás, reuniram-se os componentes da banca 4 examinadora: Prof. Dr. Daniel Alves Rosa, Prof. Dr. Marcos Luiz Ferreira Neto e 5 Profa. Dra. Elizabeth Pereira Mendes para, em sessão pública presidida pelo 6 primeiro examinador citado, procederem à avaliação da defesa de dissertação 7 ALTERAÇÕES HEMODINÂMICAS intitulada "CARACTERIZAÇÃO DAS 8 OCASIONADAS PELO REFLEXO PRESSÓRICO AO EXERCÍCIO EM RATOS 9 NORMOTENSOS E HIPERTENSOS: PARTICIPAÇÃO DO RVLM E POSSÍVEIS 10 MECANISMOS PERIFÉRICOS", em nível de mestrado, de autoria de Laíla 11 Milhomem Silveira, discente do Programa Multicêntrico de Pós-Graduação 12 em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de Goiás. A sessão foi aberta 13 pelo presidente, que fez a apresentação formal dos membros da banca. A 14 palavra, a seguir, foi concedida à autora da dissertação que, em cerca 15 de 32 minutos, procedeu à apresentação de seu trabalho. Terminada a 16 apresentação, cada membro da banca arguiu a examinada, tendo-se adotado o 17 sistema de diálogo sequencial. Terminada a fase de arguição, procedeu-se à 18 avaliação da dissertação. Tendo-se em vista o que consta na Resolução nº1558 19 de 2017 do Conselho de Ensino, Pesquisa, Extensão e Cultura (CEPEC), que 20 regulamenta o Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências 21 Fisiológicas, a dissertação foi APAOVADA, considerando-se integralmente 22 cumprido este requisito para fins de obtenção do título de Mestre em Ciências 23 Fisiológicas pela Universidade Federal de Goiás. A conclusão do curso dar-se-á 24 quando da entrega da versão definitiva da dissertação na secretaria do 25 programa, com as devidas correções sugeridas pela banca examinadora, no 26



### SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

prazo de trinta dias a contar da data da defesa. Cumpridas as formalidades de
pauta, às <u>1</u> horas e <u>00</u> minutos, encerrou-se a sessão de defesa e,
para constar, eu, Renato César Rodrigues, Assistente em Administração da
Universidade Federal de Goiás, lavrei a presente ata que, após lida e aprovada,
será assinada por seus membros em três vias de igual teor.

36

37

42

47

48

Prof. Dr. Daniel Alvés Rosa Presidente da Banca Universidade Federal de Goiás

Prof. Dr. Marcos Luiz Ferreira Neto Universidade Federal de Uberlândia

Profa. Bra. Elizabeth Pereira Mendes Universidade Federal de Goiás LAÍLA MILHOMEM SILVEIRA

# CARACTERIZAÇÃO DAS ALTERAÇÕES HEMODINÂMICAS OCASIONADAS PELO REFLEXO PRESSÓRICO AO EXERCÍCIO EM RATOS NORMOTENSOS E HIPERTENSOS: PARTICIPAÇÃO DO RVLM E POSSÍVEIS MECANISMOS PERIFÉRICOS

**BANCA EXAMINADORA** 

Prof. Dr. Daniel Alves Rosa Universidade Federal de Goiás.

Prof. Dra. Elizabeth Pereira Mendes Universidade Federal de Goiás.

Prof. Dr. Marcos Luiz Ferreira-Neto Universidade Federal de Uberlândia

Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_

# DEDICATÓRIA

Dedico a Deus, aos meus pais, ao meu esposo e aos meus colegas de graduação.

#### AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus e ao meu anjo da guarda. Sem a proteção divina, eu não haveria conseguido passar por tudo que passei até chegar aqui.

Agradeço aos meus pais, meu irmão e minhas tias e prima. No fundo, eles nunca entenderam o que eu fazia ou por quê fazia, mas nunca deixaram de me apoiar, ou oferecer um ombro, um leito, um afago quando eu estava cansada ou desesperada.

Agradeço ao meu esposo Hudson por toda a compreensão, paciência, amor e cumplicidade. Não tenho palavras para expressar a minha gratidão.

Agradeço às minhas colegas/amigas Thaís e Melissa, por encontrar em momentos desesperados uma luz no fim do túnel, um riso que encobria o choro, de mãos dadas nesse mesmo barco nós finalmente estamos conseguindo atingir o nosso propósito. Vocês são o melhor presente que a pós me meu.

Agradeço aos colegas de laboratório que me ajudaram nesse caminhada, me ensinando ou auxiliando, contribuindo para o que eu sei hoje no laboratório: Aline, Lara, Stéfanne, Nathalia, Marina, Paulo, Aryanne, Izabella.

Agradeço à professora Aline Pansani pelo eletroestimulador utilizado no protocolo. Sem ele, não teria sido possível concluir a pesquisa.

Agradeço ao meu orientador prof<sup>o</sup>. Dr. Daniel Alves Rosa, e a todos os professores e integrantes do CPNFC.

# "O sucesso é uma maratona, não uma prova de velocidade"

"Conheça todas as teorias, domine todas as técnicas, mas ao tocar uma alma humana seja apenas outra alma humana." (Carl Gustav Jung)

Lista de Abreviaturas e SiglasI
Lista de FigurasIII
Lista de TabelasV
ResumoVI
AbstractVIII
1. INTRODUÇÃO1
2- OBJETIVOS9
2.1 Objetivo geral9
2.2 Objetivos específicos9
3 METODOLOGIA1
3.1 Procedimentos Cirúrgicos Preparatórios10
3.2 Procedimentos Preparatórios para a realização das Nanoinjeções10
3.3 Procedimentos Preparatórios para a Mensuração de FSA e FSR11
3.4 Procedimentos Preparatórios para a Estimulação do Nervo Tibial11
3.5 Procedimento Experimental e Registros12
3.6 Tratamento com Nebivolol14
3.7 Histologia14
3.8 Análises Estatísticas15
4 RESULTADOS16
4.1- Alterações hemodinâmicas dos ratos WISTAR16
4.2 Transecção de nervo Tibial para verificação de aferências musculares26
4.2 Alterações hemodinâmicas em SHR30
4.3 Transsecção de nervo para verificação de aferências
4.4 Padrão de respostas hemodinâmicas de Animais WISTAR, SHR e SHR
tratados com Cloridrato de Nebivolol por 15 dias42
5 DISCUSSÃO
5.1 Ratos normotensos- WISTARs51
5.2- Ratos hipertensos-SHRs54
5.3 Tratamento de Ratos hipertensos-SHRs com o Cloridrato de Nebivolol56
6 CONCLUSÃO
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

# SUMÁRIO

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ANPS- Atividade nervosa parassimpática
- ANS Atividade nervosa simpática
- ANSR Atividade nervosa simpática renal
- ATP Adenosina trifosfato
- CC Comando Central
- CME- Contração muscular estática
- CIL Coluna intermédio lateral
- CVA- Condutância Vascular aórtica
- CVLM- Região Caudoventrolateral do Bulbo
- CVR- Condutância Vascular Renal
- DC Débito cardíaco
- EENT- Estimulação elétrica do nervo tibial
- EPM Erro padrão da média
- FC Frequência cardíaca
- FS Fluxo sanguíneo
- FSA- Fluxo sanguíneo aórtico
- FSR- Fluxo sanguíneo renal
- KYN Ácido Quinurênico
- NBL- Nebivolol
- NT Nervo Tibial
- NTS- Núcleo do trato solitário
- NO Nitricoxid
- PA Pressão arterial

- PAM Pressão arterial média
- PAP Pressão arterial pulsátil
- PE Polietileno
- PÓS-KYN-Pós Quinurênico
- PVN Núcleo Paraventricular do Hipotálamo
- RPE Reflexo pressórico ao exercício
- RVLM Região Rostroventrolateral do Bulbo
- SNC Sistema nervoso central
- SNP- Sistema nervoso parassimpático
- SNS Sistema nervoso simpático
- TS Tríceps Sural

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Componentes promotores dos reajustes cardiovasculares durante o
exercício físico4
Figura 2: Marcação de Azul de Evans 2% num corte coronal bulbar de 40µm de
espessura15
Figura 3: Traçado típico representativo de animal WISTAR do registro das variáveis
em condições basais, durante a EENT e após a estimulação17
Figura 4: Média±EPM das variações19
Figura 5: Média ± EPM das variações de PAM em ratos WISTAR21
Figura 6: Média±EPM das variações de FC em ratos WISTAR.A)22
Figura 7: Média±EPM das variações de FSA em ratos WISTAR24
Figura 8: Média ± EPM das variações de A) CVA em ratos WISTAR25
Figura 9: Média ± EPM das variações de FSR em ratos WISTAR27
Figura 10: Média ± EPM das variações de CVR em ratos WISTAR
Figura 11: Traçado típico representativo de animal WISTAR do registro das variáveis
em condições basais, durante a EENT, e após a transecção do nervo tibial29
Figura 12: Traçado típico representativo de animal SHR do registro das variáveis em
condições basais, durante a EENT, e após a estimulação
Figura 13: Média±EPM das A) variações de TM em ratos SHR ao longo dos 30" de
CME devido à EENT (ΔTensão), B) máximo de TM desenvolvida (Tensão) e C) Área
sob a curva da TM desenvolvida ao longo dos 30" (f $\Delta$ Tensão)32
Figura 14: Média ± EPM das variações de PAM em ratos SHR. A)
Figura 15: Média ± EPM das variações de FC em ratos SHR. A)
Figura 16: Média±EPM das variações de FSA em ratos SHR. A)
Figura 17: Média ± EPM das variações de CVA em ratos SHR.A)
Figura 18: Média ± EPM das variações de FSR em ratos SHR. A)40
Figura 19: Média±EPM das variações de CVR em ratos SHR. A)41
Figura 20: Traçado típico representativo de animal SHR do registro das variáveis em
condições basais, durante a EENT, e após a transecção do nervo tibial42
Figura 21: Traçado típico representativo de animal WISTAR no registro das variáveis
em condições basais, durante a EENT44

Figura 22: Traçado típico representativo de animal SHR no registro das variáveis em
condições basais, durante a EENT45
Figura 23: Traçado típico representativo de animal SHR NBL no registro das
variáveis em condições basais, durante a EENT46
Figura 24 Média±EPM das variações de Tensão desenvolvida nos grupos47
Figura 25: Média±EPM das variações de PAM e FC desenvolvida nos grupos48
Figura 26: Média ± EPM das variações de FSA e CVA desenvolvidas nos grupos49
Figura 27: Média ± EPM das variações de FSR e CVR desenvolvidas nos grupos50

# LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Resumo das fórmulas utilizadas para obtenção dos valores de CVR, CVA,
$\Delta$ % FSR, $\Delta$ % FSA, $\Delta$ % CVR E $\Delta$ % CVA13
Tabela 2: Valores basais dos animais WISTAR antes do início das EENT, antes e
após o bloqueio do RVLM contralateral. Esses valores estão representados em
média ± EPM do grupo, sendo o N do grupo descrito acima em cada variável16
Tabela 3: Valores basais dos animais SHR antes do início das EENT, antes e após o
bloqueio do RVLM contralateral. Esses valores estão representados em média±EPM
do grupo, n=6
Tabela 4: Valores basais dos animais WISTAR, SHR CONTROLE E SHR NBL antes
do início da EENT. Esses valores estão representados em média ± EPM do grupo.43

#### RESUMO

A contração muscular estática promove aumento da pressão arterial (PA) e da frequência cardíaca (FC) por meio de um reflexo neural periférico de origem muscular, o "reflexo pressórico ao exercício" (RPE). Está bem estabelecido pela literatura que os ajustes cardiovasculares em respostas ao exercício físico estão alterados em indivíduos hipertensos, sendo que parte dessas alterações são atribuídas aos mecanismos centrais - associados a desajustes no componente autonômico simpático - bem como a mecanismos periféricos, caracterizados por disfunções endoteliais vasculares. A região rostroventrolateral do bulbo (RVLM) é o braço eferente principal dos neurônios vasomotores para manutenção tônica e reflexa da PA. Evidências experimentais indicam a participação do RVLM nas respostas de aumento de PA e FC induzidas pelo RPE. No entanto, pouco se conhece sobre a sua participação neste reflexo, no que se refereaosajustes hemodinâmicos, tais como alteração no fluxo sanguíneo (FS) e condutância vascular aórtica (CVA) e renal (CVR), de animais normotensos e hipertensos. Objetivo: Investigar a participação central do RVLM e de mecanismos vasodilatadores periféricos nas alterações hemodinâmicas oriundas do RPE a partir da contração muscular estática do tríceps suralpela estimulaçãoelétrica do nervo tibial (EENT) em ratos WISTAR e espontaneamente hipertensos (SHR). Metodologia: Ratos Wistar (n=10) e SHR (n=6) (250-350g) foram anestesiados e instrumentalizados para registro de PA, FC, FSA, FSR, CVA e CVR. O tendão do tríceps sural esquerdo foi anexado a um transdutor de força para medir a tensão muscular desenvolvida. O nervo tibial foi estimulado por corrente elétrica(EENT)por 30"(s) com frequência de 40Hz, 0,1 ms de duração de pulso e5x o limiar motor. O EENT foi realizado antes e após nanoinjeções do ácido quinurênico (KYN, 50 nL) no RVLM contralateral ao nervo tibial estimulado. A região da injeção foi marcada, e seu bulbo removido para a análise histológica. Em protocolo posterior, ratos SHR (SHR tratados, n=7) foram tratados com Cloridrato de Nebivolol(NBL,10mg/kg) ou água destilada (SHR controle, n=5) durante 15 dias, por meio de gavagem. Em seguida eles foram submetidos aos mesmos procedimentos experimentais do protocolo inicial, com exceção da nanoinjeçãocentral. Os dados foram expressos em média +/-EPM e os testest de Student e One-way ANOVA foram utilizados. P  $\leq$  0,05. Resultados: em WISTARs e SHRs a EENT provocou RPE com aumento de PA e FC, que foram

reduzidas após a nanoinjeção de KYN no RVML. Nos WISTARs, o RPE provocou aumento de FSA e CVA, mas após a injeção de KYN no RVML contralateral, percebemos uma redução dessa resposta.Em SHR, diferentemente, não houve alterações de FSA e CVA induzidas por EENT, antes e após o bloqueio glutamatérgico no RVLM. Nos animais WISTAR, o RPE produziu redução no FSR e na durante a EENT. Após o bloqueio glutamatérgico no RVLM, as respostas de FSR e CVRnão foram alteradas. O RPE, nos SHR, não desencadeou redução de FSR ou CVR, e observamos que KYN no RVLM não foi capaz de modificar essas respostas.O tratamento de 15 dias com NBL não alterou o padrão de resposta de CVA e CVR dos SHR. Conclusão: As respostas de PA e FC induzidas pela EENT foram reduzidas com o bloqueio glutamatérgico no RVLM, em WISTARs e SHRs. Em WISTARs a EENT foi associada com vasodilatação aórtica e vasoconstrição renal. Essa resposta se difere em SHRs, onde não observamos alterações no FSA e na CVA (CONTROLE ou PÓS-KYN). Assim, demonstramos que no RPE, as respostas de FSA, FSR, CVA e CVR dos ratos normotensos e espontaneamente hipertensos são distintas, e que o RVLM contralateral à musculatura ativa desses animais, participa nas respostas de vasodilatação aórtica e vasoconstrição renal em ratos normotensos, mas não influencia significativamente nas variações de FS nos SHR. Além disso, o tratamento de 15 dias com o doador de óxido nítrico (NO) e Beta bloqueador seletivo NBL também não foi capaz de alterar as respostas hemodinâmicas nos SHR.

**Palavras-Chave:** Reflexo pressórico ao exercício, exercício, sistema nervoso autonômico, sistema cardiovascular.

#### ABSTRACT

Static muscle contraction promotes an increase in blood pressure (BP) and heart rate (HR) by means of a peripheral neural reflex of muscular origin, the " exercise reflex pressure" (EPR). It is well established in the literature that cardiovascular adjustments in responses to physical exercise are altered in hypertensive individuals, and some of these alterations are attributed to the central mechanisms - associated with mismatches in the autonomic sympathetic component - as well as the peripheral mechanisms characterized by vascular endothelial dysfunction. The rostralventrolateral region of the medulla (RVLM) is the main efferent arm of vasomotor neurons for tonic maintenance and BP reflex. Experimental evidence indicates the participation of RVLM in HR and BP increase induced by EPR. However, little is known about its participation in this reflex, regarding hemodynamic adjustments, such as alteration in blood flow (BF) and aortic (AVC) and renal vascular conductance (RVC), of normotensive and hypertensive animals. Objective: investigate the central role of RVLM and peripheral vasodilator mechanisms in hemodynamic changes resulting from EPRevocated by the static muscle contraction of the sural triceps by tibial nerve electrical stimulation (TNES) in WISTAR and spontaneously hypertensive rats(SHR). Methodology: Wistars (n = 10) and SHR (n =6) (250-350g) were anesthetized and instrumented to record BP, HR, ABF, RBF, AVC and RVC. The left sural triceps tendon was attached to a force transducer to measure the developed muscle tension. The tibial nerve was stimulated by electrical current for 30 s at a frequency of 40Hz, 0.1 ms pulse duration and 5x motor threshold. The TNES was performed before and after quinurenic acid nanoinjections (KYN, 50 nL) in the contralateral RVLM to the stimulated nerv. The injection site was targed, and its medulla was removed for histological analysis. In a later protocol, SHRs (treated SHR, n = 7) were treated with Nebivolol Hydrochloride (NBL, 10mg / kg) or distilled water (control SHR, n = 5) for 15 days by gavage. They were then submitted to the same experimental procedures as the initial protocol, except for the central nanoinjection. Data were expressed as mean +/- SEM and Student's t-test and One-way ANOVA tests were used.  $P \le 0.05$ .RESULTS: In WISTARs and SHRs, EPR evocated byTNES increased BP and HR, which were reduced after KYNnanoinjection in RVML. In WISTARs, EPR caused increase in ABF and AVC,

butafter the injection in the contralateral RVLM, we noticed a reduction in this response. In SHR, there were no changes of ABF or AVC during contractions, before and after glutamatergic blockade. In WISTAR animals, EPR produced RBF and RVC reduction during TNES. After the glutamatergic blockade in RVLM, however, the RBF and RVC responses were not altered. The EPR in SHR did not trigger RBF and RVC reduction, as well KYN in RVLM. The 15-day NBL treatment did not alter the SHRs AVC and RVC changes. CONCLUSION: BP and HR responses induced by TNES were reduced with glutamatergic blockade in RVLM in WISTARs and SHRs. In WISTARs, TNES was associated with aortic vasodilation and renal vasoconstriction. This response differs in SHRs, where we did not observe ABF and AVC changes (CONTROL or POST-KYN). Thus, we demonstrate that in the EPR, ABF, RBF, AVC, and RVC responses of normotensive and spontaneously hypertensive rats are distinct, and contralateral RVLM to the active musculature of these animals, participates in the responses of aortic vasodilation and renal vasoconstriction in normotensive rats, but does not significantly influence BF variations in SHR. In addition, the 15-day treatment with the nitric oxide (NO) donor and NBL selective beta blocker was also not able to alter the hemodynamic responses in SHRs.

Key words: exercisepressurereflex, exercise, autonomicnervous system, cardiovascular system

## 1. INTRODUÇÃO

O sistema cardiovascular é o sistema responsável por nutrir os demais tecidos do organismo através da corrente sanguínea, fornecendo oxigênio e substâncias essenciais ao metabolismo. O tecido sanguíneo é um fluido composto por inúmeras substâncias, como água, sais, nutrientes, gases, células, etc., e como tal, obedece a leis físicas comportamentais, que envolvem vários fatores capazes de alterar a dinâmica desse fluido (KoeppenandStanton, 2008; Joyce et.al.,2019). Sua viscosidade, gradiente de pressão, comprimento do vaso, dentre outros fatores são importantes determinantes do fluxo sanguíneo (FS) e sua respectiva condutância vascular (CV), ou seja, "a facilidade com que o sangue flui para a circulação (ou leito vascular) a uma dada diferença de pressão" (Joyceet.al., 2019)

A partir do coração como bomba e o circuito de vasos e capilares como componentes (Michelini, 2008.)o sistema cardiovascular, em conjunto com o Sistema Nervoso (SN), está sempre operando de forma a manter a pressão arterial (PA) e freqüência cardíaca (FC) a níveis constantes, garantindo que haja sempre um aporte de fluxo sanguíneo adequado a cada tecido e sistema corporal e mantendo, assim, a homeostase do organismo (Bauer et.al, 1989. Wanget.al, 2013.).

Durante nossas atividades diárias, o corpo humano está sujeito a diversas variações de posição ortostática, movimentações e atividades físicas que geram alterações constantes e instantâneas de PA, podendo alterar e prejudicar o aporte sanguíneo de determinados tecidos. Porém, a regulação do sistema cardiovascular advinda do sistema nervoso central (SNC) controla esse tipo de alteração, evitando possíveis danos ao organismo.

Receptores sensoriais especializados (barorreceptores), presentes em diversas partes do organismo, como paredes dos grandes vasos (artérias aorta e carótidas), nas musculaturas lisa e cardíaca (Bauer et.al, 1989, Wang et.al, 2013.), etc, são capazes de detectar as variações de PA que nosso organismo está sujeito durante o dia-a-dia. Detectando essas variações, os receptores são responsáveis por sinalizar os neurônios, e esses por sua vez, de enviar sinais em forma de potencial de ação para o sistema nervoso central (SNC), especificamente os núcleos vasomotores do bulbo, mantendo-os sempre informados sobre as alterações hemodinâmicas que possam estar ocorrendo.

Sinais com alta frequência de disparo advindos desses receptores presentes nas paredes de grandes artérias indicam que a PA foi elevada; uma vez no bulbo encefálico, essas sinapses excitatórias que sinalizam um aumento de PA chegam no Núcleo do Trato Solitário (NTS), primeiro núcleo integrativo dessas aferências, e são transmitidas para outros núcleos participantes, como a região Caudal Ventrolateral do Bulbo (CVLM). Essa região participa da modulação do sistema cardiovascular por meio de sua função de limitar a atividadeda região seguinte, a região rostroventrolateral do bulbo (RVLM), região bem descrita na literatura como principal núcleo central responsável pela regulação do sistema cardiovascular a partir dagênese e manutenção de atividade nervosa simpática (ANS) e tono vasomotor(Chida et.al., 1990, Chan et.al., 1991.Dickersonet.al., 1997. Chida, et.al.,1998. CRAVO et.al., 2003. Cravo et.al., 2006. Guyenet, 2006. Dombrowskiet.al., 2017). Essa região proporciona um estímulo constante aos neurônios pré- ganglionares simpáticos, o que resulta num fluxo de estímulo simpático que supre as demandas hemodinâmicas constantemente (Chan et.al., 1991).

Koichi Chida e colaboradores (1998) estimularam com glutamato o RVLM de ratos normotensos e hipertensos e verificaram que em ambos houve aumento da atividade nervosa simpática renal (ANSR), observando pelo menor fluxo sanguíneo nas artérias renais, o que significa que houve um aumento da vasoconstrição local.

Uma vez limitada, o RVLMdiminui o tono simpático para coração e vasos, propiciando uma diminuição da resistência periférica e contratilidade cardíaca; o que resulta numa diminuição de PA (Barman et.al, 1989. Cravo et.al., 2006. Michelini, 2008.). Concomitantemente, existe, a partir do NTS, a transmissão de sinais para uma importante região na manutenção da atividade nervosa parassimpática(ANPS), o Núcleo Ambíguos, que aumentando as sinapses colinérgicas (Acetilcolina) para a musculatura cardíaca, reduz a freqüência de disparos do nodo sinusal, reduzindo assim a freqüência cardíaca (FC) (Michelini, 2008).

Da mesma forma, quando há uma queda na PA, há a diminuição da frequência de disparos que chegam ao NTS, o que ocasiona uma diminuição da inibição do CVLM sobre o RVLM, propiciando assim um aumento do tono simpático para vasos e coração, aumentando resistência vascular periférica e contratilidade cardíaca, restaurando assim os níveis pressóricos reduzidos.

Durante uma situação de exercício físico, entretanto, a dinâmica de valores pressóricos e demandas metabólicas teciduais é alterada, sendo uma condição que modifica a conformação homeostática do organismo. Durante ele, a regulação do sistema cardiovascular é alterada pelo rápido aumento da necessidade de aporte sanguíneo nos tecidos musculares ativos.Os ajustes no sistema cardiovascular em respostas ao exercício físico ocorrem pela ação concomitante de alguns mecanismos fisiológicos, e a sua principal função é garantir um maior fluxo sanguíneo aos tecidos musculares ativos. Essas manobras fisiológicas são reunidas pela literatura em três principais fatores: (Fig.1):1) o fator oriundo do SNC, denominado Comando Central (CC), 2)aos fatores locais que compõem o chamado Reflexo Pressórico ao Exercício (RPE) e 3) a dessensibilizaçãobarorreflexa ("reseting do barorreceptor") (Wilson et.al., 1997. Koba et.al, 2007. Cui et.al., 2011. Wang et.al., 2014. Fadel, 2015.Spranger et.al., 2015.). Michelini et.al, 2015. Mizuno et.al., 2016. Liang et.al., 2016. . Downey et.al., 2017)

O CC é composto por sinais enviados simultaneamente ("feedfoward") aos centros autonômicos cardiovasculares, como o RVLM e o Núcleo Paraventricular do hipotálamo (PVN) (Michelini et.al., 2015) pelos centros geradores de movimento, presentes a partir do córtex motor e áreas motoras subcorticais(como a formação reticular), desde o início do comportamento motor. (Wilson et.al., 1997. Wanget.al, 2013. Fadel, 2015). Assim, a ativação concomitante dos centros vasomotores juntamente à dos centros superiores de geração de movimento promove ajustes cardiorrespiratórios e hemodinâmicos que preparam o organismo para a atividade física que se inicia. (Lianget.al., 2016)<sup>.</sup>



Figura 1: Componentes promotores dos reajustes cardiovasculares durante o exercício físico. A: Comando central, a partir dos núcleos centrais geradores do movimento. B: informações oriundas do Barorreflexo, a partir dos receptores presentes no seio carotídeo e aórtico. C: receptoresmuscularesresponsáveispelo RPE. Figuraadaptada. (Heart and Circulatory Physiology-American Journal of Physiology)

Já o RPE é caracterizados por um aumento da pressão arterial e taquicardia, associado pela ativação de receptores localizados no próprio músculo ativo (Fadel, 2015. Koba et.al, 2007. Michelini et.al.,2015.). Esses receptores podem detectar tanto estiramento da fibra muscular, durante o exercício físico (mecanorreceptores), quanto responderem quimicamente ao acúmulo de metabólitos oriundo do metabolismo local (metaborreceptores) (Brum et.al., 2000. Cui et.al., 2006. Gallagher et.al., 2006. Koba et.al, 2007. Fadel, 2015.).

Os mecanorreceptores são terminações de fibras constituídas por neurônios aferentes do grupo III (tipo A $\delta$ ), que são mielinizadas e respondem a mudanças de pressão ou estiramento. (Wang et.al, 2013. Fadel, 2015). Já os metaborreceptores constituem fibras desmielinizadas do tipo IV (tipo C), metabolicamente sensíveis, que respondem à liberação de metabólitos como Dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), ácido láctico, potássio, adenosina trifosfato (ATP), adenosina, ácido araquidônico, fosfato diprotonado, prostaglandinas e íons hidrogênio (Cuiet al., 2011. Wang et al., 2013. Fadel, 2015)<sup>-</sup> Esses moduladores metabólicos proporcionam uma vasodilatação local, que tem como consequência um aumento do fluxo sanguíneo para a região ativa. Essa vasodilatação local é obtida parte pela liberação de substâncias vasodilatadoras, como CO<sub>2</sub> e óxido nítrico (NO), quanto pela atenuação da ANS nos vasos dos músculos ativos, denominada "simpatólise funcional" (Fadel, 2015.)<sup>-</sup>

Apesar da ANS se manter relativamente elevada durante o exercício físico, a vasoconstrição é atenuada nos músculos ativos, devido a essa simpatólise funcional.A atuação dos metabólitos oriundos do esforço muscular é importante também para promover uma diminuição da reatividade vascular dos vasos sanguíneos da musculatura ativa à adrenalina circulante (menor ativação do receptor  $\alpha$ -adrenérgico- receptores que são ativados pela adrenalina e agonistas, liberada por terminações nervosas simpáticas), o que causa a diminuição do efeito vasoconstritor durante a ativação simpática do leito muscular durante o exercício (Mitchel, 2015)

Os receptores que compõem a via que resulta no chamado RPE fazem sua primeira sinapse no corno dorsal da medula espinal, e a partir daí levam suas informações aferentes ao tronco cerebral, nos núcleos vasomotores bulbares (Koba et.al, 2007. Fadel, 2015.), ascendendo primeiramente ao NTS. A partir dele, os sinais oriundos dos recptores musculares também são transmitidos aos demais núcleos responsáveis pela regulação cardiovascular, como CVLM e RVLM.

Durante a situação de exercício físico, há a necessidade de haver uma elevação da PA e FC concomitante à intensidade do exercício, não devendo ser os valores retomados aos homeostáticos por meio da atuação e controle dos barorreceptores arteriais, de forma a garantir alto suprimento sanguíneo aos tecidos musculares esqueléticos ativos. Existe então uma redefinição da sensibilidade do mecanismo de barorreflexo (Bauer et.al., 1989.Joyner, 2006.), diminuindo essa

sensibilidade conforme aumenta a intensidade do exercício. Para ser possível obterse a diminuição da sensibilidade barorreflexa durante o exercício físico, alguns estudos trazem como principal motivo a ativação conjunta de projeções neuronais no NTS, originadas dos baro, mecano e metaborreceptores, que inibe parcialmente a ativação de neurônios de segunda ordem no NTS(Michelini et.al, 2015. Potts, 2001), trazendo também o papel do NTS e suas sinapses inibitórias gabaérgicas (que utilizam o ácido Gama Aminobutírico- GABA) na inativação das áreas simpatoexcitatórias durante o exercício físico mais intenso (Potts, 2001).

Mesmo sendo essencial para manter os valores pressóricos a níveis homeostáticos e satisfatórios, a ANS, entretanto, quando em excesso, é um dos principais fatores para o desenvolvimento da hipertensão arterial (Chan et.al., 1991. Dombrowski et.al., 2017.). Chan e colaboradores (1991) mensuraram os disparos de atividade simpática dentro do RVLM em ratos anestesiados, normotensos e espontaneamente hipertensos. Eles verificaram uma alta taxa de disparo espontâneo de descarga única em ratos hipertensos, o que desencadearia um aumento de ANS nesses animais.

Além do fato dos indivídios hipertensos muitas vezes terem como origem uma hiperatividade simpática em repouso, durante o exercício físico agudo eles estão submetidos a uma resposta exacerbada de aumento de pressão arterial (Potts, 2001. Leal et.al., 2013. Mizuno et.al., 2015. Smith et.al., 2015.Mizuno et.al., 2016. Liang et.al., 2016. Dombrowski et.al., 2017.Downeyet.al., 2017.). Liang e colaboradores (2016) estimularam eletricamente a região locomotora mesencefálica de ratos (1,7 a 2,0 mm lateral, 0,3 a 0,8 mm anterior e 3,5 a 4,5 mm de profundidade da junção superficial do colículo superior e inferior), observando que em resposta a isso, ratos espontaneamente hipertensos tinham respostas muito maiores de PA e ANS do que nos ratos normotensos.

Muitos autores atribuem a maior responsabilidade dessahiperreatividade a uma disfunção no sistema barorreflexo, indicando que os barorreceptores estão menos sensíveis às mudanças pressóricas nos indivíduos hipertensos(Joyner, 2006. Mizuno et.al., 2015). Alguns autores trazem como principal motivo dessa dessensibilização do sistema de barorreflexo (Laterza et.al., 2008.), a deficiência de conduzir informações ao NTS; porém, outros mecanismos participantes são citados, como por exemplo a hiperreação do mecanorreflexo muscular(Mizuno et.al., 2008.) Leal et.al., 2013.) ou mesmo uma redução na síntese de NO dentro do NTS, o que leva a um aumento no fluxo simpático no exercício e também no repouso(Smith et.al., 2015).

Disfunções em mecanismos periféricos do sistema cardiovascular também são alvo de discussão em carregarem boa parte da culpa na desregulação nos ajustes hemodinâmicos, em indivíduos hipertensos. Autores trazem a disfunção vascular endotelial na síntese de agentes vasodilatadores, como NO (Wang et.al., 2010; Wang, Zhang, Liu,2010. Smith et.al., 2015)<sup>,</sup> como um fator dificultador da retomada dos valores de PA aos valores basais, pela pressão das paredes do vaso, durante e após o exercício físico.

O NO é uma molécula que pode ser agente em diversos processos fisiológicos do organismo. Sua forma endotelial, eNO, atual principalmente na função de vasorrelaxamento, através da atuação do cálcio, e também em funções vasoprotetivas (como regulação de processos pró-inflamatórios, etc) (Viteceket.al., 2012). A hipertensão arterial acarreta estresse de cisalhamento na parece dos vasos, além da presença de citocinas, hormônios (como a Angiotensina), dentre outros, que propiciam o acarretamento das disfunções endoteliais (Parfenov et.al., 2019). Essas disfunções resultam num déficit de produção da forma ativa de NO, o que resulta na dificuldade da atuação no controle do tono vascular, e consequentemente a vasodilatação (Viteceket.al., 2012).

Para mimetizar os efeitos do exercício físico agudo e suas implicações de aumento de ANS e RPE, muitos autores realizaram procedimentos experimentais promovendo a contração muscular de membros posteriores de animais, o estiramento do tendão, ou mesmo ativação central dos núcleos que compõe o circuito de CC no exercício.Koba e colaboradores(2007) ativaram o reflexo muscular em ratos realizando tanto contração muscular por estimulação elétrica, quanto estiramento do tendão, e perceberam que há aumento de PAM e FC, além de um maior aumento da ANS renal (ANSR). Smith e colaboradores (2001) estimularam eletricamente raiz ventral de ratos anestesiados ou descerebrados e também o nervo tibial, induzindo a contração muscular estática; bem como, promoveram alongamento passivo, e encontraram o aumento da PA e FC, como resposta ao RPE. Essa resposta foi confirmada pela infusão de um bloqueador neuromuscular

ou transecção das raízes nervosas ventrais, seguido da réplica do procedimento, já que não trouxe o aumento dos parâmetros cardiovasculares citados.

Nessa mesma linha de estudo, encontramos diversos autores que compararam o efeito do RPE, se utilizando de metodologias parecidas (estimulação elétrica do nervo, raiz nervosa ou músculo), entre ratos normotensos e hipertensos, se respaldando em estudos anteriores que mostram uma hiperreatividade em situação indivíduos hipertensos quando em de exercício físico.Leal е colaboradores(2008), a partir do estiramento passivo de membros inferiores, constataram que a ativação seletiva das fibras tipo III (mecanorreflexo) provocou o aumento exacerbado de PAM e FC em ratos hipertensos, comparados a normotensos, além dessa resposta também se manter destacada na ativação de fibras metabolicamente sensíveis (acionadas pela administração da substância química capsaicina). Mizuno et.al.(2011) estimularam eletricamente a raiz ventral de ratos descerebrados, normotensos e hipertensos, e constataram a reposta simpática ao estímulo de contração muscular acentuada na hipertensão arterial, trazendo como ponto de discussão esse grande aumento de ANS como mediador do RPE nessa doença, enfatizando evidências de que os mecanorreceptores do músculo esquelético teriam papel crucial nessa resposta exacerbada.

O RPE, portanto, constituído pelo mecano e metaborreflexo, participa da promoção de respostas que alteram a oferta sanguínea aos tecidos, aumentando a CV e consequentemente a perfusão em tecidos mais ativos metabolicamente em detrimento de tecidos menos ativos, como o tecido muscular esquelético em estresse e a musculatura visceral, respectivamente. Por mais que haja bastante evidência na literatura acerca dos ajustes cardiovasculares frente ao RPE em termos de aumento de PA, FC, débito cardíaco (DC) e ANS, pouco se sabe sobre os mecanismos controladores dos reajustes hemodinâmicos do fluxo sanguíneo regional e as respectivas regiões do SNC responsáveis por promovê-los, a partir da integração das informações aferentes dos receptores musculares.

Considerando o RVLM como importante região na integração e resposta ao RPE e na gênese da atividade simpática, nossa primeirahipótese foi que a neurotransmissãoglutamatérgica no RVLM participariam dos ajustes hemodinâmicos nos leitos aórtico e renal durante o RPE, induzido pela contração muscular estática (CME). A partir das evidências na literatura de respostas pressóricas alteradas no

RPE nos indivíduos hipertensos, buscamos verificar a participação do RVLM nos ajustes hemodinâmicos induzidos pela CME também em ratos espontaneamente hipertensos, observando se esses diferem do padrão de resposta observado nos animais normotensos, uma vez que essa patologia pode prejudicar a simpatólise funcional e possivelmente desencadear disfunções endoteliais nos vasos sanguíneos, dificultando as variações de CV.

## 2- OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

 Investigar a participação central do RVLM e de mecanismos vasodilatadores periféricos nas alterações hemodinâmicas oriundas da contração muscular estática do tríceps sural a partir da estimulação elétrica do nervo tibial (EENT) em ratos WISTAR e espontaneamente hipertensos (SHR)

2.2 Objetivos específicos

 Avaliar as alterações de PAM e FC durante a CME induzida por estimulação elétrica no nervo Tibial (EENT) esquerdo de ratos WISTAR e SHR

• Avaliar as alterações de fluxo sanguíneo e condutância vascular no leito aórtico durante a CME induzida por EENT esquerdo de ratos WISTAR e SHR

• Avaliar as alterações de fluxo sanguíneo e condutância vascular no leito renal durante a CME induzida por EENT esquerdo de ratos WISTAR e SHR

 Investigar o efeito da neurotransmissãoglutamatérgica, com ácido quinurênico (KYN), na região rostroventrolateral do bulbo (RVLM) contralateral ao nervo estimulado sobre as alterações de fluxo sanguíneo e condutância vascular aórtica e renal durante a CME induzida por EENT esquerdo de ratos WISTAR e SHR.

 Investigar as possíveis alterações de respostas hemodinâmicas em ratos hipertensos a partir de mecanismos de vasodilatação local, pela ação do Nebivolol, um fármaco doador de NO.

#### **3-METODOLOGIA**

Para os procedimentos experimentais, foram utilizados ratos adultos das linhagens Wistar (normotensos) e SHR (espontaneamente hipertensos), pesando entre 250 e 350g, entre 8 e 13 semanas. Os animais foram cedidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Goiás, a partir do então aprovado protocolo pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFG número 033/18.

Os animais foram mantidos em caixas coletivas, obedecendo o limite de 5 animais por caixa, em condições de água e ração de livre acesso, além da temperatura ambiente controlada (22-24ºC).

#### 3.1 Procedimentos Cirúrgicos Preparatórios

Os animais foram induzidos à anestesia por meio de uma mistura gasosa de Oxigênio e Isoflurano a 2%. A partir disso, foram submetidos acateterização da veia jugular direita e artéria carótida externa direita com cânulas de polietileno PE-50, a fim de administração de anestésico intra-venoso (Tiopental, 40mg/kg) e mensuração de pressão arterial pulsátil (PAP) e FC, respectivamente.

Também foi realizado o procedimento de traqueostomia nos animais, a fim de diminuir a resistência das vias aéreas superiores. Durante toda a preparação e procedimentos experimentais, a temperatura dos animais foi mantida entre 36 e 37°, por meio de um sistema de aquecimento através de uma lâmpada infravermelho acoplada a um termostato digital e um termômetro, que era introduzido no reto do animal.

### 3.2 Procedimentos Preparatórios para a realização das Nanoinjeções

Após a preparação inicial, os animais foram fixados em decúbito ventral em aparelho esteriotáxico. A musculatura da nuca foi rebatida e o osso occipital removido, a fim de posteriormente serem realizadas as nanoinjeções de KYN e Corante Azul de Evans. Após a transeccção da membrana duramáter, houve a exposição do *calamusscriptorius*, que foi utilizado como referência das coordenadas da região que se queria injetar, o RVLM.

Micropipetas de vidro (0,6mm de diâmetro interno), acopladas a um sistema de pressão a partir de gás nitrogênio (PICOSPRITZER II) foram posicionadas a 2,6mm rostral, 2,0mm lateral e 2,6mm ventral ao *calamusscriptorius*(Paxinos,Watson, 1986), e por meio de deslocamento do menisco formado pelo encontro do líquido com o ar dentro da pipeta, controlou-se o volume de droga e corante injetado na região (aproximadamente 50nL), a partir de uma lente graduada de microscópio cirúrgico.

### 3.3 Procedimentos Preparatórios para a Mensuração de FSA e FSR

Foram realizadas incisões retroperitoneais e o dorso do animal foi exposto. A porção abdominal da artéria aorta foi dissecada, assim como a artéria renal esquerda, a fim do posicionamento de sondas miniaturizadas (PROBES) para mensuração de FSA e FSR, e a partir disso, CVA e CVR. Gel de condutância foi utilizado nesse processo, a fim de facilitar a aquisição de informações pelo sistema de obtenção de dados (PowerLab System; ADInstruments, Colorado Springs, CO, EUA).

#### 3.4 Procedimentos Preparatórios para a Estimulação do Nervo Tibial

Com o joelho esquerdo de cada rato bem fixado por meio de um *clamp* acoplado ao esteriotáxico, os animais tiveram sua musculatura da porção tríceps sural (TS) do membro esquerdo exposta, e o seu nervo tibial (NT) cuidadosamente dissecado. O tendão do TS foi amarrado a uma linha, que foi atada em sua outra extremidade num tensor de força MLT1030/D (ADinstruments, Australia), devidamente calibrado. O osso calcâneo esquerdo dos animais foi deslocado e seccionado. Consideramos um pré-estiramento basal entre 50 e 100g de tensão.

O NT dissecado foi cuidadosamente apoiado num eletrodo bipolar, ligado a um sistema de eletroestimulação (Estimulador AVS-1M-1C). Durante todo esse procedimento preparatório e durante o procedimento experimental, a partir do momento da exposição do músculo TS e dissecação do NT, havia o constante cuidado de embeber essas estruturas em óleo mineral (temperatura ambiente) a fim de preservação contra o ressecamento.

#### 3.5- Procedimento Experimental e Registros

Durante toda a preparação e experimento, a partir do momento da cateterização da artéria carótida e veia julgular, foi registrada a PAP e FC dos animais, os dados de PAP foram obtidos a partir da conexão do cateter a um transdutor de pressão (MLT0699, ADInstruments, Bella Vista, Austrália) ligado a um amplificador (Bridge Amp, ETH-250, ADInstruments, Bella Vista, Austrália). A partir disso, os dados obtidos foram convertidos em dados digitais pelo conversor analógico digital PowerLab (8/35, ML845, ADInstruments, Bella Vista, Austrália). A PAM foi calculada a partir da fórmula 1/3 da pressão máxima e 2/3 da mínina, do valor de PAP (LabChart 7 v7.3.7; ADInstruments, 10 Bella Vista, Austrália), enquanto a FC foi calculada a partir do sinal da PAP (PowerLab 4/25, ML845, ADInstruments, Bella Vista, Austrália).

Para mensuração dos FSA e FSR, miniaturas de sondas (Transonic Systems, Inc., Ithaca, NY, EUA) foram alocadas ao redor das porções dissecadas das artérias aorta abdominal e renal esquerda. A transmissão por meio do processo de ultrassom conectado a um sistema de aquisição e análise de dados (PowerLab System; ADInstruments, Colorado Springs, CO, EUA). Permitiu mensurar os valores absolutos de fluxo sanguíneo (ml/min). Os valores de CVR e CVA foram calculados pela razão entre o FSR e a PAM e entre o FSA e a PAM, respectivamente.Osvalores e as variações de fluxo e condutância foram obtidos a partir dos cálculos demonstrados na tabela a seguir.

CVR	CVR= FSR/PAM
CVA	CVA= FSA/PAM
Variação (Δ%) de FSR	Δ%FSR=FSR final-FSR basal/FSR basal*100
Variação (Δ%) de FSA	∆%FSA=FSA final-FSA basal/FSA basa*100
Variação (Δ%) de CVR	∆%CVR= CVR final-CVR basal/CVR basal*100
Variação (Δ%) de CVA	Δ%CVA= CVA final-CVA basal/CVA basal*100

**Tabela 1:** Resumo das fórmulas utilizadas para obtenção dos valores de CVR, CVA,  $\Delta$ % FSR,  $\Delta$ % FSA,  $\Delta$ % CVR E  $\Delta$ % CVA.

As contrações musculares estáticas (CME) foram obtidas através da estimulação elétrica do NT. A partir de valores fixos de 40Hz de frequência e 0,1ms de tempo de duração de pulso, foram testados valores mínimos de intensidade de corrente para cada animal, observando assim o primeiro valor onde ocorre uma resposta do músculo TS e tomando esse como o limiar motor (LM) do animal. Foram considerados os animais que apresentaram esse entre 40 e 50 uA. A partir disso, esse valor foi multiplicado por 5, e então obtivemos o valor a ser considerado para realizarmos as contrações experimentais em cada animal, com duração de 30s.

A primeira estimulação experimental foi realizada, e durante esse tempo analisava-se as mudanças hemodinâmicas ocorridas desde o período basal até uma média de tempo de 5min. Nesse período, os valores de PAP, PAM, FC, FSA, FSR, CVA e CVR retornavam a valores próximos aos valores basais. Após essa estimulação denominada CONTROLE, 50 nL de KYN (50mM) foram injetados no RVLM contralateral ao membro estimulado do animal, seguido do tempo de 5 a 10 min a fim das variáveis se estabilizarem novamente, e então uma nova estimulação (PÓS-KYN) no NT foi realizada, com a mesma intensidade da anterior.

Finalizando o procedimento experimental, o corante Azul de Evans 2% foi injetado no mesmo sítio da injeção de KYN, em volume similar. Esse procedimento permitiu as análises histológicas para confirmação da região bloqueada pelo Ácido Quinurênico, e as possíveis áreas afetadas.

#### 3.6 Tratamento com Nebivolol

Ratos da linhagem SHR (n=7) foram tratados por 15 dias, por meio de protocolo de gavagem, com uma solução de 10mg/kg de Cloridrato de Nebivolol (um bloqueador dos receptores β1- adrenérgicos e doador de NO), enquanto alguns animais (n=5) receberam o mesmo tratamento de gavagem com água destilada. Após o período de tratamento, determinado por ser um período suficiente que não alteraria a PA basal desses animais, os animais foram submetidos aos mesmos procedimentos de preparação experimental, mensuração de FS e CV e estimulação elétrica do nervo tibial (EENT), exceto à nanoinjeção de KYN no RVLM.

#### 3.7 Histologia

Ao final dos procedimentos experimentais, os animais ainda anestesiados foram perfundidos via transcardíaca com salina 0,9% (100ml), e em seguida aproximadamente 200ml de Formaldeído 10%. O encéfalo foi retirado em mantido em solução fixadora de Formaldeído 10% por até uma semana.

Os bulbos foram congelados e, com auxílio de um micrótomo de congelamento, foram seccionados em cortes coronais de 40µm de espessura. Os cortes então foram corados pela técnica de vermelho neutro a 1%, montados em lâminas de vidro, e após completamente secos, analisados em microscópio óptico (Leica DM500, Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha) acoplado a um sistema de aquisição de imagens digital (LeicaApplicationSuite, V.3.10, Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha).



Figura 2: Marcação de Azul de Evans 2% em corte coronal bulbar de 40µm de espessura. Coloração pela técnica de vermelho neutro. A seta indica o centro da injeção, a região RVLM..Aumento:1.1.

#### 3.8 Análises Estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPadPrism (v 6.01; GraphPad Software, Inc. San Diego, California, USA). Os dados foram expressos na forma de média ± erro padrão da média.

Para comparar o grupo de normotensos antes e PÓS-KYN e hipertensos antes e PÓS-KYN, foi utilizado teste *t* de student pareado, entre as variáveis  $\Delta$  PAM,  $\Delta$ FC,  $\Delta$ %FSA,  $\Delta$ %FSR,  $\Delta$ %CVA e  $\Delta$ %CVR, bem como os valores de integral (total da área sob a curva).

Para comparar os animais: SHR tratados com Nebivolol/SHR tratados com Água destilada/ Wistars, foi utilizado Anova 1-way, para as variáveis,  $\Delta$  PAM,  $\Delta$ FC,  $\Delta$ %FSA,  $\Delta$ %FSR,  $\Delta$ %CVA e  $\Delta$ %CVR, bem como os valores de integral (total da área sob a curva) a cada 1s durante a estimulação do nervo tibial (30s), sendo o nível de significância estabelecido como p<0,05.

## **4 RESULTADOS**

4.1- Alterações hemodinâmicas evocadas pelo RPE pela EENT dos ratos WISTAR

Valores basais dos ratos WISTAR antes e depois o bloqueio com Ácido Quinurênico.

Os valores basais que se encontravam os animais WISTAR antes das estimulações CONTROLE e das PÓS-KYN estão representados na Tabela 2, sendo descritos por média±EPM. Esses valores demonstram que não houve alterações significativas dos valores basais das variáveis, após a injeção unilateral de KYN no RVLM direito, partindo de valores semelhantes as variações ocorridas na CME CONTROLE e PÓS-KYN.

	WISTAR controle	WISTAR	PÓS-KYN
	(média±EPM)	(média <b>±</b> EPM <b>)</b>	
	n= 7 a 9	n= 7 a 9	
PAM (mmHg)	106±5	107±6	
FC (bpm)	403±10	416±12	
FSA (mL/min)	7,0±0,87	6,6±1,0	
FSR (mL/min)	3,0±0,72	2,56±0,5	
CVA (mL/mmHg*min)	0,062±0,010	0,06±0,010	
CVR (mL/mmHg*min)	0,034±0,010	0,026±0,004	

Tabela 2: Valores basais dos animais WISTAR antes do início das EENT, antes e após o bloqueio do RVLM contralateral. Esses valores estão representados em média±EPM do grupo, sendo o n do grupo variável de 7 a 9. Teste t de *student,* não houve diferenças.

A figura a seguir é o traçado típico do registro de um animal representativo do grupo dos WISTARs, antes e depois da nanoinjeção de KYN, sendo a barra inferior representativa dos 30" de CME pela EENT. Constata-se o aumento de PAP, PAM, a TM gerada, aumento de FC, redução de FSR, aumento de FSA, redução de CVR e
aumento de CVA. No traçado à direita, vemos a redução das alterações de PAP, PAM, FC, FSA, CVR e CVA.



Figura 3: Traçado típico representativo de animal WISTAR do registro das variáveis em condições basais, durante a EENT e após a estimulação. Pressão arterial pulsátil (PAP), Pressão arterial média (PAM), Tensão muscular (TM), Frequência Cardíaca (FC), Fluxo sanguíneo Renal (FSR), Fluxo sanguíneo Aórtico (FSA), Condutância Vascular renal (CVR) e Condutância Vascular Aórtica (CVA). A barra inferior representa os 30s de CME pela EENT. O termo CONTROLE é referente a antes da injeção de KYN, e o PÓS-KYN, posteriormente a ela.

# Respostas de TM dos ratos WISTAR durante a EENT antes e após o bloqueio do RVLM com Ácido Quinurênico.

Este protocolo experimental resultou na contração muscular do tríceps sural esquerdo dos animais, devido à EENT, nervo responsável por levar aferências motoras a esse grupamento muscular. A tensão gerada pela contração muscular estática foi demonstrada na Figura 4, sendo expressa em gramas (g). Assim que se inicia a EENT, o músculo, pré-estirado, realiza uma contração, chegando imediatamente ao seu pico de resposta (g). No decorrer dos 30" de estimulação, a tensão muscular gerada diminui alguns gramas gradativamente, devido à fadiga muscular gerada (Fig 4A). Como podemos demonstrar, a variação (pico) de TM gerada foi semelhante na situação controle e na situação PÓS-KYN (Fig 4B), ou seja, demonstrando que não há alteração no padrão de resposta de CME após o bloqueio do RVLM com o Ácido Quinurênico, situação também semelhante na tensão total gerada no decorrer do tempo (Fig 4C). A figura 4 traz a resposta de TM nos 30" de EENT, seguido pelo pico de valores desenvolvidos e pelo gráfico de Área sob a curva.



Figura 4:Média±EPM das variações de (A) TM em ratos WISTAR ao longo dos 30" de CME devido à EENT ( $\Delta$ Tensão), (B) máximo de TM desenvolvida (Tensão) e (C) Área sob a curva da TM desenvolvida ao longo dos 30" (f $\Delta$ Tensão). Antes (controle) e após (PÓS-KYN) o bloqueio do RVLM direito com Ácido Quinurênico..

### Respostas de PAM e FC dos ratos WISTAR durante a EENT antes e após o bloqueio do RVLM com Ácido Quinurênico

Em Wistars, a EENT ocasionou uma resposta fisiológica de aumento na PAM e FC devido a contração da musculatura do tríceps sural, cujo padrão já é bem descrito na literatura como resultado do RPE. Entretanto, nem todos os animais apresentaram esse padrão de resposta hipertensora e taquicárdica, tendo 30% da população utilizada apresentado o comportamento oposto. Nesse trabalho, foi critério de inclusão os dados dos animais que tiveram resposta correspondente à da literatura, que correspondeu à maioria deles.

No gráfico A da figura 5, podemos observar esse padrão de resposta na PAM durante os 30" de estimulação e o gradativo retorno a valores basais durante os 30" seguintes. O gráfico B da Figura 5 mostra a variação máxima (pico) de PAM desenvolvida durante esses 30" de EENT, e o gráfico C representa o valor total de variação de PAM durante os 30".

Após o bloqueio do RVLM, é observado nos gráficos a redução dessas respostas. Nos gráficos da figura 6, também podemos observar aumento da FC: A) durante os 30" de estimulação e o retorno aos valores basais nos 30"após a finalização da EENT (curva); B) a variação máxima (pico) de FC desenvolvida durante esses 30" de EENT, e C) o valor total de variação de FC durante os 30". Após o bloqueio do RVLM, é observada nos gráficos uma redução dessas respostas.



Figura 5:Média±EPM das variações de PAM em ratos WISTAR. A) Curva representativa de comportamento ao longo dos 30" de CME devido à EENT ( $\Delta$ PAM), B) pico máximo de PAM atingido ( $\Delta$ PAM) e C) Área sob a curva da variação de PAM desenvolvida ao longo dos 30" (f $\Delta$  PAM). Antes (controle) e após (PÓS-KYN) o bloqueio do RVLM direito com Ácido Quinurênico. \* difere do controle. p<0,05.



Figura 6: Média±EPM das variações de FC em ratos WISTAR.A) Curva representativa de comportamento ao longo dos 30" de CME devido à EENT ( $\Delta$ FC), B)pico máximo de FC atingido ( $\Delta$ FC) e C) Área sob a curva da variação de FC desenvolvida ao longo dos 30" (f $\Delta$  FC). Antes (controle) e após (PÓS-KYN) o bloqueio do RVLM direito com Ácido Quinurênico. \* difere do controle. p<0,05.

## Respostas de FSA e CVA nos ratos WISTAR durante a EENT antes e após o bloqueio do RVLM com Ácido Quinurênico.

No mesmo protocolo experimental que mensurou as variáveis já descritas, também foram registradas as variações de FSA e CVA durante a CME devido à EENT. Esses valores seriam correspondentes à quantidade sanguínea que está sendo redirecionada para os membros posteriores do animal, mais precisamente à musculatura estimulada.

A figura 7 traz os gráficos referentes ao padrão de resposta dos ratos Wistar durante a CME em relação ao FSA, antes (controle) e após o bloqueio do RVLM contralateral (PÓS-KYN). No gráfico A da figura 7, podemos observar um aumento de resposta no FSA durante os 30" de estimulação e o gradativo retorno a valores basais durante os 30" seguintes.

O gráfico B da Figura 7 mostra, na curva em função do tempo, a variação máxima (pico) percentual de FSA desenvolvida durante esses 30" de EENT, e o gráfico C representa o valor total de variação percentual de FSA durante os 30". Após o bloqueio do RVLM, é observada a redução da resposta de aumento percentual (p<0,05) e uma tendência à redução da área sob a curva (7C).

Da mesma forma, ocorre um aumento da CVA durante o período da EENT, sendo essa resposta atenuada após a nanoinjeção de KYN no RVLM. Nos gráficos da figura 8, também podemos observar o padrão de resposta de aumento da CVA: A) durante os 30" de estimulação, na curva em função do tempo, e o retorno aos valores basais nos 30"após a finalização da EENT; B) a variação máxima (pico) percentual de CVA desenvolvida durante esses 30" de EENT, e C) o valor total de variação percentual de CVA durante os 30". Após o bloqueio do RVLM, é observada nos gráficos uma redução dessas respostas.



Figura 7: Média±EPM das variações de FSA em ratos WISTAR. A) Curva representativa de comportamento ao longo dos 30" de CME devido à EENT ( $\Delta$ FSA), B) pico máximo de variação% de FSA atingido ( $\Delta$ FSA) e C) Área sob a curva da variação de FSA desenvolvida ao longo dos 30" (f $\Delta$ FSA). Antes (controle) e após (PÓS- KYN) o bloqueio do RVLM direito com Ácido Quinurênico. \* difere do controle. p<0,05.



Figura 8: Média ± EPM das variações de A) CVA em ratos WISTAR. Curva representativa de comportamento ao longo dos 30" de CME devido à EENT ( $\Delta$ CVA), B) pico máximo de variação % de CVA atingido ( $\Delta$ CVA) e C) Área sob a curva da variação de CVA desenvolvida ao longo dos 30" (f $\Delta$ CVA). Antes (controle) e após (PÓS-KYN) o bloqueio do RVLM direito com Ácido Quinurênico. \* difere do controle. p<0,05.

# Respostas de FSR e CVR nos ratos WISTAR durante a EENT antes e após o bloqueio do RVLM com Ácido Quinurênico

Diferentemente do padrão comportamental do leito aórtico durante a CME, a resposta de FSR e CVR durante a EENT foi de redução dessas variáveis hemodinâmicas durante o tempo de estimulação.

A figura 9 traz os gráficos referentes ao padrão de resposta dos ratos Wistar durante a CME em relação ao FSR, antes (controle) e após o bloqueio do RVLM contralateral (PÓS-KYN). No gráfico A da figura 9, podemos observar uma diminuição de resposta no FSR durante os 30" de estimulação e o gradativo retorno a valores basais durante os 30" seguintes. O gráfico B, da Figura 9, mostra a variação máxima (pico) percentual de FSR desenvolvida durante esses 30" de EENT, e o gráfico C representa o valor total de variação percentual de FSR durante os 30".

Após o bloqueio do RVLM, não é observado nos gráficos alterações na resposta de diminuição percentual (p<0,05). Da mesma forma da estimulação basal, ocorre diminuição de CVR durante o período da EENT PÓS-KYN. Nos gráficos da figura 10, podemos observar o padrão de resposta de diminuição da CVR: A) durante os 30" de estimulação, na curva em função do tempo, e o retorno aos valores basais nos 30"após a finalização da EENT; B) a variação máxima (pico) percentual de CVR desenvolvida durante esses 30" de EENT, e C) o valor total de variação percentual de CVR durante os 30". Após o bloqueio do RVLM, não são observadas alterações nessas respostas.

4.2 Transecção de nervo Tibial para verificação de aferências musculares

Para verificação que as alterações hemodinâmicas durante a estimulação do NT eram exclusivamente (ou ao menos em sua maior parte) oriundas das informações de metaborreceptores e mecanorreceptores, na contração muscular (Joyner, 2006. Laterza et.al., 2008), após os procedimentos de EENT sem a injeção de KYN, alguns animais WISTAR tiveram o nervo tibial seccionado em sua porção distal, e após isso, foi realizada uma nova EENT nos mesmos parâmetros da última estimulação. (Fig. 11). Foi verificada que uma vez abolida a CME, não houve alteração das variáveis verificadas.



Figura 9: Média  $\pm$  EPM das variações de FSR em ratos WISTAR. A) Curva representativa de comportamento ao longo dos 30" de CME devido à EENT ( $\Delta$ FSR), B) pico máximo de variação% de FSR atingido ( $\Delta$ FSA) e C) Área sob a curva da variação de FSR desenvolvida ao longo dos 30" ( $\Delta$ FSR). Antes (controle) e após (PÓS-KYN) o bloqueio do RVLM direito com Ácido Quinurênico.



Figura 10: Média±EPM das variações de CVR em ratos WISTAR. A) Curva representativa de comportamento ao longo dos 30" de CME devido à EENT ( $\Delta$ CVR), B) pico máximo de variação % de CVR atingido ( $\Delta$ CVR) e C) Área sob a curva da variação de CVR desenvolvida ao longo dos 30" (f $\Delta$ CVR). Antes (controle) e após (PÓS-KYN) o bloqueio do RVLM direito com Ácido Quinurênico..



Figura 11: Traçado típico representativo de animal WISTAR do registro das variáveis em condições basais, durante a EENT, e após a transecção do nervo tibial. Pressão arterial pulsátil (PAP), Pressão arterial média (PAM), Tensão muscular (TM), Frequência Cardiaca (FC), Fluxo sanguíneo Renal (FSR), Fluxo sanguíneo Aórtico (FSA), Condutância Vascular renal (CVR) e Condutância Vascular Aórtica (CVA). A barra inferior representa os 30s de CME pela EENT.

4.2 Alterações hemodinâmicas evocadas pelo RPE pela EENT dos ratos SHR

### Valores basais dos SHR antes e depois o bloqueio com Ácido Quinurênico.

Os valores basais que se encontravam os animais antes das estimulações CONTROLE e das PÓS-KYN estão representados na Tabela 2, sendo descritos por média±EPM. Esses valores demonstram que não houve alterações significativas dos valores basais das variáveis, após a injeção de KYN no RVLM direito, partindo de valores semelhantes as variações ocorridas na CME CONTROLE e PÓS-KYN.

	SHR	controle	SHR PÓS-KYN (média±EPM)	
	(média <b>±</b> EPM)			
			n=6	
	n=6			
PAM (mmHg)	144 <b>±</b> 7		145 <b>±</b> 6	
FC (bpm)	360±13		369±15	
FSA (mL/min)	6,3 <b>±</b> 0,98		6,54 <b>±</b> 1,0	
FSR (mL/min)	1,82 <b>±</b> 0,41		1,71±0,28	
CVA (mL/mmHg*min)	0,05 <b>±</b> 0,010		0,05±0,010	
CVR (mL/mmHg*min)	0,012 <b>±</b> 0,003		0,012±0,002	

Tabela 3: Valores basais dos animais SHR antes do início das EENT, antes e após o bloqueio do RVLM contralateral. Esses valores estão representados em média±EPM do grupo, Teste t de *student,* não houve diferenças

A figura a seguir é o traçado típico do registro de um animal representativo do grupo dos SHRs, antes e depois da nanoinjeção de KYN, sendo a barra inferior representativa dos 30" de CME pela EENT. Constata-se o aumento de PAP, PAM, a TM gerada, aumento de FC, e redução de CVR. No traçado à direita, vemos a redução das alterações de PAP, PAM, e FC.



Figura 12: Traçado típico representativo de animal SHR do registro das variáveis em condições basais, durante a EENT, e após a estimulação. Pressão arterial pulsátil (PAP), Pressão arterial média (PAM), Tensão muscular (TM), Frequência Cardíaca (FC), Fluxo sanguíneo Renal (FSR), Fluxo sanguíneo Aórtico (FSA), Condutância Vascular renal (CVR) e Condutância Vascular Aórtica (CVA). A barra inferior representa os 30s de CME pela EENT. O termo controle é referente a antes da injeção de KYN, e o PÓS-KYN, posteriormente a ela.

## Respostas de TM dos ratos SHR durante a EENT antes e após o bloqueio do RVLM com Ácido Quinurênico

Este protocolo experimental resultou na contração muscular do tríceps sural esquerdo dos animais, devido à EENT, nervo responsável por levar aferências motoras a esse grupamento muscular. A tensão gerada pela contração muscular estática foi demonstrada na Figura 13, sendo expressa em gramas (g).

Assim que se inicia a EENT, o músculo, pré- estirado, realiza uma contração, chegando imediatamente ao seu pico de resposta (g). No decorrer dos 30" de estimulação, a tensão muscular gerada diminui alguns gramas gradativamente, devido à fadiga muscular gerada (Fig. 12A).



Figura 13: Média±EPM das A) variações de TM em ratos SHR ao longo dos 30" de CME devido à EENT (ΔTensão), B) máximo de TM desenvolvida (Tensão) e C) Área sob a curva da TM desenvolvida ao longo dos 30" (fΔ Tensão). Antes (controle) e após (PÓS-KYN) o bloqueio do RVLM direito com Ácido Quinurênico.

Como podemos demonstrar, a variação (pico) de TM gerada foi semelhante na situação controle e na situação PÓS-KYN (Fig. 13B), ou seja, demonstrando que não há alteração no padrão de resposta de CME após o bloqueio do RVLM com o Ácido Quinurênico, situação também semelhante na tensão total gerada no decorrer do tempo (Fig 13 C). A figura 13 traz a resposta de TM nos 30" de EENT, seguido pelo pico de valores desenvolvidos e pelo gráfico de Área sob a curva.

### Respostas de PAM e FC dos ratos SHR durante a EENT antes e após o bloqueio do RVLM com Ácido Quinurênico

Em SHRs, a EENT ocasionou uma resposta fisiológica de aumento na PAM e FC devido a contração da musculatura do tríceps sural.

No gráfico A da figura 14, podemos observar esse padrão de resposta na PAM durante os 30" de estimulação e o gradativo retorno a valores basais durante os 30" seguintes. O gráfico B da Figura 14 mostra a variação máxima (pico) de PAM desenvolvida durante esses 30" de EENT, e o gráfico C representa o valor total de variação de PAM durante os 30". Após o bloqueio do RVLM, é observado nos gráficos a redução dessas respostas. Nos gráficos da figura 15, também podemos observar o padrão de resposta de aumento da FC: A) durante os 30" de estimulação e o retorno aos valores basais nos 30"após a finalização da EENT; B) a variação máxima (pico) de FC desenvolvida durante esses 30" de EENT, e C) o valor total de variação de FC durante os 30". Após o bloqueio do RVLM, é observada nos gráficos uma redução dessas respostas.



Figura 14: Média ± EPM das variações de PAM em ratos SHR. A) Curva representativa de comportamento ao longo dos 30" de CME devido à EENT ( $\Delta$ PAM), B) pico máximo de PAM atingido ( $\Delta$ PAM) e C) Área sob a curva da variação de PAM desenvolvida ao longo dos 30" (f $\Delta$  PAM). Antes (controle) e após (PÓS-KYN) o bloqueio do RVLM direito com Ácido Quinurênico. \* difere do controle. p<0,05.



Figura 15: Média ± EPM das variações de FC em ratos SHR. A) Curva representativa de comportamento ao longo dos 30" de CME devido à EENT ( $\Delta$ FC), B) pico máximo de FC atingido ( $\Delta$ FC) e C) Área sob a curva da variação de FC desenvolvida ao longo dos 30" (f $\Delta$  FC). Antes (controle) e após (PÓS-KYN) o bloqueio do RVLM direito com Ácido Quinurênico. \* diferedo controle. p<0,05.

## Respostas de FSA e CVA nos ratos SHR durante a EENT antes e após o bloqueio do RVLM com Ácido Quinurênico

No mesmo protocolo experimental que mensurou as variáveis já descritas, também foram registradas as variações de FSA e CVA durante a CME devido à EENT. Esses valores seriam correspondentes à quantidade sanguínea que está sendo redirecionada para os membros posteriores do animal, mais precisamente à musculatura estimulada. A figura 16 traz os gráficos referentes ao padrão de resposta dos ratos SHR durante a CME em relação ao FSA, antes (controle) e após o bloqueio do RVLM contralateral (PÓS-KYN).

Nos gráficos A da figura 16, podemos observar que não houve alteração de FSA durante a EENT. O gráfico B da Figura 16 mostra a variação máxima (pico) percentual de FSA desenvolvida durante esses 30" de EENT, e o gráfico C representa o valor total de variação percentual de FSA durante os 30". Após o bloqueio do RVLM, não observamos variações do padrão de resposta.

Observamos também que não ocorrem modificações da CVA durante o período da EENT, sendo essa resposta mantida após a nanoinjeção de KYN no RVLM. Nos gráficos da figura 17, também podemos observar o padrão de resposta da CVA: A) durante os 30" de estimulação e seu comportamento nos 30"após a finalização da EENT; B) a variação máxima (pico) percentual de CVA desenvolvida durante esses 30" de EENT, e C) o valor total de variação percentual de CVA durante o 30". Após o bloqueio do RVLM, não são observados nos gráficos alterações dessas respostas.



Figura 16: Média±EPM das variações de FSA em ratos SHR. A) Curva representativa de comportamento ao longo dos 30" de CME devido à EENT ( $\Delta$ FSA), B) pico máximo de variação% de FSA atingido ( $\Delta$ FSA) e C) Área sob a curva da variação de FSA desenvolvida ao longo dos 30" (f $\Delta$ FSA). Antes (controle) e após (PÓS-KYN) o bloqueio do RVLM direito com Ácido Quinurênico.



Figura 17: Média±EPM das variações de CVA em ratos SHR.A) Curva representativa de comportamento ao longo dos 30" de CME devido à EENT ( $\Delta$ CVA), B) pico máximo de variação % de CVA atingido ( $\Delta$ CVA) e C) Área sob a curva da variação de CVA desenvolvida ao longo dos 30" (f $\Delta$  CVA). Antes (controle) e após (PÓS-KYN) o bloqueio do RVLM direito com Ácido Quinurênico.

### Respostas de FSR e CVR nos ratos SHR durante a EENT antes e após o bloqueio do RVLM com Ácido Quinurênico

Diferentemente do padrão comportamental do leito aórtico durante a CME, a resposta de FSR e CVR durante a EENT foi de redução dessas variáveis hemodinâmicas durante o tempo de estimulação.

A figura 18 traz os gráficos referentes ao padrão de resposta dos ratos SHR durante a CME em relação ao FSR, antes (controle) e após o bloqueio do RVLM contralateral (PÓS-KYN). No gráfico A da figura 18, podemos observar uma diminuição de resposta no FSR durante os 30" de estimulação e o seu comportamento durante os 30" seguintes.

O gráfico B da Figura 18 mostra a variação máxima (pico) percentual de FSR desenvolvida durante esses 30" de EENT, e o gráfico C representa o valor total de variação percentual de FSR durante os 30". Após o bloqueio do RVLM, não foi observado nos gráficos alterações na resposta de diminuição percentual. Da mesma forma, ocorre diminuição de CVR durante o período da EENT.

Nos gráficos da figura 19, podemos observar o padrão de resposta de diminuição da CVR: A) durante os 30" de estimulação e o retorno aos valores basais nos 30"após a finalização da EENT; B) a variação máxima (pico) percentual de CVR desenvolvida durante esses 30" de EENT, e C) o valor total de variação percentual de CVR durante os 30".

Após o bloqueio do RVLM, não são observadas alterações nas respostas de pico e diminuição percentual, porém observa-se a diminuição da resposta de Área sob a curva (19C).

#### 4.3 Transsecção de nervo para verificação de aferências

Para verificação que as alterações hemodinâmicas durante a estimulação do NT eram exclusivamente oriundas da contração muscular (Joyner, 2006. Laterza et.al., 2008), mais precisamente, dos mecanorreceptores.

Após os procedimentos de EENT sem a injeção de KYN, alguns animais SHR tiveram o nervo tibial seccionado em sua porção distal, e após isso, foi realizada uma nova EENT nos mesmos parâmetros da última estimulação. (FIG. 20)



Figura 18: Média  $\pm$  EPM das variações de FSR em ratos SHR. A) Curva representativa de comportamento ao longo dos 30" de CME devido à EENT ( $\Delta$ FSR), B) pico máximo de variação% de FSR atingido ( $\Delta$ FSA) e C) Área sob a curva da variação de FSR desenvolvida ao longo dos 30" (f $\Delta$ FSR). Antes (controle) e após (PÓS-KYN) o bloqueio do RVLM direito com Ácido Quinurênico.



Figura 19: Média±EPM das variações de CVR em ratos SHR. A) Curva representativa de comportamento ao longo dos 30" de CME devido à EENT ( $\Delta$ CVR) B),pico máximo de variação % de CVR atingido ( $\Delta$ CVR) e C) Área sob a curva da variação de CVR desenvolvida ao longo dos 30" (f $\Delta$  CVR). Antes (controle) e após (PÓS-KYN) o bloqueio do RVLM direito com Ácido Quinurênico. \* difere do controle. p<0,05.



Figura 20: Traçado típico representativo de animal SHR do registro das variáveis em condições basais, durante a EENT, e após a transecção do nervo tibial. Pressão arterial pulsátil (PAP), Pressão arterial média (PAM), Tensão muscular (TM), Frequência Cardiaca (FC), Fluxo sanguíneo Renal (FSR), Fluxo sanguíneo Aórtico (FSA), Condutância Vascular renal (CVR) e Condutância Vascular Aórtica (CVA). A barra inferior representa os 30s de CME pela EENT.

4.4 Padrão de respostas hemodinâmicas de Animais WISTAR, SHR e SHR tratados com Cloridrato de Nebivolol por 15 dias

A seguir, a tabela com valores basais dos animais WISTAR (n=12), SHR controle (n=5), e SHR tratados com Cloridrato de Nebivolol a 10mg/kg (SHR NBL). Em seguida, o traçado típico do animal representativo de cada grupo (WISTAR, SHR e SHR NBL), seguido de sua figura representativa ponto a ponto em 60' de CVR e CVA.

	WISTAR	SHR	SHR NBL
	(média <b>±</b> EPM)	CONTROLE	(média <b>±</b> EPM <b>)</b>
	n= 13	(média <b>±</b> EPM <b>)</b>	n= 7
		n= 5	
PAM	106±5	128±4	130±2*
(mmHg)			
FC (bpm)	403±10	353±11	319±8*#
FSA	7,0±0,87	3,9±0,38	2,43±0,38*#
(mL/min)			
FSR	3,0±0,72	2,27±0,45	2,22±0,32
(mL/min)			
CVA	0,062±0,01	0,03±0,003	0,018±0,003*#
(mL/mmHg*min)			
CVR	0,034±0,01	0,017±0,002	0,017±0,002
(mL/mmHg*min)			

Tabela 4: Valores basais dos animais WISTAR, SHR CONTROLE E SHR NBL antes do início da EENT. Esses valores estão representados em média ± EPM do grupo. \* é diferente de WISTAR, e # diferente de SHR CONTROLE.



Figura 21: Traçado típico representativo de animal WISTAR no registro das variáveis em condições basais, durante a EENT.

A figura 21 é composta pelo traçado típico de animal representativo do grupo WISTAR, demonstrando as variáveis PAP, PAM, TM, FC, FSR, FSA, CVR, CVA. A barra inferior representa os 30s de CME pela EENT.E à esquerda, temos a resposta ponto a ponto da variação de CVR e CVA em escala maior, representando a área hachurada os 30" de EENT seguidos de mais 30". Podemos perceber que há redução da CVR e aumento da CVA.



Figura 22: Traçado típico representativo de animal SHR CONTROLE no registro das variáveis em condições basais, durante a EENT.

A figura 22 é composta pelo traçado típico de animal representativo do grupo SHR CONTROLE, demonstrando as variáveis PAP, PAM, TM, FC, FSR, FSA, CVR, CVA. A barra inferior representa os 30s de CME pela EENT. A esquerda na figura, temos a resposta ponto a ponto da variação de CVR e CVA em escala maior, representando a área hachurada os 30" de EENT seguidos de mais 30". Há redução na CVR, mas não há aumento de CVA.



Figura 23: Traçado típico representativo de animal SHR NBL no registro das variáveis em condições basais, durante a EENT.

A figura 23 é composta pelo traçado típico de animal representativo do grupo SHR CONTROLE, demonstrando as variáveis PAP, PAM, TM, FC, FSR, FSA, CVR, CVA. A barra inferior representa os 30s de CME pela EENT.E à esquerda na figura, temos a resposta ponto a ponto da variação de CVR e CVA em escala maior, representando a área hachurada os 30" de EENT seguidos de mais 30". Há redução na CVR, porém o aumento da resposta de CVA só é percebido tardiamente.

A seguir, as figuras representam um comparativo entre os grupos observados. As figuras 24 A, B,e C representam Tensão desenvolvida, pico máximo gerado e função de Área sob a Curva.



Figura 24. Média±EPM das variações de Tensão desenvolvida nos grupos. A) Tensão gerada (g) ao longo dos 30" de CME devido à EENT; B), pico máximo de variação de Tensão (g) e C) Área sob a curva da variação de tensão desenvolvida ao longo dos 30".

As figuras 25 A e B representam as diferenças de pico de PAM (A) por cada grupo, e a soma em 60' das variações de PAM. As C e D representam a variação de pico de FC entre os grupos Wistar, SHR e NBL, e a soma total em 60' de análise, incluindo os 30" de EENT com 30" de recuperação.



: Figura 25: Média±EPM das variações de PAM e FC desenvolvida nos grupos.A) Variação de PAM máxima ao longo dos 30" de CME devido à EENT; B) soma da variação de PAM nos 30" de EENT mais 30" de recuperação; C) Variação de FC máxima ao longo dos 30" de CME devido à EENT; D) soma da variação de FC nos 30" de EENT mais 30" de recuperação. \* diferente, p<0,05

Já a figura 26 traz a média e EPM dos grupos nos parâmetros: A) variação percentual máxima de FSA; B) soma total da variação de FSA em 60'; C) variação percentual máxima de CVA; D) soma total da variação de CVA em 60'. Da mesma forma, na figura 27 observamos variação percentual máxima de FSR; B) soma total da variação de FSR em 60'; C) variação percentual máxima de CVR; D) soma total da variação de CVR em 60'.



Figura 26: Média ± EPM das variações de FSA e CVA desenvolvidas nos grupos. A) Variação percentual de FSA máxima ao longo dos 30" de CME devido à EENT; B) soma da variação percentual de FSA nos 30" de EENT mais 30" de recuperação; C) Variação percentual de CVA máxima ao longo dos 30" de CME devido à EENT; D) soma da variação percentual de CVA nos 30" de EENT mais 30" de recuperação; \* diferente, p<0,05



Figura 27: Média ± EPM das variações de FSR e CVR desenvolvidas nos grupos. A) Variação percentual de FSR máxima ao longo dos 30" de CME devido à EENT; B) soma da variação percentual de FSR nos 30" de EENT mais 30" de recuperação; C) Variação percentual de CVR máxima ao longo dos 30" de CME devido à EENT; D) soma da variação percentual de CVR nos 30" de EENT mais 30" de recuperação.

#### 5- DISCUSSÃO

#### 5.1 Ratos normotensos- WISTARs

Sendo já bem descrito na literatura o RPE em protocolos similares a essa pesquisa, em termos de aumento de PAM e FC desencadeados pelas aferências de receptores musculares, os principais achados desse estudo foi a caracterização do padrão comportamental do FSA e FSR e respectivas condutâncias dos animais durante a CME ocasionada pela EENT de 30", no padrão de estimulação elétrica adotado nesse protocolo.

Mesmo com os animais anestesiados, foi possível verificar as respostas pressóricas e taquicárdicas, assim como em trabalhos onde não se fez uso de anestésicos (Smith et.al., 2001. Harms et.al., 2016;), confirmando um padrão já seguido na literatura. Além disso, nossos resultados trazem dados interessantes sobre as alterações de condutância durante a CME e um tempo após a estimulação, em condições basais (controle) e após o bloqueio da região RVLM.

O RVLM é bastante descrito na literatura por sua importância na gênese e manutenção da ANS e controle vasomotor. Durante uma situação de exercício físico, na presente pesquisa simulada por uma contração muscular, mesmo que oriunda da estimulação elétrica de aferências do nervo tibial (responsável pela inervação do grupo muscular em CME), mecanorreceptores e metaborreceptores estão atuando em resposta do encurtamento das fibras musculares (CME) e da geração de substâncias oriundas do metabolismo local, respectivamente.

Essas respostas provenientes do mecano e metaborreflexo irão seguir por via aferente, fazendo uma sinapse na CIL sendo levadas até o tronco encefálico, onde essa via nervosa se decussa; entrando pela via do Núcleo do Trato Solitário (NTS), sendo projetada para áreas de controle cardiovascular, como o RVLM (Ally, 1998. Ally et.al., 2011. Ally, 1998)

Depois de obtermos a resposta congruente ao RPE na PAM e FC, o bloqueio dos receptores ionotrópicosglutamatérgicos na região contralateral do RVLM, com a injeção do KYN, desencadeou uma diminuição dessa resposta hipertensiva e taquicárdica. Grande parte das sinapses excitatórias nas regiões de regulação cardiovascular no SNC é devido ao neurotransmissor Glutamato (Perkinset.al., 1982. Wang et.al., 2017; Langner et.al, 2017), e a inativação desses receptores diminuiu - mas não aboliu- a resposta ao RPE.

Isso pode ser devido ao fato de mesmo sendo o RVLM um importante núcleo para desencadear aumento de ANS, PAM e FC, ele não é o único núcleo central envolvido nesse circuito. Portanto, quanto aos animais normotensos, obtivemos uma redução do RPE, provavelmente oriunda da redução da ANS gerada no RVLM.

As respostas à CME pela EENT nos ratos Normotensos são de aumento de FSA e CVA aórtica, durante e imediatamente após a estimulação. Devido a questões metodológicas, não foi possível mensurar exatamente leitos vasculares mais específicos da musculatura estimulada (como artéria ilíaca, por exemplo). Entretanto, o leito aórtico propicia a noção do fluxo sanguíneo que está sendo aumentado (redirecionado) para os membros traseiros durante a CME. Esse aumento de FSA e CVA pode ser atribuído à contração das fibras locais, sinalizada pelas fibras nervosas tipo III (mecanorreceptores) e, de forma mais tardia, também pode ser corroborado por metabólitos produzidos pelo estresse local, como CO<sub>2</sub> e ON.

Como nos traz Secher et.al.(2011), o aumento do FS para os membros exercitados é ocasionado principalmente pela trabalho muscular elevado na região, pelo distúrbio metabólico e o detrimento do fluxo sanguíneo para outras regiões, como músculos esqueléticos não exercitados e fluxo sangüíneo abdominal. Yardley e Hilton. (1987) estimularam eletricamente a região hipotalâmica de ratos associada à reações de defesa e obtiveram vasodilatação nos músculos esqueléticos. Cravo et.al. (2003) cita a capacidade do tronco encefálico de identificar a fonte de estimulação estressante e fazer uma redução seletiva do tono vasomotor simpático para essa área, propiciando o maior FS, e em compensação, o aumento da ANS (e consequente vasoconstrição) para as demais áreas, balanceando o fluxo sanguíneo total. Eles afirmam que essa vasodilatação se deve a uma combinação da redução do tônus vasomotor simpático e à ativação dos receptores β2-adrenérgicos pelas catecolaminas liberadas no estágio tardio da estimulação. Possas et.al.(2001) cita experimentos (cujos dados não foram mostrados) que a vasodilatação induzida pela estimulação do nervo ciático não foi afetada pela administração sistêmica de propranolol (bloqueador β adrenérgico) sugerindo que a ativação dos receptores β2
não é essencial para a resposta vasodilatadora, e que isso seja em grande parte devido à retirada do tônus vasoconstritor simpático.

Após o bloqueio com o Ácido Quinurênico, a resposta de FSA e CVA durante a contração é reduzida, o que nos leva à associação com a ANS menos reduzida nesse leito durante a estimulação, ou seja, uma ANS maior do que na contração em condições basais (controle). Mesmo com a necessidade do aumento do aporte sanguíneo para a região, o bloqueio unilateral do RVLM desencadeia uma resposta de diminuição de vasodilatação. Além do RVLM ser um dos núcleos importantes para a gênese de ANS, podemos sugerir que ele e suas projeções estejam envolvidos na capacidade do tronco encefálico de fazer uma vasoconstrição ou vasodilatação seletiva, a partir da fonte de atividade, como já nos trouxe Cravo et.al. (2003). Uma vez que se fôssemos partir apenas da premissa de controle de ANS, com o RVLM bloqueado, a ANS estaria diminuída, e portanto, o tono vasomotor simpático da artéria aorta se reduziria, aumentando mais ainda a CVA, somado aos fatores locais da contração muscular que proporcionam a vasodilatação tecidual. Ou então, pelo simples fato de se diminuir a ANS, diminui-se também a PAM, FC e débito cardíaco (DC), o que corresponde a menos sangue ciculante por quantidade de tempo, o que também explicaria a diminuição de FSA e CVA após o bloqueio do RVLM.

Em relação ao FSR e CVR, podemos observar a diminuição dos valores durante a CME pela EENT, e essa diminuição não é alterada após o bloqueio do RVLM contralateral. Existem algumas hipóteses que explicariam a diminuição de CVR e FSR durante a situação de contração por estimulação elétrica. A primeira delas é o fato de, como citado anteriormente, a redistribuição de fluxo sanguíneo ocorrer de forma que a perfusão sanguínea seja eficiente nos tecidos em estresse, ou seja, a musculatura contraída, ocorrendo assim o desvio do fluxo sanguíneo de musculaturas não exercitadas ou da região abdominal/visceral, de forma a equilibrar o débito cardíaco.Outra hipótese bem aceitável é o fato de, durante a CME, haver o aumento da ANS diretamente para os rins, o que aumentaria a vasoconstrição renal, diminuindo assim o fluxo sanguíneo e consequentemente condutânca. Além disso, não podemos descartar a função de autorregulação miogênica renal, função protetiva que promove ajustes vasoconstritivos quando a PA está elevada ou

apresentando flutuações (Loutzenhiser R, et.al.,2007. Fan F et.al., 2017. Burke M et.al., 2013)

O fato da condutância não ser alterada após a nanoinjeção de KYN no RVLM nos remete a pensar nos outros tipos de conexões neurais com os rins, como por exemplo a que vem diretamente do Núcleo Paraventricular do Hipotálamo (PVN) (Haselton, 2016).

O PVN é uma importante região integrativa das funções que regulam a ANS e atividade cardiovascular. Ele recebe informações de barorreceptores e quimiorreceptores e se projeta para regiões como o RVLM e Coluna Intermédio Lateral (CIL) (Toney et.al, 2010; Xu et.al.,2015). Trabalhos trazem o PVN como uma importante área de controle de ANS basal dos rins, com uma projeção aferente direta. Haselton et.al.(2016) aafirma que o PVN é uma importante região controladora do mecanismo de vasopressão renal. Toney et.al.(2010) afirma, em seu trabalho sobre descrição das vias do PVN, que as populações neuronais deste núcleo têm funções relacionadas à geração e modulação barorreflexa do tônus vasomotor simpático renal.. Logo, a resposta à ativação simpática seria uma ativação neuronal do PVN, que também ativariam a resposta simpática renal de vasoconstrição. Possivemelmente, ao bloquear o RVLM, a resposta simpática geral estaria diminuída, porém não a que advém diretamente do PVN, já que o RVLM recebe projeções do PVN (Koba et.al., 2018).

Logo, a vasoconstrição renal se manteve. E o fato dos animais desse experimento estarem com seu encéfalo conservado, e não descerebrados, nos possibilita hipotetizar essas conexões existentes nesse modelo.

### 5.2- Ratos hipertensos-SHRs

Diversos estudos na literatura trazem resultados sobre o RPE em indivíduos hipertensos, e na maioria deles, em humanos ou animais, os resultados nos mostram uma resposta exacerbada de PAM e FC durante a prática de um exercício físico, ou contração muscular esquelética.

Segundo Mitchell (2017), a hiperreatividade dos indivíduos hipertensos se dá por dois principais fatores: um mecanorreflexo e metaborreflexo exacerbados e a simpatólise funcional danificada. Simpatólise funcional corresponde à acentuada redução da vasoconstrição na musculatura esquelética exercitada, facilitando a perfusão sanguínea durante a situação de exercício

Smith et.al. (2006) pioneiramente mostrou, através de contrações musculares em ratos pela estimulação da raiz ventral, que o RPE em ratos hipertensos realmente estava aumentado, e independentemente do aumento da ANS, pois em um grupo experimental ele promoveu denervação carotídea e bloqueio ganglionar, ou seja, não houve aferências de barorreceptores nem do SNC nas respostas exacerbadas de PAM e FC. Wang et.al. (2010) também nos mostrou um RPE aumentado em ratos com insuficiência cardíaca, em relação aos ratos normotensos, e atribuiu isso principalmente à maior neurotransmissãoglutamatérgica na CIL. Liang et.al. (2016) promoveram a estimulação elétrica da região locomotora mesencefálica de ratos normotensos (locomoção fictícia) e hipertensos, e mesmo com denervação aórtica, os ratos SHR obtiveram uma resposta mais exacerbada de parâmetros cardiovasculares do que os ratos normotensos. Vongpatanasin e colaboradores (2011) realizaram a mensuração da ANS em indivíduos humanos acordados, hipertensos, e chegaram em conclusões semelhantes.

Nossos resultados não trazem um RPE exacerbado nos SHR, em comparação aos parâmetros e valores trazidos por outros trabalhos da área. Algumas peculiaridades metodológicas podem ter contribuído para os resultados encontrados. Smith et.al. (2006) e diversos outros trabalhos (Mizuno et.al., 2015; Downey et.al., 2017; Mizuno et.al., 2016) utilizaram ratos e procedimentos de contração semelhante a esse protocolo, entretanto não utilizaram procedimentos anestésicos, e sim o método de descerebração (a fim de excluir as terminações de dor no tálamo dos animais). Além disso, alguns trabalhos trazem a estimulação realizada direto na raiz ventral, e não no nervo tibial (nervo misto).

Esses fatores podem ter corroborado com a não ocorrência de uma resposta exacerbada nos ratos hipertensos. Mesmo assim, foi observada uma diminuição bastante notável na variação de PAM antes e após o bloqueio do RVLM com o KYN, e uma tendência a também haver essa diminuição na resposta taquicárdica, o que possivelmente é algo explicado pela mesma via dos ratos normotensos: uma diminuição da ANS durante a CME pela EENT.

Nos ratos SHR, não observamos diferenças no FSR e CVR durante a CME pela EENT. Após o bloqueio, também não observamos diferença de fluxo ou

condutância na artéria renal, fato que também pode ser interpretado devido a outras vias de ativação nervosa simpática que independem do RVLM. É possível também que tenha havido alterações no controle da ANS dos animais hipertensos devido ao estado anestesiado, da mesma forma que não houve uma exacerbação de resultados pressóricos e taquicárdicos.

As respostas de fluxo sanguíneo e condutância vascular aórtica em SHR não são conclusivas. Durante a EENT, existe uma tendência a aumento de FSA, apesar dos resultados não demonstrarem diferença estatística. A CVA se mantém, provavelmente pelo fato da PAM se elevar juntamente ao FSA no momento da estimulação. Após a inativação do RVLM direito, o padrão de resposta de FSA e CVA se mantém próximo aos valores basais, não demonstrando alterações.

Um dos motivos que podem ter corroborado para a manutenção dos valores do fluxo e condutância, apesar do RPE estar sendo evocado, seria por particularidades teciduais dos indivíduos hipertensos, como disfunções endoteliais na produção de agentes vasodilatadores, como o NO (Smith et.al., 2015. Berenviova et.al.2018).

O NO é uma importante e potente substância vasodilatadora, presente no endotélio da musculatura lisa dos vasos, entre outros locais (Wang et.al.,2011. Wang et.al., 2015). Na hipertensão essencial ou neurogênica, observa-se disfunções endoteliais, envolvendo a síntese de NO, entre outras, além da alteração de outros mecanismos fisiológicos, como da simpatólise funcional. Nossa hipótese foi que esses dois principais fatores estariam dificultando o relaxamento aórtico que proporciona o aumento de FS nos membros, no RPE. Pensando nisso, realizamos então o tratamento de 2 semanas com SHRs com o fármaco Cloridrato de Nebivolol, um Beta-bloqueador de 3ª classe que auxilia na disponibilização de ON endotelial.

### 5.3 Tratamento de Ratos hipertensos-SHRs com o Cloridrato de Nebivolol

O NBL é um bloqueador seletivo beta1-adrenérgico, que diferentemente de outros Beta bloqueadores seletivos, como Atenolol, Metoprolol, Esmolol, ou não seletivos, como Propanolol, age não somente nos receptores do coração, mas também atua no sistema cardiovascular periférico, atuando como um doador de

NOaos vasos, aumentando sua vasodilatação (Wang et.al., 2009. Wang et.al., 2011. Wang et.al., 2015).

Partindo do princípio da disfunção endotelial dos animais hipertensos, submetemos os animais (N=7) a um tratamento de gavagem por 15 dias. Os resultados de variação de FS e CV nesses animais não foram conclusivos, uma vez que não foi observada diferença entre a vasodilatação aórtica e CVA nos animais tratados e controle (n=5) no RPE induzido pela EENT.

Apesar da dose ser a mesma utilizada em outros trabalhos da literatura (10mg/kg), o tempo de tratamento não pareceu ser suficiente para evocar respostas do fármaco no endotélio dos animais. Trabalhos mostram a ação do NBL em artérias de resistência e condutância, comprovando sua ação vasodilatadora in vivo ou em anéis isolados (Wang et.al., 2009. Wang et.al., 2011. Wang et.al., 2015. Rozec et.al.,2006). Entretanto, 15 dias de tratamento pareceram ser insuficientes para a verificação de resposta vasodilatadora, apesar de ser notável a ação Betabloqueadora seletiva, já que não observamos respostas taquicárdicas evocadas pelo RPE.

## 6 CONCLUSÃO

Esse trabalho trouxe a caracterização pela primeira vez, nesse modelo de estimulação do RPE, as respostas de FSA, FSR, CVA e CVR em ratos normotensos e espontaneamente hipertensos.

Em animais WISTAR, o RPE evocado pela EENT causa um padrão de vasodilatação aórtica e vasoconstrição renal. Através do bloqueio contralateral do RVLM nos animais, podemos concluir que esse núcleo tem participação nessas respostasocasionadas pelo RPE, mas não participação total, tendo o seu bloqueio contribuído apenas na redução das respostas PAM, FC, FSA e CVA.

Em animais SHR, apesar de observarmos uma leve vasoconstrição renal, não observou-se vasodilatação aórtica, evocada no RPE pela EENT. O RVLM mostrou ter participação parcial das respostas evocadas pelo RPE, uma vez que o bloqueio contralateral foi capaz de reduzir as respostas de PAM e FC em animais hipertensos, mas não promoveram nenhum tipo de alteração nos FS ou CV avaliados.

Além disso, podemos concluir que a tentativa de melhorar a CVA em animais hipertensoscom o tratamento de 15 dias em SHR com o doador de NO e Beta-bloqueador seletivo Cloridrato de Nebivolol (10mg/kg) não foi suficiente, pois não promoveu alterações de FS ou CV no leito aórtico, durante o RPE pela EENT. Possivelmente, o tratamento foi curto para promover mudanças no metabolismo endotelial desses animais. Um tratamento mais longo seria mais adequado para tirarmos melhores conclusões.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ALLY A, Maher TJ. Transient middle cerebral artery occlusion and reperfusion alters inducible NOS expression within the ventrolateral medulla and modulates cardiovascular function during static exercise. **Canadian Journal of Physilogy and Pharmacology**, 2011.639-46.

ALLY A. Ventrolateral medullary control of cardiovascular activity during muscle contraction. Neuroscience and Biobehavioral Reviews, 1998. 65–86

BAUER RM, Iwamoto GA, Waldrop TG.**Ventrolateral medullary neurons modulate pressor reflex to muscular contraction.** American Journal of Physiology. 1989

BERENYIOVAA, Dovinova I, Kvandova M, Kristek F, Jansen E, Majzunova M, Cacanyiova S. The Effect of Chronic NO Synthase Inhibition on the Vasoactive and Structural Properties of Thoracic Aorta, NO Synthase Activity, and Oxidative Stress Biomarkers in Young SHR.<u>OxidMedCellLongev</u>, 2018.

BRUM PC, Da Silva GJ, Moreira ED, Ida F, Negrão CE, Krieger EM. Exercise trainig increases baroreceptor gain sensitivity in normal and hypertensive rats. Hypertension, 2000. 1018-22.

BURKE M, Pabbidi M, Fan F, Ge Y, Liu R, Williams JM, Sarkis A, Lazar J, JacobHJ, RomanRJ.Genetic basis ofthe impaired renal myogenic response in FHH rats. AmericanJournalOfPhysiology: Renal Physiol. 2013.

CHAN KW, Chan YS, Wong TM. Electrophysiological properties of neurons in the rostral ventrolateral medulla of normotensive and spontaneously hypertensive rats. Brain Research, 1991.118-26.

CHEN Q, Toney GM. In Vivo Discharge Properties of Hypothalamic Paraventricular Nucleus Neurons With Axonal Projections to the Rostral Ventrolateral Medulla. Journal of Neurophysiology, 2010. Jan; 103(1): 4–15.

CHIDA K, ladecola C, Reis DJ.Lesions of rostral ventrolateral medulla abolish some cardio and cerebrovascular components of the cerebellar fastigialpressor and depressor responses<sup>-</sup> Brain Research, 1990. 508(1):93-104.

CHIDA K, Miyagawa M, Kawamura H, Takasu T. Effects of chemical stimulation of the rostral ventrolateral medulla on cerebral and renal microcirculation in spontaneously hypertensive rats. Journal of the autonomic nervous system,1998. (1-2):51-5.

COOTE JH.**A role for the paraventricular nucleus of the hypothalamus in the autonomic control of heart and kidney**.Experimental Physiology, SymposiumReport, 2004. 169–173

CRAVO SL, Rosa DA, Kalassa F, Korim WS, Hinrichs JM, Ferreira-Neto ML, Di Mônaco LR, Pedrino GR. Os núcleos vasomotores do bulbo e a regulação cardiovascular: novas evidências e novas questões. Medicina (Ribeirao Preto. Online), 2006. 89-100.

CRAVO SL, Possas OS, Ferreira-Neto ML.**Rostral ventrolateral medulla:** an integrative site for muscle vasodilation during defense-alerting reactions. Cellular and Molecular Neurobiology, 2003.Vol. 23, Nos. 4/5.

CUI J, Blaha C, Moradkhan R, Gray K S, SinowayLI. Muscle sympathetic nerve activity responses to dynamic passive muscle stretch in humans. **Journal Physiology.** 2006. 625-34.

CUI J, Leuenberger UA, Blaha C, King NC, Sinowa LI. Effect of P2 receptor blockade with pyridoxine on sympathetic response to exercise pressor reflex in humans. **Journal Physiology**, 2011.685-95.

DEMPSEY B, Le S, Turner A, Bokiniec P, Ramadas R, BjaalieJGMenuetC, NeveR, AllenAM., Goodchild, AK, McMullan S<sup>-</sup> Mapping and Analysis of the Connectome of Sympathetic Premotor Neurons in the Rostral Ventrolateral Medulla of the Rat Using a Volumetric Brain Atlas. Front Neural Circuits, 2017; 11: 9.

DICKERSON LW, PanicoWH, Kuhn FE, Willis AC, Fitzgerald JF, Meyer EL, Norman WP, Gillis RA. Stimulation of dog RVLM and A5 area changes sympathetic outflow to vascular beds without effect on the heart. **American Journal Physiology**,1997.R821-39.

DOMBROWSKIMD, Mueller PJ. Sedentary conditions and enhanced responses to GABA in the RVLM: role of the contralateral RVLM. **American Journal of Physiology: Regulatory, Integrative and comparative physiology**, 2017. R158-R168.

DOWNEYRM , Mizuno M , Mitchell JH. , Vongpatanasin W, Smith SA. Mineralocorticoid receptor antagonists attenuate exaggerated exercise pressor reflex responses in hypertensive rats. **American Journal of Physiology**. Heart and Circulatory Physiology, 2017.H788-H794 FADEL PJ. Reflex control of the circulation during exercise. **Scandinavian Journal** of Medicine and Science in Sports, 2015. 74–82

FAN F, Pabbidi MR, Ge Y, Li L, Wang S, Mims PN, Roman RJ. Knockdown of Add3 impairs the myogenic response of renal afferent arterioles and middle cerebral arteries. **American Journal Of Physiology: Renal Physiol**. 2017

GALLAGHER, KM, Fadel PJ, Smith SA, Strømstad M, Ide K, Secher NH, Raven PB. The interaction of central command and the exercise pressor reflex in mediating baroreflex resetting during exercise in humans. **Experimental Physiology.** 2006. 79-87.

GUYENET PG. The sympathetic control of blood pressure. Nature reviews. Neuroscience, 2006.335-46.

HARMS JE, Copp SW, Kaufman MP. Low-frequency stimulation of group III and IV hind limb afferents evokes reflex pressor responses in decerebrate rats. Physiology Reports, 2016.

HASELTON JR, Vari RC. Neuronal cell bodies in paraventricular nucleus affect renal hemodynamics and excretion via the renal nerves. **American Physiology Society**, 1998.

JOYCE W, White DW, Raven PB, Wang T. Weighing the evidence for using vascular conductance, not resistance, in comparative cardiovascular physiology. **Journal of Experimental Biology**, 2019.

JOYNERMJ. Baroreceptor function during exercise: **resetting the record. Experimental Physiology**, 2006.27-36.

KOBA S, Hanai E, Kumada N, Kataoka N, Nakamura K, Watanabe T. Sympathoexcitation by hypothalamic paraventricular nucleus neurons projecting to the rostral ventrolateral medulla. **The Journal of Physiology**, 2018.

KOBA S, Xing J, Sinoway LI, and Li J. Differential sympathetic outflow elicited by active muscle in rats, 2007. American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology. 2007. H2335-43

KOEPPEN BM, Stanton BA. Berne e Levy Fisiologia. Elsevier Editora Ltda. 6<sup>a</sup> edição. 331-335.

LANGNERE,LemieszekMK, KwiecieńJM, Rajtar G, Rzeski W, Turski WA. Kynurenic Acid Protects against Thioacetamide-Induced Liver Injury in Rats.Neurochemistry Research, 2017. 42(3): 838–845.

LATERZA MC, Amaro G, Negrão CE, Rondon MUPB. Exercício Físico Regular e Controle Autonômico na Hipertensão Arterial. **Revista SOCERJ**, 2008;21(5):320-328

LEAL AK, Willians MA, Garry MG, Mitchell JH, Smith SA.Evidence for functional alterations in the skeletal muscle mechanoreflex and metaboreflex in hypertensive rats. **American Journal of Physiology.** Heart and Circulatory Physiology, 2008.H1429-38.

LEAL AK, MitchellJH, Smith SA, Treatment of muscle mechanoreflex dysfunction in hypertension: effects of L-arginine dialysis in the nucleus tractussolitarii. **Experimental Physiology**, 2013.1337–1348.

LIANGN, Mitchell JH, Smith SA, MizunoM.Exaggerated sympathetic and cardiovascular responses to stimulation of the mesencephaliclocomotor region in spontaneously hypertensive rats.**American Journal of Physiology**.Heart and Circulatory Physiology, 2016.H123–H131.

LOUTZENHISER R, Griffin K, Williamson G, Bidani A. Renal Autoregulation: New Perspectives Regarding the Protective and Regulatory Roles of the Underlying Mechanisms. **American Journal Of Physiology: Regulatory, Integrative and Comparative.** 2006.

MCARDLLE WD, Katch FI, Katch VL. **Fisiologia do Exercício, nutrição, energia e desempenho humano.** Guanabara Koogan, 7<sup>a</sup> edição. 333-62.

MICHELINI LC, O'Leary DS, Raven PB, Nóbrega ACL. Neural control of circulation and exercise: a translational approach disclosing interactions between central command, arterial baroreflex, and muscle metaboreflex. **American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology**, 2015<u>.</u>H381–H392.

MICHELINI LC. Fisiologia Cardiovascular. In:. Aires MM. **Fisiologia**. Guanabara Koogan. 3<sup>a</sup> edição.Rio de Janeiro, 2008.375-93.

MITCHELLJH, Abnormal cardiovascular response to exercise in hypertension: contribution of neural factors. American Journal of Physiology: Regulatory, Integrative and comparative physiology, 2017. R851-R863

MIZUNO M , Iwamoto GA. , VongpatanasinW, Mitchell JH, Smith SA. Dynamic exercise training prevents exercise pressor reflex overactivity in spontaneously

hypertensive rats. **American Journal of Physiology**. Heart and Circulatory Physiology, 2015. H762-70.

MIZUNOM, Murphy MN, Mitchell JH, Smith SA. Skeletal muscle reflex-mediated changes in sympathetic nerve activity are abnormal in spontaneously hypertensive rats. American Journal of Physiology: Regulatory, Integrative and comparative physiology, 2011. H968-77.

MIZUNO M. Mitchell JH, Crawford S, Huang C, Maalouf N, Hu M, Moe OW, Smith SA, Vongpatanasin W. High dietary phosphate intake induces hypertension and augments exercise pressor reflex function in rats. **American Journal of Physiology: Regulatory, Integrative and comparative physiology**, 2016. R39–R48.

PARFENOV V, Ostrumova OD, Ostroumova TM, Kochetkov AI, Khakimova GR, Epstein OI. Vascular cognitive impairment: pathophysiological mechanisms, insights into structural basis, and perspectives in specific treatments.**Neuropsychiatry Diseases Treatment**, 2019

PERKINS MN, Stone TW. An iontophoretic investigation of the actions of convulsantkynurenines and their interaction with the endogenous excitant quinolinic acid.Brain Research, 1982. Vol 247, 184-187.

POSSAS OS, Lopes OU, Cravo SL.Glutamatergic and GABAergic inputs to the RVL mediate cardiovascular adjustments to noxious stimulation. **Regulatory And Integrative Physiology**, 2001.

POTTS JT. EXERCISE AND SENSORY INTEGRATION.Role of the nucleus tractussolitaries.Annals of the New York Academy of Sciences, 2001. 221-36

ROZECB, QuangTT,Noireaud J, GauthierC.Mixed  $\beta_3$ -adrenoceptor agonist and  $\alpha_1$ adrenoceptor antagonist properties of nebivolol in rat thoracic aorta. **British Journal** of Pharmacology. 2006.

SECHER NH, <u>Amann M</u>.**Human investigations into the exercise pressor reflex.**Experimental Physiology, 2011.

SMITHSA, Mitchell<u>JH</u>, Garr MG. Electrically induced static exercise elicits a pressor response in the decerebrate rat. **Journal Physiology**, 2001. 537;961-970.

SMITH SA, Willians MA, Leal AK, MitchellJH, Garry MG. Exercise pressor reflex function is altered in spontaneously hypertensive rats. **Journal of Physiology**, 2006.1009-1020.

SMITH SA, Leal AK, Murphy MN, Downey RM, MizunoM. **Muscle mechanoreflexoveractivity in hypertension: a role for centrally-derived nitric oxid.**Autonomic Neuroscience, 2015.58–63.

SPRANGER MD, Krishnan AC, Levy PD, O'Leary DS, Smith SA. Blood flow restriction training and the exercise pressor reflex: a call for concern. **American Journal of Physiology.** Heart and Circulatory Physiology, 2015, H1440-52

VITECEKJ, Lojek A, Valacchi G, Kubala L. Arginine-Based Inhibitors of Nitric Oxide Synthase: Therapeutic Potential and Challenges. **MediatorsInflammatory**. 2012

VONGPATANASIN W, Wang Z, Arbique D, Arbique G, Adams-Huet B, Mitchell JH, Victor RG, Thomas GD. Functional sympatholysis is impaired in hypertensive humans. **Journal of Physiology**, 2011. 589: 1209–1220

WANG HJ, Cahoon R, Cahoon EB, Zheng H, Patel KP, Zucker IH. Glutamatergic receptor dysfunction in spinal cord contributes to the exaggerated exercise pressor reflex in heart failure, **American Journal of Physiology**. Heart and circulatory physiology. 2014. 447-455.

WANG HJ, Wang W, Patel KP, Rozanski GJ, Zucker IH. Spinal cord GABA receptors modulate the exercise pressor reflex in decerebrate rats. **American J Physiology.**Regulation Integration Comparative Physiology.2013.

WANG W, Zou Z, Tan X, Zhang R, Ren C, Yao X, Li C, Wang W, Shi X. Enhancement in Tonically Active Glutamatergic Inputs to the Rostral Ventrolateral Medulla Contributes to Neuropathic Pain-Induced High Blood Pressure. **Neural Plasticity**, 2017.

WANG Y, Zhang MS, Liu Y, Li J, Song EF, Niu LG, Cheng NL. Neither Kb Channels Nor PI3K/Akt Mediates the Vasodilative Effect of Nebivolol on Different Types of Rat Arteries. **Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics**. 2009

WANG Y, Zhang MS, Liu Y. Nebivolol treatment improves resistant arterial function and reduces ventricular hypertrophy and angiotensin II in spontaneously hypertension rats. **Journal of the Renin-Angiotensin Aldosterone System**, 2015. 146–155

WANG Y, Zhang MS, Liu YF, Liu Y, Chen M.The effect of nebivolol on asymmetric dimethylarginine system in spontaneously hypertension rats.**Vascular Pharmacology**, 2011.36–43.

WILSON LB, Hand GA. The pressor reflex evoked by static contraction: neurochemistry at the site of the first synapse. **Brain Research Reviews**, 1997. 196–209

XU B, Zheng H, Liu X, Patel KP. Activation of afferent renal nerves modulates RVLMprojecting PVN neurons. **American Journal of Physiology**.Heart and Circulatory Physiology, 2015.H1103-11.

YARDLEY CP, Hilton SM. Vasodilatation in hind-limb skeletal muscle evoked as part of the defence reaction in the rat. **Journal of the autonomic nervous system**. 1987. 127-36.

# Anexo

Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA- UFG)



#### MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOLÁS PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA



## **CERTIFICADO**

Certificamos que a proposta intitulada Participação dos núcleos vasomotores do bulbo nos ajustes cardiovasculares induzidos pela contração do músculo esquelético de ratos, registrada com o protocolo nº 033/18, sob a responsabilidade de Daniel Alves Rosa que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Universidade Federal de Goiás (UFG), em reunião de 09/07/2018.

- Finalidade: () Ensino (X) Pesquisa Científica
- Vigência da autorização (início e fim): 01/07/2018 a 31/07/2021
- Espécie/linhagem/raça: Rato/Wistar
- Nº de animais autorizados: 120
- Peso/Idade: 250 g a 350 g
- Sexo: Macho
- Origem (fornecedor): Biotério Central/UFG

Dra. Marina Pacheco Miguel Coordenadora da CEUA/PRPI/UFG