

CONTROLE NEURAL DA CIRCULAÇÃO

Laboratório de Fisiologia Cardiovascular

Prof. Dr. Benedito H. Machado

Josiane de Campos Cruz

Leni G. H. Bonagamba

Luciano Gonçalves Fernandes

Vagner Roberto Antunes

INTRODUÇÃO

O sistema circulatório desempenha uma função extremamente importante na manutenção da homeostasia do meio interno, pois deve proporcionar a todas as células do organismo as condições ideais para o seu metabolismo, como por exemplo garantindo o aporte adequado de nutrientes e oxigênio às demandas metabólicas de todos os tecidos do organismo. Para exercer esta função, o sistema cardiovascular é dotado de sistemas sensoriais aferentes que informam ao sistema nervoso central sobre o estado geral da circulação. A partir destas informações aferentes, o sistema nervoso central altera a atividade eferente simpática e parassimpática, com a finalidade de manter a atividade normal do sistema cardiovascular. Dentre os sistemas aferentes que atuam no controle ao curto prazo da pressão arterial (PA), os mais estudados são os barorreceptores arteriais, quimiorreceptores periféricos e os receptores cardiopulmonares (Bezold-Jarish).

Em situações de elevações da PA, os barorreceptores arteriais (inseridos nas paredes vasculares da aorta e das carótidas) despolarizam-se e os potenciais de ação são transmitidos para o sistema nervoso central (SNC) por meio de suas aferências. Após o processamento destas informações no SNC, são promovidos ajustes autonômicos simpático e parassimpático, no sentido de normalizar a pressão arterial em níveis adequados à perfusão dos diferentes órgãos e tecidos.

As aferências dos barorreceptores arteriais, bem como dos quimiorreceptores periféricos e dos receptores cardiopulmonares, fazem as suas primeiras sinapses no *núcleo do trato solitário* (NTS), localizado no tronco cerebral (Palkovitz e Záborszky, 1977). A partir do NTS, neurônios projetam-se para outras estruturas bulbares, tais como a área bulbar ventrolateral rostral (RVLM), área bulbar ventrolateral caudal

(CVLM) (Urbansky e Sapru, 1988) e núcleo ambíguo (Stuesse e Fish, 1984), as quais são responsáveis pela geração da atividade autonômica.

A ativação dos barorreceptores promove respostas de hipotensão e bradicardia através da excitação de duas vias neurais distintas. A via neural responsável pela resposta hipotensora é uma projeção excitatória do NTS para o CVLM, essa por sua vez, quando ativada promove a inibição dos neurônios do RVLM, os quais apresentam atividade espontânea e são os responsáveis pela geração da atividade eferente simpática. Esta via neural é chamada de via *simpato-inibitória* (Urbansky e Sapru, 1988; Guyenet, 1990). A outra via neural ativada pelos barorreceptores e que é responsável pela bradicardia, é uma projeção excitatória do NTS para o Núcleo Ambíguo, no qual estão localizados os neurônios pré-ganglionares parassimpáticos vagais que inervam as células do marcapasso cardíaco. Portanto, a ativação desta via parassimpato-excitatória promove a hiperpolarização das células do marcapasso cardíaco e, conseqüentemente, bradicardia. (Verberne e Guyenet, 1992). Em relação às vias neurais dos receptores cardiopulmonares (reflexo Bezold-Jarisch), acredita-se que elas sejam as mesmas do barorreflexo (Verberne e Guyenet, 1992), pois a ativação do reflexo Bezold-Jarisch também promove hipotensão e bradicardia.

Diversas evidências experimentais sugerem que as vias neurais ativadas pela excitação dos quimiorreceptores periféricos envolvem uma projeção direta do NTS para o RVLM (via simpato-excitatória), a qual promove resposta pressora (Urbansky e Sapru, 1988), enquanto que outra via neural ativada pelos quimiorreceptores periféricos envolve uma projeção do NTS para o núcleo ambíguo, promovendo uma resposta de bradicardia (parassimpato-excitatória)

Vários estudos têm sido feitos no sentido de se caracterizar os neurotransmissores envolvidos nas sinapses das vias neurais dos diferentes reflexos cardiovasculares no NTS (Van Giersbergen e cols., 1992). Um dos mais estudados neurotransmissores envolvido nas vias aferentes cardiovasculares é o L-glutamato, um aminoácido excitatório. Estudos de Talman e cols. (1980), mostraram que a microinjeção do L-glutamato no NTS de ratos anestesiados promove respostas semelhantes aquelas quando da ativação dos barorreceptores (hipotensão e bradicardia), sugerindo então que o L-glutamato seria o neurotransmissor liberado pelos aferentes barorreceptores no NTS. Entretanto estudos do nosso laboratório (Machado e Bonagamba, 1992; Colombari e cols., 1994), mostraram que a

microinjeção de L-glutamato no NTS de ratos não anestesiados promove respostas semelhantes aquelas quando da ativação dos quimiorreceptores (hipotensão e bradicardia). Esses trabalhos sugerem então que os anestésicos teriam uma grande influência nas vias neurais ativadas pelo L-glutamato no NTS.

Recentemente vários estudos tem sido realizados no nosso laboratório (Haibara e cols., 1995, 1999; Chianca-Jr e Machado, 1996; Colombari e cols., 1997; Callera e cols., 1999) no sentido de determinarmos não somente a participação do L-glutamato, mas também das diferentes subunidades dos receptores deste aminoácido-excitatório (Frigerio e cols, 2002; Canesin, 2002). É importante ressaltar que a ativação dos reflexos cardiovasculares pode envolver a liberação no NTS de neurotransmissores outros que não apenas o L-glutamato (Machado, 2001).

OBJETIVOS DA AULA PRÁTICA:

- Avaliar as alterações cardiovasculares promovidas pela microinjeção do aminoácido excitatório L-glutamato no NTS de ratos anestesiados e não-anestesiados;
- Estudar a neurotransmissão das aferências dos barorreceptores, quimiorreceptores e receptores cardiopulmonares no NTS.

MATERIAL E MÉTODOS

1 - Animais experimentais:

Ratos Wistar machos (290 - 310g).

2 - Registros Cardiovasculares:

2.1 - Canulação da artéria e veia femoral: No dia anterior ao dos registros os ratos serão anestesiados com tribromoetanol 2,5% (Aldrich Chemical Co. Inc., Milwaukee, USA) e as cânulas anteriormente preparadas a partir de tubos de polietileno PE-10 soldados a outro tubo de polietileno PE-50 serão implantadas e fixadas na veia (administração de drogas) e artéria (registros diretos da PA e FC) femoral. Antes do implante, as cânulas serão preenchidas com solução salina fisiológica (0,9%) e obstruídas na extremidade livre do PE-50 com pinos de metal. Após o implante as extremidades livre das cânulas serão dirigidas subcutaneamente

com o auxílio de um trocater, para a cintura escapular, onde serão exteriorizadas e fixadas com linha de sutura. O registro cardiovasculares serão realizados em ratos não anestesiados e antes do início dos registros as cânulas serão heparinizadas (heparina 2% em solução fisiológica) para evitar a formação de coágulos.

2.2.- Registros da Pressão Arterial (PA) e Frequência Cardíaca (FC): As cânulas arteriais serão conectadas a transdutores de pressão acoplados a um polígrafo (NARCO) que nos fornece o registro direto da PA pulsátil e da PA média. A partir do sinal da PA pulsátil a FC será quantificada através de um biotacômetro e também registrada no polígrafo.

3 - Técnica de microinjeção em animais não-anestesiados:

Os animais serão anestesiados com tribromoetanol 2,5% e posicionados em um aparelho estereotáxico, em seguida será submetido ao implante bilateral de cânulas-guia de aço inoxidável, dirigidas á região do NTS 3 a 4 dias antes dos experimentos de microinjeção. Estas cânulas-guia serão fixadas na cabeça do rato por meio de parafusos e resina acrílica. As microinjeções de drogas na região do NTS serão realizadas, por meio de agulhas injetoras conectadas à uma seringa Hamilton (1µL), em ratos não-anestesiados e com livre movimentação.

4 - Estimulação dos barorreceptores arteriais, quimiorreceptores e receptores cardiopulmonares:

Para a estimulação dos barorreceptores arteriais, será utilizada a injeção de fenilefrina (0,5 a 2 µg / Kg; i.v.) através de cânula venosa previamente implantada, com o objetivo de promover elevações de 30 a 50 mmHg na PA. Com relação aos quimiorreceptores periféricos, será utilizada a solução de cianeto de potássio [(KCN)40 µg/0,1 ml, i.v]. O KCN (i.v) vem sendo utilizado experimentalmente como uma substância capaz de promover à ativação das células quimiossensíveis, já que o mesmo atua inibindo a enzima citocromo-oxidase da cadeia respiratória, produzindo conseqüentemente uma hipóxia-citotóxica (Bao e cols., 1997; Barros e cols., 2002). Os receptores do reflexo Bezold-Jarisch com a

injeção intravenosa de serotonina [(5-HT) 1-3 μ g/ Kg], a qual promove a excitação dos receptores 5-HT₃ localizados nos receptores cardiopulmonares.

5 - Drogas utilizadas:

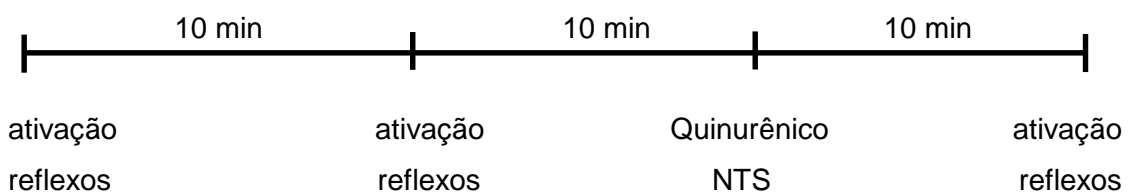
- L-glutamato (1 nmol/50 nl) - Aminoácido excitatório
- Ácido quinurênico (5 nmol/100 nl) - Antagonista glutamatérgico
- Fenilefrina (0,5-2,0 μ g/0,05 ml i.v.) - Agonista adrenérgico α 1
- Cianeto de potássio (KCN, 40 μ g/0,1 ml i.v.) - Ativação dos quimiorreceptores periféricos
- Serotonina (5-HT, 1-3 μ g/0,05 μ l i.v.)-Ativação dos receptores cardiopulmonares

PROTÓCOLOS EXPERIMENTAIS:

1) Efeito do bloqueio dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos sobre as alterações cardiovasculares promovidas pelo L-Glutamato microinjetado no NTS de ratos não-anestesiados:



2) Efeito do bloqueio dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos sobre as respostas cardiovasculares à ativação dos reflexos cardiovasculares (barorreflexo, quimiorreflexo e reflexo cardiopulmonar) de ratos não-anestesiados:



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AICHER, S.A; SARAVAY, R H.; CRAVO, S.; JESKE, I.; MORRISON, S. F.; REIS, D. J. MILNER, T. A. Monosynaptic projections from the nucleus tractus solitarii to C1 adrenergic neurons in the rostral ventrolateral medulla: Comparison with input from the caudal ventrolateral medulla. **The Journal of Comparative Neurology** 373:62-75, 1996.
- BARROS, R. C. H.; BONAGAMBA, L. G. H.; OKAMOTO-CANESIN, R; OLIVEIRA, M; BRANCO, L.G.S.; MACHADO, B. H. Cardiovascular response to chemoreflex activation with potassium cyanide or hypoxic hypoxia in awake rats. **Autonomic Neuroscience Basic and Clinical** 339, 2002.
- BAO, G.; RANDHAWA, P. M.; FLETCHER, E. C. Acute blood pressure elevation during repetitive hypocapnic and eucapnic hypoxia in rats. **J. Appl. Physiol** 82 (4): 1071-1078, 1997.
- CALLERA, J.C, BONAGAMBA, L. G. H.; NOSJEAN, A.; LAGUZZI, R.; MACHADO, B.H. (1999). Activation of GABA_A but not GABA_B receptors in the NTS blocked bradycardia of chemoreflex in awake rats. **American Journal Physiology**, 276 (*Heart Circ. Physiol.* 45) H1902-H1910.
- CANESIN, R. O. Imunorreatividade às subunidades dos receptores NMDA e AMPA no núcleo do trato solitário comissural lateral de ratos intactos. TESE de doutoramento. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 2002.
- CHIANCA-Jr, D.A e MACHADO, B.H. (1996). Microinjection of NMDA antagonist into the NTS of conscious rats blocks the Bezold-Jarisch reflex. **Brain Research** 718: 185-188.
- COLOMBARI, E; BONAGAMBA, L.G.H. e MACHADO, B.H. (1994). Mechanisms of pressor and bradycardic responses to L-glutamate microinjected into the NTS of conscious rats. **Am. J. Physiol. (Regulatory Integrative Physiology)** 266: R730-R738.
- COLOMBARI, E; BONAGAMBA, L.G.H. e MACHADO, B.H. (1997). NMDA receptor antagonist blocks the bradycardic but not the pressor response to L-glutamate microinjected into the NTS of unanesthetized rats. **Brain Research** 749 (2):209-213.
- FRANCHINI, K.G. e KRIEGER, E.M. (1993). Cardiovascular responses of conscious rats to carotid body chemoreceptor stimulation by intravenous KCN. **J. Auton. Nerv. System** 42: 63-70.

- FRIGERO, M.; BONAGAMBA, L.G.H. & MACHADO, B.H. The gain of the baroreflex bradycardia is reduced by microinjection of NMDA receptor antagonists into the nucleus tractus solitarii of awake rats. **J. Auton. Nerv. Syst.** 79:28-33, 2000.
- GUYENET, P.G. (1990). Role of the ventral medulla oblongata in blood pressure regulation. In: **Central Regulation of Autonomic Functions**. Edited by Loewy, A.D e Spyer, K.M, New York, Oxford University Press, pp.145-167.
- HAIBARA, A.S; COLOMBARI, E; CHIANCA-Jr, D.A; BONAGAMBA, L.G.H. e MACHADO, B.H. (1995). NMDA receptors in NTS are involved in bradycardic but not in pressor response of chemoreflex. **Am. J. Physiol. (Heart Circulatory Physiology)** 269: H1421-H1427.
- HAIBARA, A. S., BONAGAMBA, L. G. H.; MACHADO, B.H.. Sympathoexcitatory neurotransmission of the chemoreflex in NTS of awake rats. **American Journal Physiology**, 276:1; R69-80, 1999.
- MACHADO, B. H. Neurotransmission of the cardiovascular reflexes in the nucleus tractus solitarii of awake rats. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** 940:179-96. 2001.
- PALKOVITS, M. e ZABORSKY, L. (1977). Neuroanatomy of central cardiovascular control. Nucleus tractus solitarii: afferent and efferent neuronal connections in relation to the baroreceptor reflex arc. **Prog. Brain. Res.** 47:9-31.
- PATON JF, De PAULA PM, SPYER KM, MACHADO BH, BOSCAN P. Sensory afferent selectiverole of P2 receptors in the nucleus tractus solitarii for mediating the cardiac component of the peripheral chemoreceptor reflex in rats. **J. Physiol.** 15;543(Pt 3):995-1005, 2002.
- STUESSE, S.L. e FISH, S.E. (1984). Projections to the cardio-inhibitory region of the nucleus ambiguus of rat. **J. Comp. Neurol.** 229: 271-278.
- SUN, M.K.; YOUNG, B.S.; HACKETT, J.T. & GUYENET, P.G. Reticulospinal pacemaker neurons of the rat rostralventrolateral medulla wth putative sympatoexcitatory function: an intracellular study in vitro. **Brain Res.** 442:229-239, 1988.
- URBANSKI, R.W e SAPRU, H.N. (1988a). Evidence for a sympathoexcitatory pathway from the nucleus tractus solitarius to the ventrolateral medullary pressor área. **J. Auton. Nerv. System.** 23: 161-174.
- VAN GIERSBERGEN, P.L.M.; PALKOVITS, M e De JONG, W. (1992). Involvement of neurotransmitters in the nucleus tractus solitarii in cardiovascular regulation. **Physiol. Rev.** 72 (3):789-824.
- VERBERNE, J.M.A e GUYENET, P.G. (1992). Medullary pathway of the Bezold-Jarisch reflex in the rat. **Am. J. Physiol.** 32: R1195-R1202.