



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ERIC DIEGO TUROSSI AMORIM

**MODULAÇÃO CARDIOVASCULAR E AUTONÔMICA PELO
NÚCLEO PARAVENTRICULAR DO HIPOTÁLAMO
DURANTE O "HEAD DOWN TILT" EM RATOS NÃO
ANESTESIADOS**

ERIC DIEGO TUROSSI AMORIM

**MODULAÇÃO CARDIOVASCULAR E AUTONÔMICA PELO
NÚCLEO PARAVENTRICULAR DO HIPOTÁLAMO
DURANTE O "HEAD DOWN TILT" EM RATOS NÃO
ANESTESIADOS**

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Sociedade Brasileira de Fisiologia /Instituição Associada, Departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Estadual de Londrina, para obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientadora: Prof^a. Dra. Marli Cardoso Martins Pinge

Londrina
2015

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina.**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

A524m Amorim, Eric Diego Turossi.

Modulação cardiovascular e autonômica pelo núcleo paraventricular do hipotálamo durante o “Head Down Tilt” em ratos não anestesiados / Eric Diego Turossi Amorim. – Londrina, 2015.
60 f. : il.

Orientador: Marli Cardoso Martins Pinge.

Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, 2015.

Inclui bibliografia.

1. Sistema cardiovascular – Teses. 2. Pressão arterial – Teses. 3. Variabilidade do batimento cardíaco – Teses. 4. Hipotálamo – Teses. I. Pinge, Marli Cardoso Martins. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas. III. Sociedade Brasileira de Fisiologia. IV. Título.

CDU 612.1

ERIC DIEGO TUROSSI AMORIM

**MODULAÇÃO CARDIOVASCULAR E AUTÔNOMICA PELO NÚCLEO
PARAVENTRICULAR DO HIPOTÁLAMO DURANTE O "HEAD DOWN
TILT" EM RATOS NÃO ANESTESIADOS**

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Sociedade Brasileira de Fisiologia /Instituição Associada, Departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Estadual de Londrina, para obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dra. Marli Cardoso Martins Pinge
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof^o Dr. Rubens Fazan Júnior
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Prof^a Dra. Graziela Scaliante Ceravolo
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 19 de Fevereiro de 2015.

Dedico este trabalho à minha mãe (*in memoriam*) Geni e à minha tia-mãe Tuti (*in memoriam*) por terem me dado todo o amor e educação.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me guiado até aqui e por ter colocado minha orientadora em meu caminho, uma pessoa que além de ser uma grande profissional, é uma pessoa humana e que admiro muito.

Agradeço também (*in memoriam*) à minha mãe e minha tia Tuti, que infelizmente não puderam participar deste momento tão importante de minha vida. Mas a elas agradeço por terem me dado todo o amor e por terem me ensinado a não desistir de meus sonhos.

À minha irmã e minha avó por me apoiarem (mesmo sem nem entenderem direito o que faço).

Aos amigos Fábio, Robson, Vivian e José Fernando por serem meus companheiros e terem me ajudado bastante durante esta jornada. Pessoas que precisei muitas vezes e sempre estiveram comigo nas horas boas e ruins.

Gostaria de agradecer aos colegas de laboratório, principalmente ao Ozahyr que desde o início mostrou-se disposto a transmitir um pouco de seu conhecimento e à Karla Goessler pelas ajudas constantes com o Endnote.

À Deborah e Laira minhas companheiras de *fast food* e demais restaurantes.

Nossa maior fraqueza está em desistir. O caminho mais certo de vencer é tentar mais uma vez.

Thomas Edison

AMORIM, Eric Diego Turossi. **Modulação cardiovascular e autonômica pelo Núcleo Paraventricular do Hipotálamo durante o "Head Down Tilt" em ratos não anestesiados.** 2015. 60f. Dissertação (Mestrado Multicêntrico em Ciências Fisiológicas) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015.

RESUMO

A exposição à microgravidade leva a distúrbios autonômicos, vestibulares e alterações no sistema cardiovascular. O núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) é conhecido como um importante núcleo de integração de respostas autonômicas e cardiovasculares. O objetivo deste estudo foi avaliar as alterações cardiovasculares e autonômicas durante um protocolo agudo de *head down tilt* (HDT) e a participação do PVN na regulação destes parâmetros em ratos não anestesiados. Ratos Wistar foram anestesiados e submetidos à cirurgia para implante de cânulas guia direcionadas para o PVN e de 3 a 5 dias após a recuperação cirúrgica, foi realizada nova cirurgia para implante de cateteres de polietileno na artéria e veia femorais para o registro da pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC). O registro dos parâmetros cardiovasculares e modulação autonômica durante o HDT foi realizado 24 horas após a cateterização e os animais estavam sem o efeito de anestésicos. Durante o HDT, houve um aumento da pressão arterial média (PAM= 13 ± 1 mmHg) e redução da frequência cardíaca (FC= -28 ± 5 bpm). Ambas as alterações foram impedidas pelo bloqueio ganglionar e bloqueio muscarínico. A análise espectral mostrou um aumento da modulação simpática sobre a pressão arterial sistólica (PAS), enquanto houve redução da modulação simpática e aumento da parassimpática do intervalo de pulso (IP). O bloqueio ganglionar atenuou o aumento do componente simpático da PAS, já o bloqueio muscarínico impediu a queda do simpático e o aumento do parassimpático do IP. O bloqueio do PVN com muscimol reverteu a bradicardia e bloqueou a redução do simpático, bem como o aumento do parassimpático do IP. Nossos resultados sugerem o sistema nervoso autônomo participa das alterações cardiovasculares durante o HDT e que o PVN - principalmente através da via gabaérgica - participa das compensações cardiovasculares e autonômicas modulando especialmente as respostas cardíacas ao HDT.

Palavras-chave: Pressão arterial. Frequência cardíaca. Variabilidade. Microgravidade. Hipotálamo.

AMORIM, Eric Diego Turossi. **Cardiovascular and autonomic modulation by Paraventricular Nucleus of Hypothalamus during the “Head Down Tilt” in unanesthetized rats**. 2015. 60p. Dissertation (Master Multicentric in Physiological Science) - State University of Londrina, Londrina, 2015.

ABSTRACT

The exposure to microgravity induces autonomic and vestibular disorders as alterations in cardiovascular function. The paraventricular nucleus of the hypothalamus (PVN) is known as an important center for integrating autonomic and cardiovascular responses as blood volume reflexes. The acute effects promoted by microgravity and the PVN involvement in cardiovascular and autonomic parameters were not evaluated yet. The aim of this study was to evaluate the cardiovascular and autonomic changes during an acute protocol of head down tilt (HDT) and the participation of the PVN in the regulation of these parameters in unanesthetized rats. Male wistar rats were anesthetized to guide cannulae implantation to PVN. After 3 to 5 days of surgical recovery, femoral artery and vein catheters were implanted for direct recording of blood pressure (BP) and heart rate (HR) in conscious animals to evaluate cardiovascular and autonomic changes in an acute protocol of HDT in non-anesthetized rats. During HDT, there was an increase in mean arterial pressure (MAP) (13 ± 1 mmHg) and decrease in heart rate (HR) (-28 ± 5 bpm). Both changes were prevented by the ganglionic and muscarinic blockade. Spectral analysis of systolic arterial pressure (SAP) showed an increase in low frequency (LF) component. In addition, HDT induced a reduction in the LF and increase in high frequency (HF) component of the pulse interval (PI). The ganglionic blockade attenuated the increase of the sympathetic component of the SAP whereas the muscarinic blockade prevented the fall of the sympathetic and the parasympathetic increase in the PI. PVN inhibition with muscimol reversed bradycardia and blocked the reduction of the LF and HF increases in PI during HDT. Our results suggest that PVN participates in the cardiovascular compensation during HDT, especially modulating the cardiac responses.

Keywords: Arterial pressure. Heart rate. Variability. Microgravity. Hypothalamus.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** - Variação da Pressão Arterial Média (PAM) e da Frequência Cardíaca (FC) durante o HDT em animais acordados (n=8). *p<0,05 comparado ao basal (teste t pareado).33
- Figura 2** - Parâmetros espectrais da variância e da pressão arterial sistólica (PAS) após administração intravenosa (IV) de salina em ratos acordados e submetidos ao HDT. LF: faixa de baixa frequência absoluta *p<0,05 comparado ao basal. (teste t pareado).....34
- Figura 3** - Parâmetros espectrais do intervalo de pulso (IP) após administração intravenosa (IV) de salina em ratos acordados e submetidos ao HDT. LF: faixa de baixa frequência absoluta; HF: faixa de alta frequência absoluta; LFun: faixa de baixa frequência normalizada; HFun: faixa de alta frequência normalizada; LF/HF: razão entre LF e HF. *p<0,05 comparado ao basal (teste t pareado)..35
- Figura 4** - Variações de PAM e FC no grupo tratado com hexametônio ou atropina comparado ao grupo salina durante o HDT. *p<0,05 comparado ao contensor (test t pareado). #p<0,05 comparado ao salina (One-Way Anova).36
- Figura 5** - Parâmetros espectrais de pressão arterial sistólica (PAS) do grupo tratado com Hexametônio ou Atropina em comparação ao grupo salina no momento final do contensor e durante o pico do HDT. LF: faixa de baixa frequência absoluta. *p<0,05 comparado ao controle (One-Way Anova)....37
- Figura 6** - Parâmetros espectrais do intervalo de pulso (IP) no grupo tratado com Hexametônio ou Atropina em comparação ao grupo salina no momento final do contensor e durante o pico do HDT.....39
- Figura 7** - Confirmação histológica evidenciando os sítios de microinjeção bilateral no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN)40

Figura 8 -	Valores de Pressão Arterial Média (PAM) e Frequência Cardíaca (FC) no grupo tratado com Cloreto de Cobalto ou Muscimol em comparação ao grupo salina no momento final no contensor e durante o HDT em animais não anestesiados.....	42
Figura 9 -	Parâmetros espectrais de pressão arterial sistólica (PAS) do grupo tratado com Salina, Cloreto de Cobalto ou Muscimol em comparação ao grupo salina em ratos não anestesiados.	43
Figura 10 -	Parâmetros espectrais do intervalo de pulso (IP) no grupo tratado com Cloreto de Cobalto ou Muscimol em comparação com o grupo salina em ratos não anestesiados	45

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Valores de pressão arterial média (PAM - mmHg) e frequência cardíaca (FC - bpm) dos grupos experimentais pré e pós-droga.32
- Tabela 2** - Valores de pressão arterial média (PAM - mmHg) e frequência cardíaca (FC - bpm) dos grupos experimentais antes e após a administração dos tratamentos centrais.....41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADH	Hormônio Anti-Diurético
Ang II	Angiotensina II
CRF	Corticotrofina
DC	Débito Cardíaco
FC	Frequência Cardíaca
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GLU	Glutamato
HDT	<i>Head Down Tilt</i>
HF	Alta Frequência
IML	Intermediolateral
LF	Baixa Frequência
LF/HF	Balanço Simpato-Vagal
LHA	Área Hipotalâmica Lateral
NO	Óxido Nítrico
NTS	Núcleo do Trato Solitário
OT	Ocitocina
PA	Pressão Arterial
PAD	Pressão Arterial Diastólica
PAM	Pressão Arterial Média
PAP	Pressão Arterial Pulsátil
PVN	Núcleo Paraventricular do Hipotálamo
RVLM	Área rostroventrolateral do Bulbo
RVP	Resistência Vascular Periférica
SNA	Sistema Nervoso Autônomo
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Sistema Nervoso Parassimpático
SNS	Sistema Nervoso Simpático
VFC	Variabilidade da Frequência Cardíaca
VLf	Muito Baixa Frequência

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	CONTROLE DO SISTEMA CARDIOVASCULAR.....	14
1.2	NÚCLEO PARAVENTRICULAR DO HIPOTÁLAMO	16
1.3	ALTERAÇÕES CARDIOVASCULARES OCACIONADAS PELA EXPOSIÇÃO À MICROGRAVIDADE	18
1.4	ALTERAÇÕES HIPOTALÂMICAS DURANTE A MICROGRAVIDADE SIMULADA.....	20
2	OBJETIVOS	23
2.1	OBJETIVO GERAL	23
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
3	MATERIAIS E MÉTODOS	24
3.1	ANIMAIS	24
3.2	CATETERIZAÇÃO DA ARTÉRIA E VEIA FEMORAIS.....	24
3.3	REGISTRO DA PRESSÃO ARTERIAL E DA FREQUÊNCIA CARDÍACA	25
3.4	PROTOCOLO EXPERIMENTAL	26
3.4.1	Grupo Controle.....	26
3.4.2	Bloqueio Ganglionar.....	26
3.4.3	Bloqueio Muscarínico	27
3.5	MANOBRA ANTIORTOSTÁTICA.....	27
3.6	ANIMAIS	27
3.7	IMPLANTE DE CÂNULAS-GUIA DIRECIONADAS AO PVN	28
3.8	PROTOCOLO EXPERIMENTAL	29
3.8.1	Tratamento Farmacológico do PVN.	29
3.9	MARCAÇÃO FUNCIONAL DO PVN.....	29
3.10	MARCAÇÃO E HISTOLOGIA DO CÉREBRO.....	30
3.11	ANÁLISE ESPECTRAL DA VARIABILIDADE DA PAS E DA FC.....	30
3.12	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	31
4	RESULTADOS	32

4.1	VALORES BASAIS DE PRESSÃO ARTERIAL MÉDIA E FREQUÊNCIA CARDÍACA DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	32
4.2	EFEITOS CARDIOVASCULARES E AUTONÔMICOS APÓS ADMINISTRAÇÃO INTRAVENOSA DE SALINA DURANTE O HDT.....	33
4.3	EFEITOS SOBRE A PAM E FC APÓS ADMINISTRAÇÃO INTRAVENOSA DE HEXAMETÔNIO OU ATROPINA.....	36
4.4	EFEITOS SOBRE A VARIABILIDADE CARDIOVASCULAR APÓS ADMINISTRAÇÃO INTRAVENOSA DE HEXAMETÔNIO OU ATROPINA.....	37
4.4.1	Modulação Autonômica da Pressão Arterial Sistólica	37
4.4.2	Modulação Autonômica do Intervalo de Pulso	38
4.6	VALORES BASAIS DE PRESSÃO ARTERIAL MÉDIA E FREQUÊNCIA CARDÍACA DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	41
4.7	EFEITOS SOBRE A PAM E FC APÓS MICROINJEÇÃO DE CLORETO DE COBALTO OU MUSCIMOL NO PVN DURANTE O HDT.....	42
4.8	EFEITOS SOBRE A VARIABILIDADE CARDIOVASCULAR APÓS MICROINJEÇÃO DE SALINA, CLORETO DE COBALTO OU MUSCIMOL NO PVN DURANTE O HDT.	43
4.8.1	Modulação Autonômica da Pressão Arterial Sistólica pelo PVN.	43
4.8.2	Modulação Autonômica do Intervalo de Pulso pelo PVN.	44
5	DISCUSSÃO	46
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	51
	REFERÊNCIAS	52
	APÊNDICES	61
	APÊNDICE A – Artigo Submetido ao Journal of Neuroscience Research	62

1 INTRODUÇÃO

1.1 CONTROLE DO SISTEMA CARDIOVASCULAR

Os valores da pressão arterial (PA) variam consideravelmente momento a momento e especialmente durante a execução de comportamentos. Entretanto, graças ao sistema baroreflexo de controle da circulação através das aferências oriundas dos barorreceptores arteriais, a PA é mantida dentro de estreitos valores (Guyenet, 2006). Um dos principais papéis desse sistema em humanos é a manutenção dos níveis de PA após um desafio ortostático (Cooper e Hainsworth, 2002; Kamiya *et al.*, 2014).

O Sistema Nervoso Autônomo (SNA) desempenha um papel fundamental na manutenção da homeostase do organismo em condições normais ou de estresse agudo ou crônico (Kenney *et al.*, 2003) e atua de modo a compensar as alterações de pressão sanguínea que ocorrem durante uma mudança postural (Ten Harkel *et al.*, 1994; Bleasdale-Barr e Mathias, 1998; Iwase *et al.*, 2014).

O tônus cardíaco, gerado pelo sistema nervoso simpático (SNS) é gerado por descargas originadas em áreas específicas do tronco encefálico. Alguns dos grupamentos neuronais localizados nesta região do Sistema Nervoso Central (SNC), denominados neurônios pré-motores simpáticos, enviam projeções diretas para os neurônios pré-ganglionares simpáticos da coluna intermédio lateral da medula espinhal (IML) (Dampney, 1994). O SNS atua principalmente através dos receptores adrenérgicos β_1 aumentando o automatismo do nodo sinusal e a condução através do nodo atrioventricular, a excitabilidade do sistema His-Purkinje, a força de contração durante a sístole e a velocidade de relaxamento das células musculares cardíacas durante a sístole (Stoebner *et al.*, 2012). Por outro lado, a ativação do

sistema nervoso autônomo parassimpático (SNP) mediado pelos receptores muscarínicos via neurônios colinérgicos no gânglio cardíaco, origina-se também de núcleos bulbares, e leva à redução da atividade marca-passo do nodo sinusal e conseqüentemente reduz a frequência cardíaca (FC). Além disso, reduz a condução no nodo atrioventricular e a excitabilidade do sistema His-Purkinje (Mighiu e Heximer, 2012).

Diversas regiões do SNC participam da regulação da resistência vascular periférica (RVP), entre elas a área rostroventrolateral do bulbo (RVLM), área ventrolateral caudal (CVLM) e o núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) (Swanson e Kuypers, 1980; Dampney, 1994; Badoer, 2001). O estímulo do RVLM provoca vasoconstrição (Dampney *et al.*, 1985), enquanto o estímulo de áreas caudais e ventromediais do bulbo reduz a constrição dos vasos sanguíneos (Blessing e Li, 1989). As regiões centrais vasoconstritoras são ativas tonicamente e o estímulo dos terminais neurais libera norepinefrina que exerce efeito vasoconstritor através dos receptores α -adrenérgicos em vasos de resistência. Diferente do tônus cardíaco, a regulação neural da circulação periférica é mantida exclusivamente pelos impulsos nervosos simpáticos para os vasos periféricos, sendo que o parassimpático possui atividade somente em um pequeno número de vasos sanguíneos (Berne e Levy, 1998).

O controle da PA ocorre instantaneamente a partir da detecção das alterações de pressão sanguínea através dos barorreceptores arteriais. Os barorreceptores arteriais estão localizados no arco aórtico e no seio carotídeo e quando estimulados por alterações de tensão, transformam estas informações pressóricas em potenciais de ação, que chegam até o bulbo através de aferências dos nervos vago e glossofaríngeo. A ativação do reflexo barorreceptor pelos sinais

aferentes dos barorreceptores carotídeos, aórticos e do reflexo cardiopulmonar, é integrada no SNC, resultando na resposta eferente ao coração e vasos sanguíneos por ação do SNA (Dampney, 1994).

Os testes de ortostatismo em humanos - como a prancha de inclinação - promovem decréscimos no volume sanguíneo central e no débito cardíaco (DC), causando aumentos reflexos na FC e na RVP através da ativação das vias baroreflexas arteriais e cardiopulmonares, permitindo a manutenção da PA durante o desafio ortostático. Respostas autonômicas devido à ortostase parecem envolver um equilíbrio da atividade vagal cardíaca eferente e da atividade simpática para o coração e vasos sanguíneos (balanço simpato-vagal) (Bahjaoui-Bouhaddi et al., 2000; Jones et al., 2003). Assim, o aumento da FC com o "tilt" envolve a diminuição da atividade parassimpática e o aumento da atividade simpática para o coração.

1.2 NÚCLEO PARAVENTRICULAR DO HIPOTÁLAMO

Os neurônios parvocelulares estão localizados na região medial do PVN. Estes neurônios controlam a secreção do hormônio liberador de corticotrofina (CRF) no sangue porta hipofisário (Swanson e Sawchenko, 1983; Hamamura *et al.*, 1986), um importante hormônio regulador do estresse. A região parvocelular do PVN é composta de diversos neurotransmissores com múltiplas funções, sendo que os neurônios localizados na região dorsal e ventral do núcleo parvocelular projetam-se para outras regiões do SNC que participam do controle das funções autonômicas, como a RVLN e a coluna IML, onde estão localizados os neurônios motores pré-ganglionares (Swanson e Kuypers, 1980; Blair *et al.*, 1996; Badoer, 2001). Estas conexões podem desencadear alterações reflexas na atividade simpática que estão envolvidas na regulação cardiocirculatória (Dampney, 1994; Badoer, 2001) e por

isso o PVN foi denominado núcleo pré-motor simpático (Strack *et al.*, 1989; Dampney, 1994). O RVLM contém neurônios que se projetam diretamente para os neurônios pré-ganglionares simpáticos na medula espinhal tóraco-lombar. Esta região bulbar é extremamente importante para a regulação tônica da atividade simpática e para os reflexos cardiovasculares simpáticos (Dampney, 1994).

Estudos mostram que o PVN parece ser capaz de regular os componentes autonômicos a partir de neurônios onde impulsos para o sistema neurosecretor magnocelular facilmente afetam outros grupos celulares e, desta maneira, influenciam as respostas autonômicas e adenohipofisárias que agem de modo a liberar hormônios que produzem respostas viscerais integradas (Kuypers e Maisky, 1975; Swanson e Kuypers, 1980; Swanson e Sawchenko, 1983).

O PVN está envolvido também no controle central neurovegetativo e é a principal região de integração da função autonômica na manutenção da homeostase (Dampney, 1994; Badoer, 2001; Mueller *et al.*, 2003) e também no controle da PA (Martins-Pinge *et al.*, 2012). O PVN encontra-se localizado bilateralmente ao terceiro ventrículo e pode ser dividido em duas regiões principais compostas por neurônios magnocelulares e neurônios parvocelulares (Swanson e Sawchenko, 1983; Badoer, 2001). Os neurônios magnocelulares localizados nas porções laterais do PVN são responsáveis pela síntese e secreção de hormônios como a vasopressina (ADH) e ocitocina (OT), que são transportados através de axônios até a hipófise posterior, para então serem liberados na circulação. Através destes hormônios, se dá a participação do PVN no controle neuroendócrino (Swanson e Sawchenko, 1983; Blair *et al.*, 1996; Badoer, 2001). Além disso, estes hormônios também atuam regulando a função do sistema cardiovascular (Busnardo *et al.*, 2009).

Grande parte dos neurotransmissores presentes no SNC é encontrada no PVN, sendo o ácido gama-aminobutírico (GABA) (Zhang e Patel, 1998; Allen, 2002) e óxido nítrico (NO), mediadores inibitórios que influenciam respostas cardiovasculares, e o glutamato (GLU) (Bains e Ferguson, 1997) sendo um dos principais mediadores excitatórios da atividade simpática (Herman *et al.*, 2004; Mueller, Foley, *et al.*, 2006). Outro importante neurotransmissor que atua no PVN é a angiotensina II (Ang II), que exerce efeito excitatório sobre os neurônios desta região (Ambuhl *et al.*, 1992; Ferguson *et al.*, 2001).

1.3 ALTERAÇÕES CARDIOVASCULARES OCACIONADAS PELA EXPOSIÇÃO À MICROGRAVIDADE

Os organismos vivos, incluindo os humanos, são adaptados ao ambiente gravitacional da Terra (1g) (Hu *et al.*, 2014). Segundo Isaac Newton, gravidade é a atração entre duas massas, ou seja, é a força responsável por manter objetos na superfície da terra (Newton, 1756). Desta forma, a gravidade possui um papel fundamental na manutenção das funções fisiológicas em humanos (Hu *et al.*, 2014). Por outro lado, a microgravidade é a redução da gravidade normal (1g) para valores próximos de zero, também chamada de gravidade zero (Seedhouse, 2013).

A exposição à microgravidade durante voos espaciais ocasiona desordens autonômicas e vestibulares, assim como alterações no sistema cardiovascular. Estas reações são atribuídas às mudanças nas informações dos propriorreceptores, órgão vestibular e mecanorreceptores (barorreceptores e receptores de volume) que normalmente trabalham na manutenção do controle postural (Katafuchi *et al.*, 1984).

As características observadas pela exposição à microgravidade incluem perda da pressão gravitacional e baixa pressão venosa, perda de volume sanguíneo,

intolerância ortostática e reduzida capacidade de exercício. Muitas respostas de curto prazo à microgravidade se prolongam durante a exposição de longa duração e podem ser explicadas pela PA e pressão tecidual alterada. Os tecidos da parte inferior do corpo, por exemplo, são bem adaptados ao aumento de pressão local, enquanto tecidos superiores não se adaptam tão bem (Hargens e Watenpaugh, 1996).

A exposição à microgravidade remove os gradientes de PA que estão associadas à postura ereta, reduzindo a PA média (PAM) dos pés de cerca de 200 mmHg para 100 mmHg, o mesmo valor existente na aorta. Além disso, a pressão sanguínea das artérias intracranianas aumenta de 70 mmHg na postura ereta para aproximadamente 100 mmHg no ambiente microgravitacional (Hargens e Watenpaugh, 1996). Dessa forma, as alterações posturais ortostáticas e antiortostáticas produzem ajustes cardiovasculares completamente diferentes.

Efeitos semelhantes aos encontrados durante a exposição à microgravidade podem ser observados em pacientes que permanecem longos períodos acamados (Traon *et al.*, 1998; Traon *et al.*, 2007; Dyckman *et al.*, 2012; Arzeno *et al.*, 2013). Portanto, o estudo dos mecanismos adaptativos durante a microgravidade é bastante importante para tentarmos impedir ou tratar os efeitos patológicos observados após o retorno à gravidade normal.

Pesquisa realizada em humanos onde os indivíduos estudados permaneceram por 24 horas em “head down tilt” (HDT) (-5°), mostrou que houve uma significativa elevação da pressão venosa central, com aumento do volume no ventrículo esquerdo, mas sem alterações no DC ou PA. Além disso, houve alterações hemodinâmicas, as quais retornaram ao seu estado basal em até 6 horas (Blomqvist *et al.*, 1980). Outro trabalho realizado com humanos em HDT (-90°)

mostrou alterações da PAM em relação à posição supina (PAM= +22 mmHg), mas sem alterações significantes na FC. Neste mesmo estudo, durante o HDT houve redução do componente LF (baixa frequência) e do componente VLF (frequência muito baixa) (Geinas et al., 2012). Em outro estudo foi mostrado que durante o HDT (-90°) em humanos, há aumento do volume diastólico final do ventrículo esquerdo em 16% e redução de 12% do volume sistólico (Bundgaard-Nielsen et al., 2009).

A alteração postural em HDT tem como característica o aumento do volume sanguíneo para extremidades superiores, ocasionando aumento da pré-carga cardíaca. Também ocorre aumento da resistência vascular dos vasos cerebrais, indicando uma auto-regulação cerebral efetiva para compensar o aumento da PAM associado ao HDT (90°) (Geinas et al., 2012).

A maioria dos protocolos que simulam a microgravidade tem sido realizados em humanos durante exposição prolongada (Hargens e Watenpaugh, 1996) e poucos estudos foram realizados com modelos animais não anestesiados submetidos à microgravidade aguda (Katafuchi et al., 1984), além disso, nenhum avaliou os aspectos cardiovasculares e autonômicos observando o envolvimento do PVN durante o HDT. No entanto, de acordo com um estudo prévio (Katafuchi et al., 1987), durante a microgravidade é possível que o PVN module a função autonômica e a liberação de ADH durante a suspensão corporal.

1.4 ALTERAÇÕES HIPOTALÂMICAS DURANTE A MICROGRAVIDADE SIMULADA

O protocolo de suspensão corporal (HDT) é bastante usado como modelo experimental para simulação do ambiente de microgravidade (Katafuchi et al., 1984; Katafuchi et al., 1987). Katafuchi e colaboradores registraram a atividade neuronal do PVN de ratos durante o HDT agudo de 45° em ratos não anestesiados,

mostrando que durante o HDT, 38% dos neurônios do PVN tiveram a atividade alterada, sendo que 85% estavam com atividade diminuída e 15% aumentada, mostrando que a diminuição da atividade neuronal do PVN pode ser causada pela informação vinda dos barorreceptores, já que o HDT induz ao aumento do volume sanguíneo central e estimula os receptores de volume atriais e a atividade barorreflexa (Katafuchi et al., 1987).

Projeções sinápticas originadas da área hipotalâmica lateral (LHA) chegam aos neurônios pré-ganglionares autonômicos, núcleo motor dorsal do nervo vago e IML (Saper et al., 1976). No trabalho de Katafuchi e cols. foi estudada a atividade de 44 neurônios da LHA durante o HDT em ratos, dentre estes, 21 neurônios alteraram a frequência de disparo e 7 apresentaram atividade aumentada. Alterações na atividade da LHA provocadas pelo HDT, provavelmente são atribuídas às alterações nos sinais dos proprioceptores, por exemplo, receptores musculares e receptores articulares. Também é possível que a LHA receba influências de núcleos autonômicos e module os reflexos autonômicos envolvidos no reflexo vestibulo-autonômico, contribuindo para o desequilíbrio autonômico na microgravidade (Katafuchi et al., 1984).

Estudos da atividade autonômica são normalmente realizados através do registro dos parâmetros cardiovasculares durante o repouso seguido de um período de manobra ortostática ou antiortostática, sendo de suma importância a descoberta sobre a capacidade do sistema cardiovascular em responder à modulação autonômica durante a exposição à microgravidade (Fortrat et al., 1998), pois desta forma poderiam ser explicados os possíveis mecanismos pelos quais ocorrem as alterações após o retorno à gravidade normal, como intolerância ortostática e hipotensão.

De acordo com De Andrade e colaboradores (2012) o bloqueio da neurotransmissão sináptica do PVN com cloreto de cobalto inibiu o aumento na PAM durante o "head up tilt" ocasionando relevante diminuição na PAM e sugerindo que o PVN parece ser essencial para compensar a diminuição da PA durante o desafio ortostático (De Andrade *et al.*, 2012), assim como a modulação autonômica (De Andrade *et al.*, 2014). No entanto, ainda não foi demonstrado que o PVN esteja envolvido nas alterações cardiovasculares e autonômicas durante protocolos de microgravidade simulada, como o HDT.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo principal deste trabalho foi avaliar a participação do PVN durante as alterações cardiovasculares e autonômicas em um protocolo agudo de HDT em ratos não anestesiados.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1- Padronizar uma metodologia para estudar os efeitos cardiovasculares em manobra antiortostática.
- 2- Caracterizar a participação do SNA nos ajustes cardiovasculares em animais não anestesiados submetidos ao HDT.
- 3- Demonstrar a participação do PVN durante a modulação cardiovascular e autonômica provocada pela mudança antiortostática pela inibição pós-sináptica com muscimol.
- 4- Comprovar a participação do PVN durante a modulação cardiovascular e autonômica provocada pela mudança antiortostática pelo bloqueio pré-sináptico com cloreto de cobalto.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado no Departamento de Ciências Fisiológicas (CIF) do Centro de Ciências Biológicas (CCB) da Universidade Estadual de Londrina (UEL) e todos os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da Universidade Estadual de Londrina com registro no CEEA sob o nº 17114.2013.64.

ESTUDO 1: MECANISMO DE AÇÃO CARDIOVASCULAR DURANTE O HDT

3.1 ANIMAIS

Para este estudo foram utilizados ratos Wistar pesando 300 ± 20 gramas, provenientes do biotério central da Universidade Estadual de Londrina. Os animais foram divididos aleatoriamente em três grupos experimentais: Salina, Hexametônio ou Atropina e mantidos no biotério do Departamento de Ciências Fisiológicas em gaiolas coletivas (máximo de 5 animais) à temperatura de $21^{\circ}\text{C} \pm 2$, com ciclo claro/escuro de 12h. Água e ração comum para animais de laboratório foram fornecidos “ad libitum”.

3.2 CATETERIZAÇÃO DA ARTÉRIA E VEIA FEMORAIS

Vinte e quatro horas antes do registro dos parâmetros cardiovasculares, os animais foram anestesiados com Cloridrato de Cetamina (100 mg/kg) e Cloridrato de Xylasina (20 mg/kg) IP e submetidos à uma cirurgia para cateterização crônica da artéria (para monitorização dos parâmetros cardiovasculares) e veia femorais (para administração de drogas).

Uma incisão de 1,0 cm foi realizada na fossa ilíaca direita do animal e a artéria femoral foi dissecada. Uma linha de sutura foi utilizada para isolar a região distal da artéria femoral e uma pinça hemostática foi inserida a fim de obstruir temporariamente o fluxo arterial. Em seguida, um pequeno corte foi feito na artéria femoral e a cânula introduzida e cuidadosamente fixada na artéria. O mesmo procedimento foi realizado para a veia femoral. Após esse procedimento, as cânulas foram exteriorizadas na região dorsal do animal através de um trocar por via subcutânea e fixadas à pele por sutura cirúrgica. As cânulas foram fechadas com oclusores.

As cânulas foram confeccionadas a partir de 3 cm de polietileno PE-10 conectado a um segmento de 17 cm de PE-50. Após o retorno da anestesia, cada rato foi colocado em uma gaiola individual com água e ração, onde permaneceu até o momento do experimento no dia seguinte.

3.3 REGISTRO DA PRESSÃO ARTERIAL E DA FREQUÊNCIA CARDÍACA

Após 24 horas da cateterização, os animais foram submetidos ao registro basal da PA, seguido do protocolo experimental. O registro direto da PAM e FC foi realizado através de uma cânula previamente implantada na artéria femoral. O registro foi feito com os animais acordados e com livre movimentação de acordo com trabalhos prévios (Martin e Haywood, 1992; Martins-Pinge *et al.*, 2005).

A cânula arterial do animal foi acoplada a um transdutor de pressão (Powerlab modelo MLT0380) conectado a um sistema de registro computadorizado (Powerlab/ADInstruments), obtendo-se assim a pressão arterial pulsátil (PAP). A PAM e a FC eram registradas em um segundo e terceiro canal respectivamente, sendo obtidas da PAP.

Durante o período de registro os animais foram mantidos dentro de caixas individuais em ambiente silencioso e desprovido de estímulos estressantes. Experimentos pilotos já evidenciaram que os procedimentos utilizados neste trabalho não causam reações dolorosas ou outro tipo de comportamento que interfira no registro cardiovascular ou que não seja previsível pela administração de certas substâncias no PVN. Caso isso ocorresse, os animais eram imediatamente eutanasiados e descartados como sujeitos experimentais.

3.4 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Após o registro basal da PA (\pm 30 minutos) era realizado um dos protocolos experimentais descritos abaixo:

3.4.1 Grupo Controle

No grupo controle, após o registro basal da PA foi administrado através de cateter da veia femoral a injeção intravenosa em bolus de solução salina fisiológica (NaCl 0,9%) (1ml/Kg).

3.4.2 Bloqueio Ganglionar

Em um grupo experimental, após o registro da PA basal, foi administrado por meio do cateter da veia femoral a injeção em bolus de Hexametônio (bloqueador ganglionar autonômico) (Sigma CO, St. Louis, MO, USA) (25mg/Kg), que tinha por objetivo analisar o envolvimento do SNA nas alterações cardiovasculares durante o estresse ortostático.

3.4.3 Bloqueio Muscarínico

Em outro grupo experimental, após o registro da PA basal, os animais receberam injeção intravenosa (IV) em bolus do anticolinérgico atropina (2mg/kg), com o objetivo de avaliar a participação do SNP durante a antiortostase.

3.5 MANOBRA ANTIORTOSTÁTICA

Após o tratamento farmacológico os animais foram colocados em um compartimento cilíndrico de aproximadamente 30 cm, descrito como contensor, para registro da PAM e FC por aproximadamente 10 minutos, o contensor por sua vez, estava fixado em uma plataforma móvel na posição horizontal. Em seguida, os animais eram submetidos ao teste de antiortostase, que consistia em elevar a plataforma pelo lado onde estava posicionada a cauda do animal a uma posição de inclinação de -75° .

Os ratos conectados ao sistema de registro cardiovascular foram mantidos nessa posição por 15 minutos. Após esse período, os animais retornaram a posição horizontal (em 1 segundo) e permaneceram por mais 15 minutos (período de recuperação). Após a conclusão do protocolo experimental, os animais foram eutanasiados com sobredose de Cetamina e Xylasina.

ESTUDO 2: ENVOLVIMENTO DO NÚCLEO PARAVENTRICULAR DO HIPOTÁLAMO NAS RESPOSTAS CARDIOVASCULARES E AUTONÔMICAS AO HDT

3.6 ANIMAIS

Para este estudo foram utilizados ratos Wistar, pesando 300 ± 20 gramas, provenientes do biotério central da Universidade Estadual de Londrina. Os animais

foram divididos aleatoriamente em três grupos experimentais: Salina, Cloreto de Cobalto ou Muscimol.

3.7 IMPLANTE DE CÂNULAS-GUIA DIRECIONADAS AO PVN

Este procedimento foi realizado de acordo com (Badoer *et al.*, 2002). Inicialmente os ratos foram anestesiados com Cloridrato de Cetamina (100 mg/kg) e Cloridrato de Xylasina (20 mg/kg) IP e postos em decúbito ventral em um aparelho estereotáxico (Insight). A barra incisiva foi posicionada 5,0 mm abaixo da linha interaural. Em seguida, foi realizada a tricotomia da cabeça seguida de abertura da pele no sentido rostro-caudal, deixando em evidência a sutura bregma. Em seguida, foram produzidos dois forames bilaterais e equidistantes da linha média para o implante das cânulas-guia, cujas coordenadas estereotáxicas (Paxinos and Watson, 1998) utilizaram como referência a sutura bregma (AP= -1,4 mm, L= 0,5 mm; DV= 6,5 mm). A torre foi posicionada sem inclinação (0 grau). Para dar suporte às cânulas-guia, foi utilizada uma peça (“pé de pato”) com encaixes para as cânulas-guia separados por uma distância de 1 mm. Foram colocados dois parafusos pequenos, um em cada extremidade da abertura no sentido rostro-caudal, com o objetivo de reforçar a fixação das cânulas-guia pelo acrílico. Essas cânulas foram fixadas no crânio com resina acrílica. Após a completa fixação da cânula, a torre do estereotáxico foi removida e com o objetivo de não obstruir as cânulas-guia até a realização dos experimentos, foram introduzidos oclusores nas mesmas. Em seguida, o animal foi retirado do aparelho estereotáxico e como medida profilática, após a cirurgia cerebral foi administrada penicilina (30.000 UI) IM. Em seguida, o animal retornou ao biotério, onde permaneceu de 3 a 5 dias para recuperação pós-

cirúrgica. Após a recuperação, os animais foram submetidos à cirurgia de cateterização da artéria e veia femoral, conforme descrito no item 3.2.

3.8 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Após o registro basal da PA (\pm 30 minutos) foi realizado um dos protocolos experimentais descritos abaixo:

3.8.1 Tratamento Farmacológico do PVN.

Em cada grupo experimental foi realizada a microinjeção de uma das seguintes drogas bilateralmente no PVN: Salina fisiológica (grupo controle, 100 nl), Cloreto de Cobalto (bloqueador sináptico, 1 mM/100 nL) ou Muscimol (agonista dos receptores GABA-A, 15mM/100nL). Uma cânula microinjetora com comprimento de 21 mm, conectada a um tubo de polietileno (PE-10) e este a uma seringa Hamilton (701), foi colocada no interior da cânula guia, injetando-se manualmente 100 nl de cada droga. O volume injetado foi verificado pelo deslocamento de bolhas de ar. As concentrações das substâncias microinjetadas foram baseadas em trabalhos prévios (Zhang e Patel, 1998; Schlenker *et al.*, 2001; De Andrade *et al.*, 2012).

O registro dos parâmetros cardiovasculares e a manobra antiortostática foram realizados conforme descrito nos itens 3.3 e 3.5.

3.9 MARCAÇÃO FUNCIONAL DO PVN

Todos os animais que passaram por cirurgia estereotáxica (exceto o grupo que recebeu muscimol, que não responderá à bicuculina, já que compartilham o mesmo receptor) ao final do protocolo experimental receberam centralmente a administração bilateral de bicuculina (1mM/100nL) no PVN, afim de obter-se a

marcação funcional do PVN, que consta de aumento da PAM e FC, acompanhado de comportamento de autolimpeza (Martin et al., 1991).

3.10 MARCAÇÃO E HISTOLOGIA DO CÉREBRO

Após o término do protocolo experimental e eutanásia dos animais, os sítios de microinjeção foram marcados com uma solução de Azul de Evans 2%, num volume de 100 nL. Em seguida, o animal teve seu cérebro retirado e colocado em formalina 10% para posterior corte histológico e análise das lâminas.

Os cérebros foram seccionados em micrótomo de congelamento através de cortes de 40 μ m da região do PVN. Os cortes obtidos foram posicionados e fixados em lâminas de vidro e corados pela técnica de vermelho neutro 1%. Estes cortes foram analisados ao microscópio óptico e comparados ao Atlas cerebral de ratos (Paxinos e Watson, 1998). Somente os animais que tiveram os sítios marcados na área do PVN foram considerados como animais experimentais.

3.11 ANÁLISE ESPECTRAL DA VARIABILIDADE DA PAS E DA FC

A análise da variabilidade do intervalo de pulso (IP) e da pressão arterial sistólica (PAS) no domínio da frequência foi realizada utilizando-se o software computacional CardioSeries v2.4 (<http://www.danielpenteado.com>) (Tezini et al., 2013). Uma vez que o programa computacional não realiza aquisição de dados, registros de PA basal e durante a manobra ortostática (Tilt) de pelo menos 15 minutos de duração, foram processados pelo programa computacional LabChart 7.0 (ADInstruments, Bella Vista, Austrália), o qual é capaz de detectar pontos de inflexão nos pulsos de pressão e gerar séries, batimento-a-batimento, com valores de IP e PAS para cada ciclo cardíaco.

As séries temporais, batimento-a-batimento, com valores de IP e PAS foram reamostradas em 10 Hz (1 valor a cada 100 ms) por interpolação cúbica do tipo spline, para regularização do intervalo de tempo entre batimentos. As séries com valores interpolados de IP e PAS foram divididas em segmentos com 512 valores cada, com sobreposição de 50% (Protocolo de Welch). A estacionaridade dos valores de IP e PAS de cada segmento foi examinada visualmente e os segmentos com artefatos ou transientes foram excluídos.

Após a inspeção visual dos segmentos com valores interpolados de IP e PAS e da inspeção dos espectros, os segmentos considerados adequados foram integrados em bandas de baixa frequência (LF: 0,20 – 0,75 Hz) e alta frequência (HF: 0,75 – 3,00 Hz), e os resultados foram expressos em unidades absolutas (ms^2 ou mmHg^2) e normalizadas (un). Os valores normalizados foram obtidos por meio de cálculos da potência relativa das bandas de LF e HF levando em consideração a potência total de espectro menos a potência de banda de muito baixa frequência (VLF: < 0,20 Hz). Para avaliar o balanço simpátovagal cardíaco, calculou-se a razão entre a potência das bandas de LF e HF (LF/HF) do espectro do IP.

3.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos resultados foi realizada utilizando-se o programa estatístico “Prism” (GraphPad, San Diego, CA). As comparações foram feitas por Análise de Variância (One-way ANOVA) seguido do pós test de Bonferroni. As comparações realizadas dentro dos mesmos grupos (antes e durante o HDT) foram analisadas pelo teste t-Student pareado, considerando as diferenças significantes para um valor de $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

ESTUDO 1

4.1 VALORES BASAIS DE PRESSÃO ARTERIAL MÉDIA E FREQUÊNCIA CARDÍACA DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS.

Os valores basais da PAM e da FC antes e após 5 minutos do tratamento farmacológico são apresentados na Tabela 1. A administração endovenosa de salina não alterou os parâmetros cardiovasculares. No entanto, após administração de hexametônio houve redução da PAM e aumento da FC, enquanto a administração de atropina promoveu aumento da FC.

Tabela 1 - Valores de pressão arterial média (PAM - mmHg) e frequência cardíaca (FC - bpm) dos grupos experimentais nos momentos pré e pós-droga. Valores expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$ comparado ao basal. (teste t pareado)

	Basal Pré-Droga		Basal Pós-Droga	
	PAM	FC	PAM	FC
Salina (n=8)	101 \pm 3	364 \pm 7	104 \pm 3	377 \pm 8
Hexametônio (n=6)	100 \pm 2	332 \pm 5	76 \pm 4*	362 \pm 9*
Atropina (n=7)	107 \pm 2	346 \pm 11	109 \pm 3	454 \pm 18*

4.2 EFEITOS CARDIOVASCULARES E AUTONÔMICOS APÓS ADMINISTRAÇÃO INTRAVENOSA DE SALINA DURANTE O HDT.

O HDT promoveu aumento da PAM e redução da FC (Figura 1).

A modulação pelo SNA avaliada pela análise espectral da PAS mostrou que durante o estresse ortostático ocorre um aumento da variância e do componente LF em unidades absolutas (Figura 2).

Em relação à análise espectral do IP ocorreu o aumento da variância durante o HDT e uma redução da razão LF/HF. Durante o HDT ocorreu um aumento do componente HF em valores absolutos sem alteração para o componente LF, os quais após a normalização mostraram uma redução do componente LF e aumento do componente HF (Figura 3).

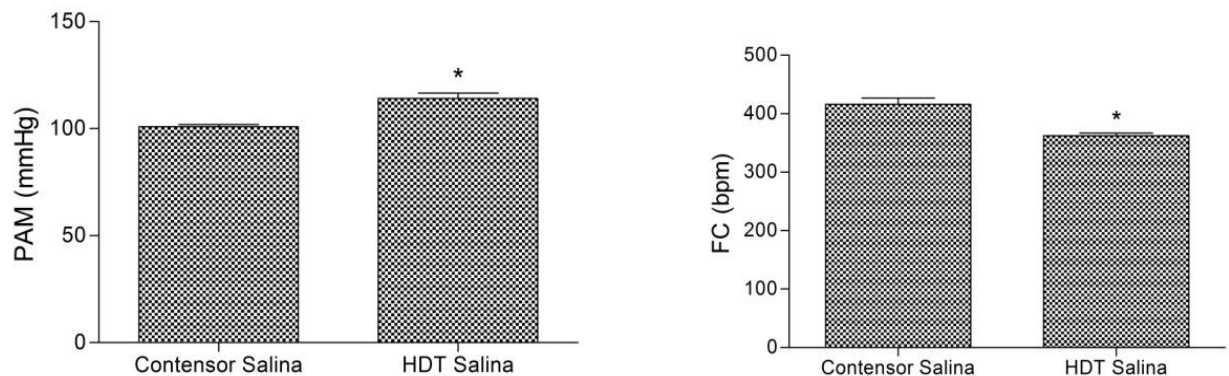


Figura 1 - Variação da Pressão Arterial Média (PAM) e da Frequência Cardíaca (FC) durante o HDT em animais acordados (n=8). *p<0,05 comparado ao basal (teste t pareado).

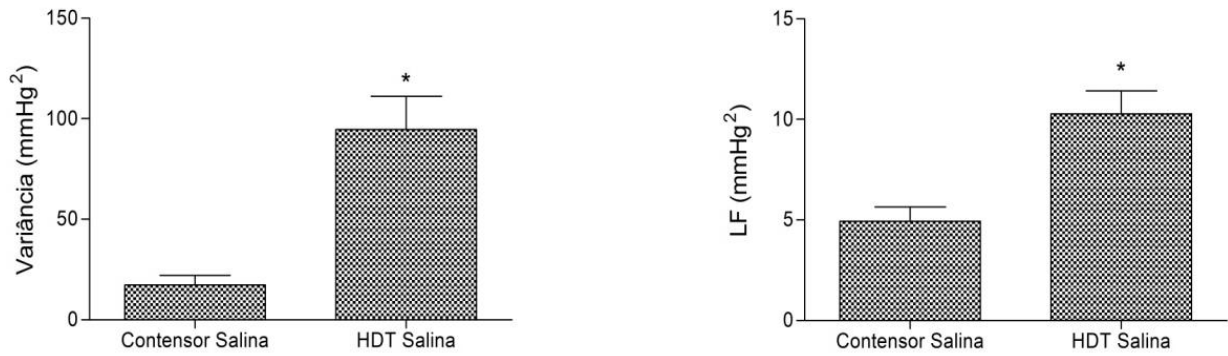


Figura 2 - Parâmetros espectrais da variância e da pressão arterial sistólica (PAS) após administração intravenosa (IV) de salina em ratos acordados e submetidos ao HDT. LF: faixa de baixa frequência absoluta * $p < 0,05$ comparado ao basal. (teste t pareado).

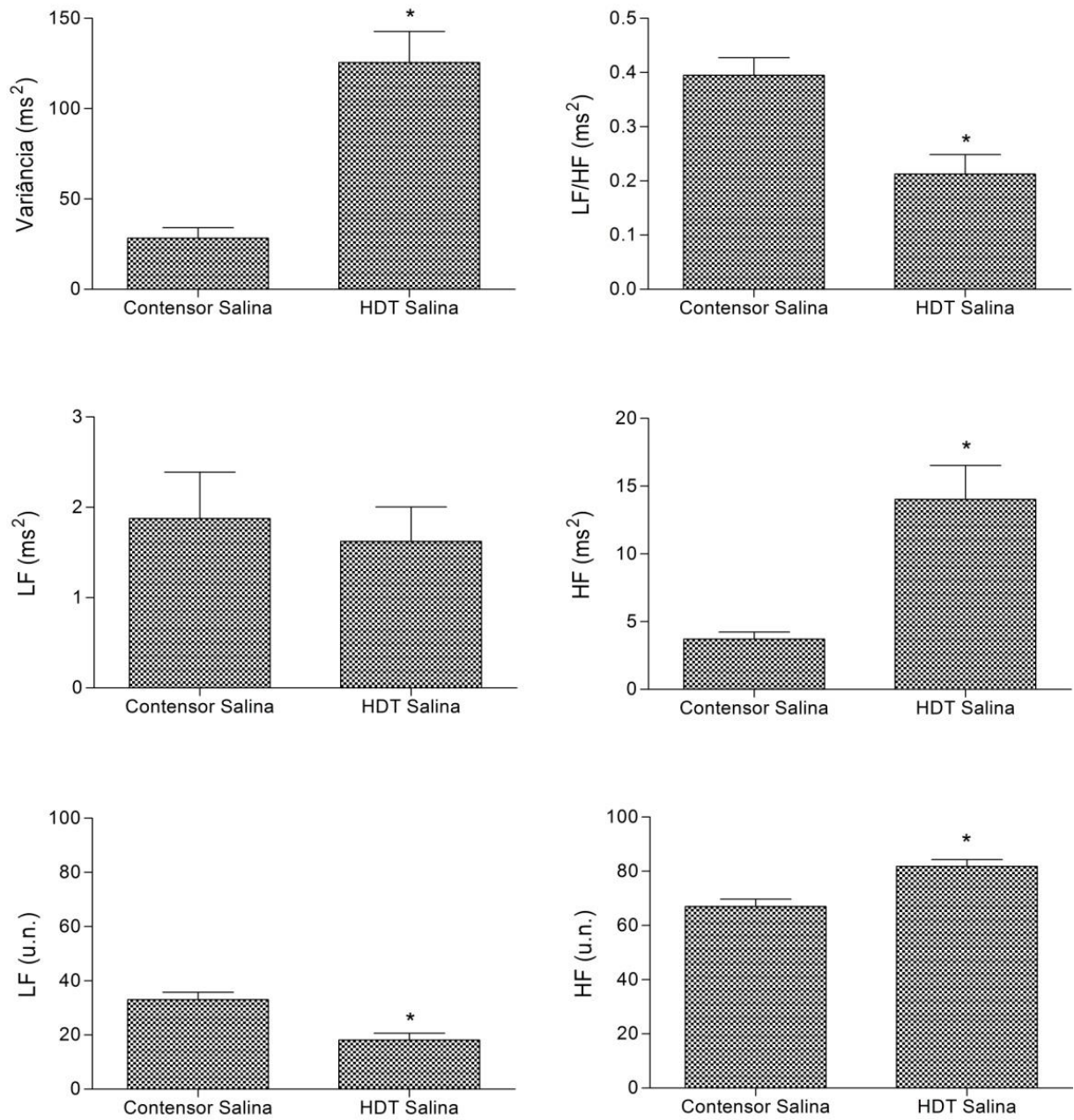


Figura 3 - Parâmetros espectrais do intervalo de pulso (IP) após administração intravenosa (IV) de salina em ratos acordados e submetidos ao HDT. LF: faixa de baixa frequência absoluta; HF: faixa de alta frequência absoluta; LFun: faixa de baixa frequência normalizada; HFun: faixa de alta frequência normalizada; LF/HF: razão entre LF e HF. * $p < 0,05$ comparado ao basal (teste t pareado).

4.3 EFEITOS SOBRE A PAM E FC APÓS ADMINISTRAÇÃO INTRAVENOSA DE HEXAMETÔNIO OU ATROPINA.

Ambos tratamentos com hexametônio ou atropina inibiram o aumento da PAM e a bradicardia durante o HDT observados no grupo salina (Figura 4).

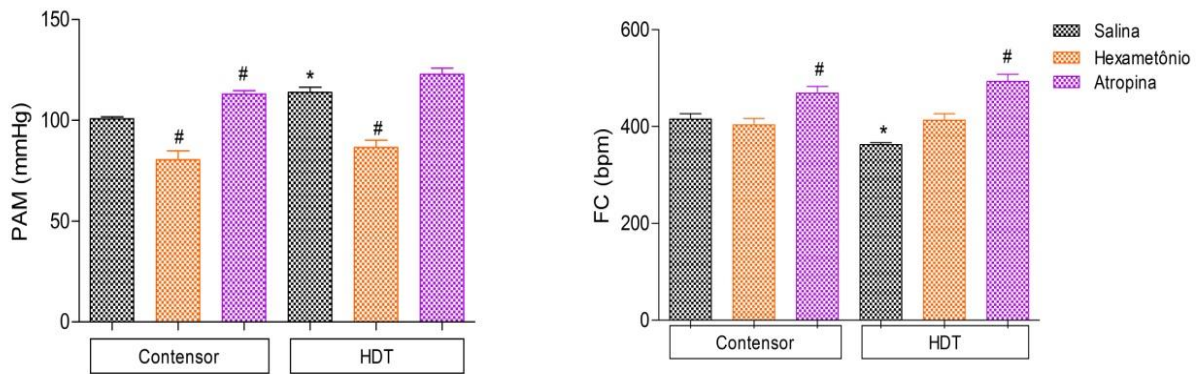


Figura 4 - Variações de PAM e FC no grupo tratado com hexametônio ou atropina comparado ao grupo salina durante o HDT. * $p < 0,05$ comparado ao contensor (test t pareado). # $p < 0,05$ comparado ao salina (One-Way Anova)

4.4 EFEITOS SOBRE A VARIABILIDADE CARDIOVASCULAR APÓS ADMINISTRAÇÃO INTRAVENOSA DE HEXAMETÔNIO OU ATROPINA.

4.4.1 Modulação Autonômica da Pressão Arterial Sistólica

A análise espectral da PAS mostra que a administração de hexametônio não alterou o aumento da variância, mas atenuou o aumento do componente simpático observado no grupo salina durante o HDT. Já a administração de atropina exacerbou o aumento da variância sem alterar o aumento do componente simpático notado no grupo salina durante o HDT (Figura 5).

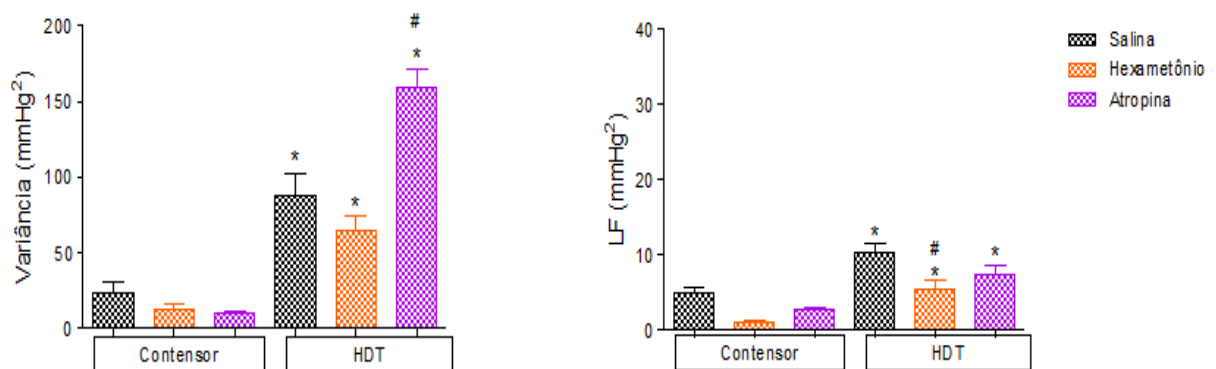


Figura 5 - Parâmetros espectrais de pressão arterial sistólica (PAS) do grupo tratado com Hexametônio ou Atropina em comparação ao grupo salina no momento final do contensor e durante o pico do HDT. LF: faixa de baixa frequência absoluta. * $p < 0,05$ comparado ao controle (One-Way Anova).

4.4.2 Modulação Autonômica do Intervalo de Pulso

A análise espectral do IP mostrou que o bloqueio ganglionar atenuou o aumento da variância que ocorreu no grupo salina e inibiu a queda da razão LF/HF. Não houve diferença dos valores do LF absoluto entre o basal e HDT entre todos os grupos, no entanto, o HF absoluto teve seu aumento atenuado tanto pela administração de hexametônio quanto de atropina. A normalização dos parâmetros espectrais mostra que o hexametônio inibiu a queda do LF e o aumento do HF observados no grupo salina (Figura 6).

O tratamento com atropina atenuou o aumento da variância, impediu a queda da razão LF/HF e bloqueou o aumento do componente HF observados no grupo salina. A normalização dos dados mostra que a atropina inibiu a redução do componente LF e o aumento do componente HF (Figura 6).

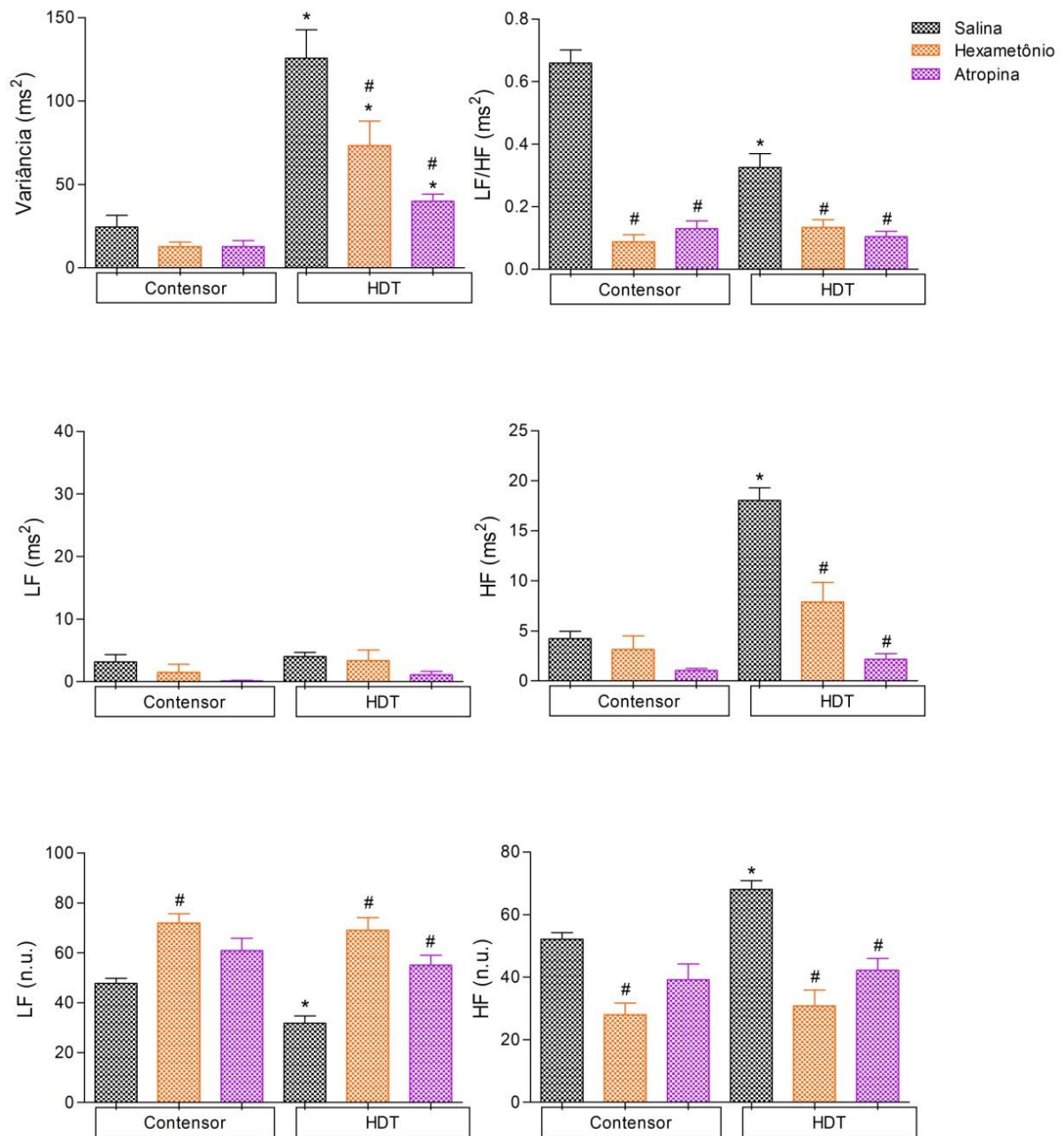


Figura 6 - Parâmetros espectrais do intervalo de pulso (IP) no grupo tratado com Hexametônio ou Atropina em comparação ao grupo salina no momento final do contensor e durante o pico do HDT. LF: faixa de baixa frequência absoluta; HF: faixa de alta frequência absoluta; LFun: faixa de baixa frequência normalizada; HFun: faixa de alta frequência normalizada; LF/HF: razão entre os componentes LF e HF. * $p < 0,05$ comparado ao contensor (teste t pareado). # $p < 0,05$ comparado ao controle (One-Way Anova).

ESTUDO 2

4.5 CONFIRMAÇÃO HISTOLÓGICA DOS SÍTIOS DE MICROINJEÇÃO NO PVN.

A confirmação dos sítios de microinjeção bilateral no PVN foi realizada através da visualização de corte histológico corado pela técnica do vermelho neutro e com auxílio do Atlas Paxinos & Watson (Paxinos e Watson, 1998). Somente os ratos com marcação da microinjeção na área do PVN foram considerados para análise (Figura 7).

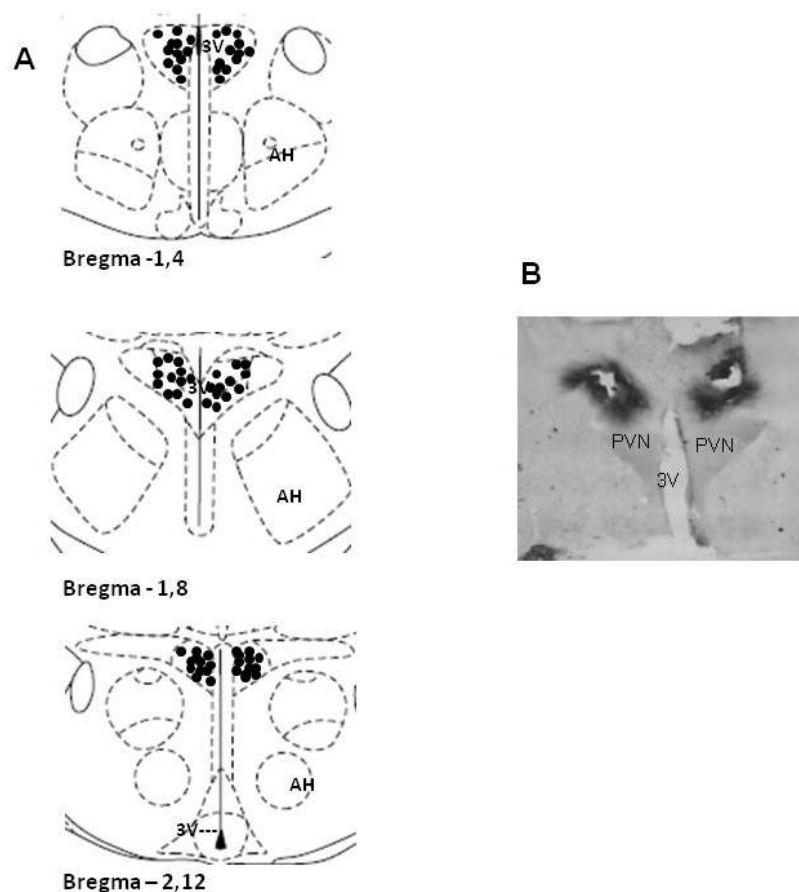


Figura 7 - Confirmação histológica evidenciando os sítios de microinjeção bilateral no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN). A: Representação esquemática dos sítios de microinjeção no PVN: Microinjeção na região rostral (1,4 mm) à caudal (2,12 mm) da região do PVN. () Distância posterior ao bregma é mostrado para cada secção de acordo com o Atlas de Paxinos e Watson (1988). B: Fotomicrografia de uma lâmina histológica do PVN. Abreviaturas: 3V, terceiro ventrículo; AH, hipotálamo anterior.

4.6 VALORES BASAIS DE PRESSÃO ARTERIAL MÉDIA E FREQUÊNCIA CARDÍACA DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS.

Os valores basais da PAM e da FC antes e após 5 minutos do tratamento farmacológico são apresentados na Tabela 1. Não foram observadas alterações entre os grupos para ambos os parâmetros nos períodos pré e pós-droga.

Tabela 2 - Valores de pressão arterial média (PAM - mmHg) e frequência cardíaca (FC - bpm) dos grupos experimentais antes e após a administração dos tratamentos centrais. Valores expressos como média \pm EPM.

	Basal Pré-Droga		Basal Pós-Droga	
	PAM	FC	PAM	FC
Salina (n=8)	99 \pm 2	349 \pm 7	101 \pm 3	360 \pm 18
Cloreto de Cobalto (n=8)	103 \pm 3	369 \pm 4	104 \pm 2	376 \pm 13
Muscimol (n=9)	100 \pm 3	360 \pm 6	104 \pm 4	357 \pm 9

4.7 EFEITOS SOBRE A PAM E FC APÓS MICROINJEÇÃO DE CLORETO DE COBALTO OU MUSCIMOL NO PVN DURANTE O HDT.

O bloqueio da neurotransmissão sináptica do PVN através do tratamento com o cloreto de cobalto promoveu respostas de PAM e FC durante o HDT similares ao grupo salina, portanto, não alterou o aumento da pressão e a bradicardia observada no grupo salina. Já o tratamento com o agonista gabaérgico muscimol não promoveu alterações na PAM, mas reverteu a bradicardia em taquicardia durante o pico do HDT (Figura 8).

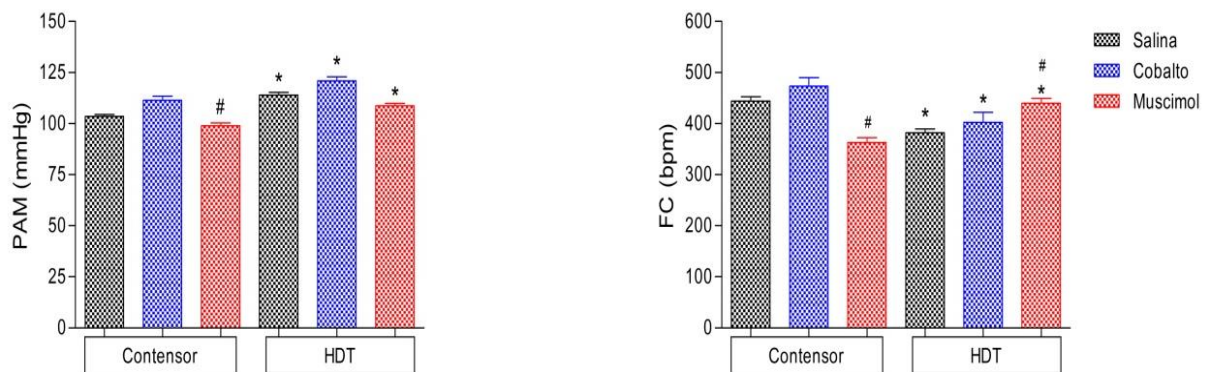


Figura 8 - Valores de Pressão Arterial Média (PAM) e Frequência Cardíaca (FC) no grupo tratado com Cloreto de Cobalto ou Muscimol em comparação ao grupo salina no momento final no contensor e durante o HDT em animais não anestesiados. * $p < 0,05$ comparado ao contensor (teste t pareado). # $p < 0,05$ comparado ao controle (One-Way Anova).

4.8 EFEITOS SOBRE A VARIABILIDADE CARDIOVASCULAR APÓS MICROINJEÇÃO DE SALINA, CLORETO DE COBALTO OU MUSCIMOL NO PVN DURANTE O HDT.

4.8.1 Modulação Autonômica da Pressão Arterial Sistólica pelo PVN.

A análise espectral da PAS mostrou que durante o HDT, o bloqueio com cloreto de cobalto não inibiu o aumento da variância e o aumento do LF absoluto que ocorreu no grupo salina. No entanto, a ativação da via gabaérgica através da microinjeção de muscimol no PVN atenuou o aumento da variância, embora não tenha afetado o aumento do componente LF da PAS que ocorreu no grupo salina (Figura 9).

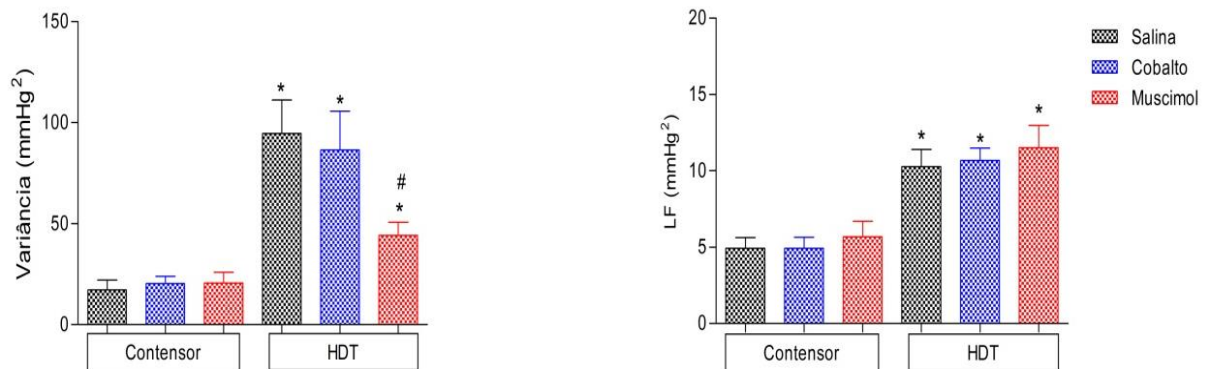


Figura 9 - Parâmetros espectrais de pressão arterial sistólica (PAS) do grupo tratado com Salina, Cloreto de Cobalto ou Muscimol em comparação ao grupo salina em ratos não anestesiados. LF: faixa de baixa frequência absoluta. * $p < 0,05$ comparado ao controle (One-Way Anova).

4.8.2 Modulação Autonômica do Intervalo de Pulso pelo PVN.

A análise espectral do IP mostrou que o bloqueio sináptico no PVN com cloreto de cobalto promoveu a inibição do aumento na variância que ocorreu no grupo salina, mas a razão LF/HF não foi alterada. Não houve diferença dos valores de LF absoluto entre o contensor e HDT entre todos os grupos. Após a normalização dos componentes espectrais, o grupo que recebeu cloreto de cobalto apresenta valores de LF e HF similares ao grupo salina (Figura 10).

A ativação dos receptores gabaérgicos no PVN com muscimol, levando a uma inibição pós-sináptica, também bloqueou o aumento da variância do IP, todavia, o muscimol impediu a queda da razão LF/HF observada durante o HDT no grupo salina. A normalização dos componentes espectrais do IP mostra que o tratamento com muscimol bloqueou a queda do componente LF exibida pelo grupo salina e diferente do cobalto, a microinjeção de muscimol no PVN inibiu o aumento do componente HF, tanto absoluto quanto normalizado (Figura 10).

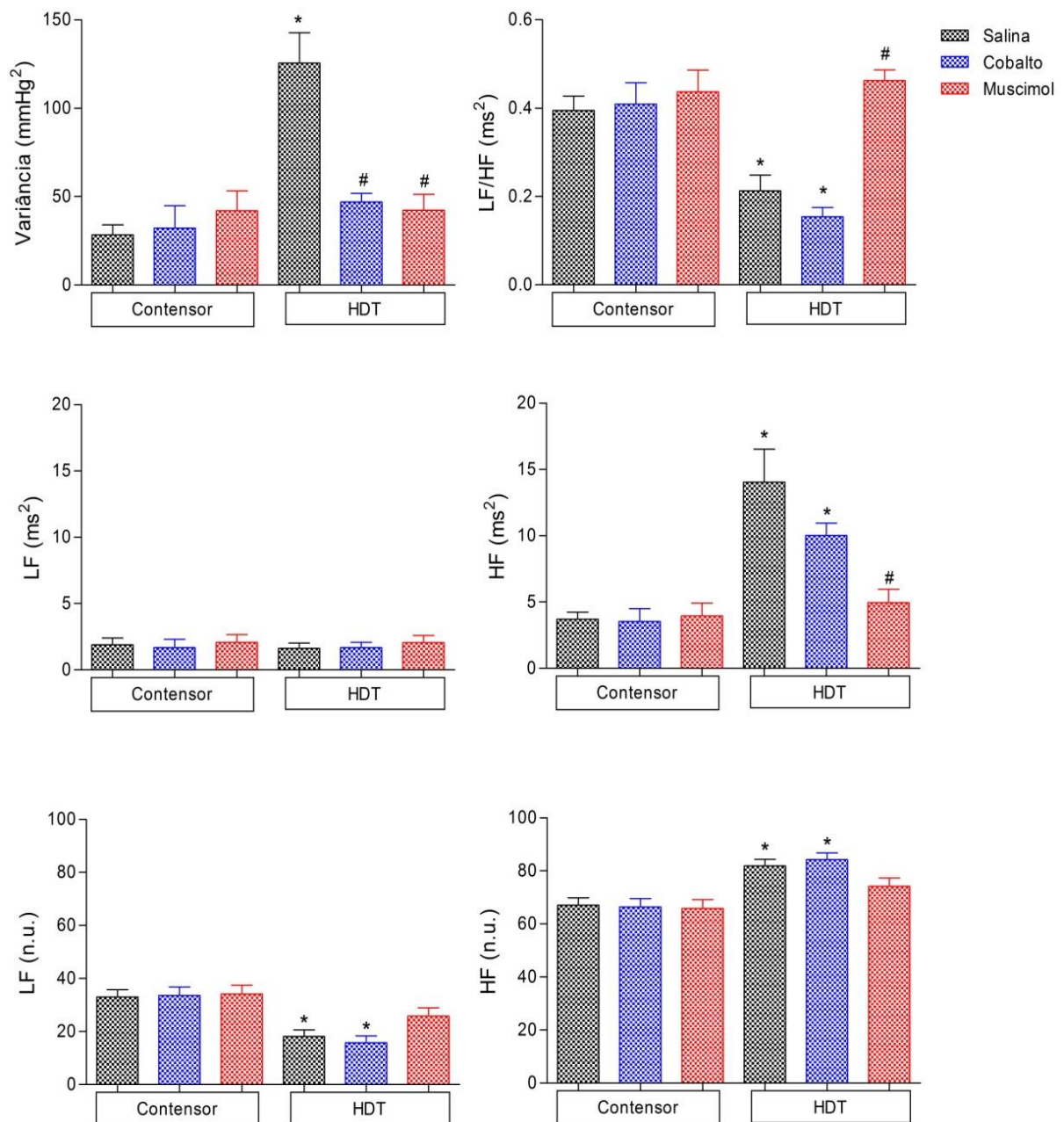


Figura 10 - Parâmetros espectrais do intervalo de pulso (IP) no grupo tratado com Cloreto de Cobalto ou Muscimol em comparação com o grupo salina em ratos não anestesiados. LF: faixa de baixa frequência absoluta; HF: faixa de alta frequência absoluta; LFun: faixa de baixa frequência normalizada; HFun: faixa de alta frequência normalizada; LF/HF: balanço simpato-vagal. * $p < 0,05$ comparado ao contensor. # $p < 0,05$ comparado ao controle (One-Way Anova).

5 DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou as alterações cardiovasculares e a modulação autonômica em ratos submetidos ao HDT através do bloqueio ganglionar com hexametônio e do bloqueio dos receptores muscarínicos com atropina. Além disso, foi avaliado o envolvimento do PVN através da inibição da neurotransmissão com cloreto de cobalto e da inibição pós-sináptica com muscimol. Durante o HDT ocorreu um aumento da PAM e queda da FC. Nossos resultados estão de acordo com trabalhos já publicados na literatura, mostrando que o HDT agudo promove aumento da PAM (Musacchia *et al.*, 1992; Raffai *et al.*, 2006; Bundgaard-Nielsen *et al.*, 2009; Geinas *et al.*, 2012) e redução da FC (Terai *et al.*, 1995; Heckmann *et al.*, 1999; Galanis *et al.*, 2013).

Para evidenciar o papel da modulação autonômica no controle dos parâmetros cardiovasculares durante o HDT, foi realizado o tratamento com hexametônio e atropina em grupos distintos. O hexametônio é um bloqueador ganglionar que atua como antagonista dos receptores nicotínicos (principalmente os receptores N_N) localizados nos gânglios simpáticos e parassimpáticos (Ascher *et al.*, 1979), enquanto a atropina é um antagonista competitivo dos receptores muscarínicos (Hardman, 2001). Tanto o bloqueio ganglionar quanto o bloqueio muscarínico impediram o aumento da PAM e a redução da FC durante o HDT. Deste modo, sugerimos que o aumento pressórico promovido pelo HDT ocorreu por aumento da modulação simpática e a resposta bradicárdica ocorreu tanto pela redução da modulação simpática quanto pelo aumento da modulação parassimpática sobre o IP.

A análise espectral da variabilidade dos parâmetros cardiovasculares é utilizada para averiguar a modulação autonômica utilizando os componentes LF e HF como representantes da modulação do SNS e SNP respectivamente (Rubini et al., 1993). Em nosso estudo, observamos que durante o HDT a variância, assim como a modulação simpática da PAS estão aumentadas. O aumento do componente simpático da PAS foi atenuado pelo bloqueio ganglionar, mas não pelo bloqueio muscarínico. Deste modo, nossos resultados sugerem que a resposta hipertensiva durante o HDT foi devido ao aumento da modulação autonômica simpática para os vasos sanguíneos, aumentando a RVP. Resultado semelhante foi encontrado em outros trabalhos da literatura, que sugerem que o aumento da PAM que ocorre durante o HDT é devido ao aumento da atividade simpática que aumenta a RVP (Noresson et al., 1977; Raffai et al., 2006).

Durante o HDT observou-se no IP o aumento da variância, acompanhado por redução da modulação simpática e aumento da modulação parassimpática. Ambos os bloqueios - ganglionar e muscarínico - atenuaram o aumento da variância observado no grupo salina, além disso, conseguiram impedir a redução do componente simpático e o aumento do componente parassimpático do IP. Estudos já publicados mostram resultados semelhantes, como o trabalho de Weise e colaboradores que mostra que durante o HDT ocorre redução do componente simpático sobre a FC (Weise et al., 1995), além de uma ativação aguda da modulação nervosa parassimpática para o coração detectada pela redução da FC e pela distribuição espectral da VFC (Diedrich et al., 1994). Durante a simulação da microgravidade em voos parabólicos também observa-se a redução da atividade simpática (Seps et al., 2002) e aumento da modulação parassimpática em humanos (Seps et al., 2002; Beckers et al., 2003). Através do bloqueio da atividade

autonômica conseguimos bloquear as alterações cardiovasculares e autonômicas observadas no grupo salina, sugerindo que o aumento da PAM observada no HDT tenha ocorrido devido ao aumento da modulação simpática vascular, além disso, acreditamos que a bradicardia promovida pelo HDT é mediada tanto pela redução da modulação simpática quanto pelo aumento da modulação parassimpática cardíaca.

Embora já sejam conhecidas as alterações cardiovasculares (Musacchia *et al.*, 1992; Heckmann *et al.*, 1999; Raffai *et al.*, 2006; Galanis *et al.*, 2013) e autonômicas (Noresson *et al.*, 1977; Diedrich *et al.*, 1994; Weise *et al.*, 1995; Seps *et al.*, 2002; Beckers *et al.*, 2003; Raffai *et al.*, 2006) que ocorrem durante a exposição à microgravidade ou durante protocolos que simulam a microgravidade, nenhum estudo até o momento havia analisado a participação do PVN sobre os efeitos cardiovasculares e autonômicos durante o HDT.

Para avaliarmos a participação do PVN durante o HDT, realizamos a inibição farmacológica, que é uma ferramenta bastante utilizada para investigar possíveis envolvimento de áreas específicas do cérebro em vias neurais. A técnica é baseada na administração por meio de microinjeção de drogas que bloqueiam a atividade neural. Microinjeções de cloreto de cobalto em áreas do cérebro têm sido utilizadas para inativação funcional (Kretz, 1984), pois previne a liberação de neurotransmissores sinápticos pelo bloqueio dos canais de cálcio na membrana pré-sináptica (Hagiwara e Byerly, 1981). A inibição do SNC pelo cloreto de cobalto é mais efetiva do que a administração de anestésicos locais ou agonistas de receptores específicos, pois bloqueia a transmissão sináptica, enquanto a lidocaína bloqueia tanto a transmissão sináptica quanto a propagação de potenciais de ação

pelas fibras de passagem (Sandkuhler et al., 1987) e o muscimol inibe seletivamente os neurônios que expressam os receptores GABA_A (Martin e Ghez, 1999).

O bloqueio sináptico do PVN com cloreto de cobalto não inibiu as alterações cardiovasculares e autonômicas durante o HDT. Por outro lado, a inibição do PVN com muscimol reverteu a bradicardia em taquicardia. O bloqueio com muscimol não afetou a modulação simpática sobre a PAS, no entanto, impediu a queda na modulação simpática e inibiu o aumento da modulação parassimpática do IP que ocorreu durante o HDT. Dessa forma, nossos dados sugerem que as alterações cardiovasculares decorrentes do antiortostatismo pelo HDT são devido às alterações autonômicas e o PVN participa modulando a FC através dos dois componentes autonômicos (simpático e parassimpático).

A mudança postural pelo HDT induz o deslocamento do volume sanguíneo em direção ao cérebro e coração, aumentando a pré-carga cardíaca (Nelson et al., 2011). Um aumento do volume diastólico final do ventrículo esquerdo resulta em maior volume sistólico e aumento do fluxo sanguíneo cerebral (Katz, 2002), evitando uma possível síncope. Esses ajustes são controlados por mecanismos centrais ativados pelo sistema barorreceptor e envolve a participação de conhecidas áreas de controle bulbar e hipotalâmico, onde o PVN possui envolvimento relevante (Dampney, 1994; Badoer, 2001).

Alguns trabalhos relatam a importância do PVN em protocolos de HDT (Katafuchi *et al.*, 1987; Oomura e Katafuchi, 1987) e também nas alterações cardiovasculares que ocorrem após longos períodos de antiortostatismo (Mueller *et al.*, 2003; Mueller, Sullivan, *et al.*, 2006; Schrage, 2008). Dados da literatura sugerem que aumentos na neurotransmissão nitrérgica no PVN contribuem para as

alterações autonômicas e humorais que ocorrem após a microgravidade simulada pela suspensão corporal em ratos (Mueller, Foley, *et al.*, 2006).

O bloqueio do PVN pela microinjeção de muscimol reverteu o efeito bradicárdico provocado pelo HDT, inibindo a queda da modulação simpática e o aumento da modulação parassimpática mostrando que a modulação do SNA pelo PVN teve importante participação na bradicardia ocasionada pelo HDT. Já é conhecido que o PVN modula a atividade nervosa simpática sobre a PA (Badoer, 2001; Busnardo *et al.*, 2010) e a FC (Martin e Haywood, 1992) e nossos resultados reforçam que o PVN participa do controle barorreflexo dos parâmetros cardiovasculares.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nossos dados mostram que o SNA possui um importante papel na compensação das alterações cardiovasculares durante o HDT, pois o bloqueio ganglionar, assim como o bloqueio muscarínico, impediram as respostas pressóricas e de FC durante o HDT. Além disso, nosso estudo comprova a participação do PVN nessas compensações cardiovasculares, modulando especialmente as respostas cardíacas ao HDT. Dessa forma, acreditamos que esta metodologia é válida para estudar alterações antiortostáticas e que posteriormente, utilizando outros fármacos seletivos para outros neurotransmissores já encontrados no PVN será possível caracterizar os mediadores envolvidos nesse reflexo. Além disso, esta metodologia poderá ser utilizada em modelos animais de doenças em que problemas ortostáticos de origem central estejam envolvidos.

REFERÊNCIAS

ALLEN, A. M. Inhibition of the hypothalamic paraventricular nucleus in spontaneously hypertensive rats dramatically reduces sympathetic vasomotor tone. **Hypertension**, v. 39, n. 2, p. 275-80, Feb 2002. ISSN 1524-4563 (Electronic)

0194-911X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11847197> >.

AMBUHL, P. et al. Effects of angiotensin analogues and angiotensin receptor antagonists on paraventricular neurones. **Regul Pept**, v. 38, n. 2, p. 111-20, Mar 19 1992. ISSN 0167-0115 (Print)

0167-0115 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1574605> >.

ARZENO, N. M. et al. Sex differences in blood pressure control during 6 degrees head-down tilt bed rest. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 304, n. 8, p. H1114-23, Apr 15 2013. ISSN 1522-1539 (Electronic)

0363-6135 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23396455> >.

ASCHER, P.; LARGE, W. A.; RANG, H. P. Studies on the mechanism of action of acetylcholine antagonists on rat parasympathetic ganglion cells. **J Physiol**, v. 295, p. 139-70, Oct 1979. ISSN 0022-3751 (Print)

0022-3751 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/42780> >.

BADOER, E. Hypothalamic paraventricular nucleus and cardiovascular regulation. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 28, n. 1-2, p. 95-9, Jan-Feb 2001. ISSN 0305-1870 (Print)

0305-1870 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11153547> >.

BADOER, E.; NG, C. W.; DE MATTEO, R. Tonic sympathoinhibition arising from the hypothalamic PVN in the conscious rabbit. **Brain Res**, v. 947, n. 1, p. 17-24, Aug 23 2002. ISSN 0006-8993 (Print)

0006-8993 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12144848> >.

BAHJAQUI-BOUHADDI, M. et al. Graded vascular autonomic control versus discontinuous cardiac control during gradual upright tilt. **J Auton Nerv Syst**, v. 79, n. 2-3, p. 149-55, Mar 15 2000. ISSN 0165-1838 (Print)

0165-1838 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10699646> >.

BAINS, J. S.; FERGUSON, A. V. Nitric oxide regulates NMDA-driven GABAergic inputs to type I neurones of the rat paraventricular nucleus. **J Physiol**, v. 499 (Pt 3), p. 733-46, Mar 15 1997. ISSN 0022-3751 (Print)

0022-3751 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9130169> >.

BECKERS, F. et al. Parasympathetic heart rate modulation during parabolic flights. **Eur J Appl Physiol**, v. 90, n. 1-2, p. 83-91, Sep 2003. ISSN 1439-6319 (Print)

1439-6319 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12811567> >.

BERNE, R. M.; LEVY, M. N. **The peripheral Circulation and its control**. In: **Berne RM, Levy MN**. Sydney: Mosby, 1998. 1130.

BLAIR, M. L. et al. Role of the hypothalamic paraventricular nucleus in cardiovascular regulation. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 23, n. 2, p. 161-5, Feb 1996. ISSN 0305-1870 (Print)

0305-1870 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8819646> >.

BLEASDALE-BARR, K. M.; MATHIAS, C. J. Neck and other muscle pains in autonomic failure: their association with orthostatic hypotension. **J R Soc Med**, v. 91, n. 7, p. 355-9, Jul 1998. ISSN 0141-0768 (Print)

0141-0768 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9771493> >.

BLESSING, W. W.; LI, Y. W. Inhibitory vasomotor neurons in the caudal ventrolateral region of the medulla oblongata. **Prog Brain Res**, v. 81, p. 83-97, 1989. ISSN 0079-6123 (Print)

0079-6123 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2694225> >.

BLOMQUIST, C. G. et al. Early cardiovascular adaptation to zero gravity simulated by head-down tilt. **Acta Astronaut**, v. 7, n. 4-5, p. 543-53, Apr-May 1980. ISSN 0094-5765 (Print)

0094-5765 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11541656> >.

BUNDGAARD-NIELSEN, M. et al. Relationship between stroke volume, cardiac output and filling of the heart during tilt. **Acta Anaesthesiol Scand**, v. 53, n. 10, p. 1324-8, Nov 2009. ISSN 1399-6576 (Electronic)

0001-5172 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19650800> >.

BUSNARDO, C.; TAVARES, R. F.; CORREA, F. M. Role of N-methyl-D-aspartate and non-N-methyl-D-aspartate receptors in the cardiovascular effects of L-glutamate microinjection into the hypothalamic paraventricular nucleus of unanesthetized rats. **J Neurosci Res**, v. 87, n. 9, p. 2066-77, Jul 2009. ISSN 1097-4547 (Electronic)

0360-4012 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19229989> >.

BUSNARDO, C. et al. Paraventricular nucleus modulates autonomic and neuroendocrine responses to acute restraint stress in rats. **Auton Neurosci**, v. 158, n. 1-2, p. 51-7, Dec 8 2010. ISSN 1872-7484 (Electronic)

1566-0702 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20594922> >.

COOPER, V. L.; HAINSWORTH, R. Effects of head-up tilting on baroreceptor control in subjects with different tolerances to orthostatic stress. **Clin Sci (Lond)**, v. 103, n. 3, p. 221-6, Sep 2002. ISSN 0143-5221 (Print)

0143-5221 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12193147> >.

DAMPNEY, R. A. Functional organization of central pathways regulating the cardiovascular system. **Physiol Rev**, v. 74, n. 2, p. 323-64, Apr 1994. ISSN 0031-9333 (Print)

0031-9333 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8171117> >.

DAMPNEY, R. A.; GOODCHILD, A. K.; TAN, E. Vasopressor neurons in the rostral ventrolateral medulla of the rabbit. **J Auton Nerv Syst**, v. 14, n. 3, p. 239-54, Nov 1985. ISSN 0165-1838 (Print)

0165-1838 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4067185> >.

DE ANDRADE, O. et al. Involvement of the paraventricular nucleus (PVN) of hypothalamus in the cardiovascular alterations to head up tilt in conscious rats. **Neurosci Res**, v. 72, n. 3, p. 270-4, Mar 2012. ISSN 1872-8111 (Electronic)

0168-0102 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22182743> >.

DE ANDRADE, O. et al. Paraventricular nucleus of hypothalamus participates in the sympathetic modulation and spontaneous fluctuation of baroreflex during head up tilt in unanesthetized rats. **Neurosci Lett**, v. 558, p. 1-7, Jan 13 2014. ISSN 1872-7972 (Electronic)

0304-3940 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24176880> >.

DIEDRICH, A. et al. Acute effects of simulated microgravity on heart rate variability. **J Gravit Physiol**, v. 1, n. 1, p. P35-6, May 1994. ISSN 1077-9248 (Print)

1077-9248 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11538755> >.

DYCKMAN, D. J.; SAUDER, C. L.; RAY, C. A. Effects of short-term and prolonged bed rest on the vestibulosympathetic reflex. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 302, n. 1, p. H368-74, Jan 1 2012. ISSN 1522-1539 (Electronic)

0363-6135 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22021328> >.

FERGUSON, A. V.; WASHBURN, D. L.; LATCHFORD, K. J. Hormonal and neurotransmitter roles for angiotensin in the regulation of central autonomic function. **Exp Biol Med (Maywood)**, v. 226, n. 2, p. 85-96, Feb 2001. ISSN 1535-3702 (Print)

1535-3699 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11446443> >.

FORTRAT, J. O.; SOMODY, L.; GHARIB, C. Autonomic control of cardiovascular dynamics during weightlessness. **Brain Res Brain Res Rev**, v. 28, n. 1-2, p. 66-72, Nov 1998. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9795141> >.

GALANIS, D. S. et al. Cardiovascular and pulmonary adaptations during short-term 15 degrees and 30 degrees head-down posture in healthy male volunteers. **Hellenic J Cardiol**, v. 54, n. 4, p. 273-80, Jul-Aug 2013. ISSN 2241-5955 (Electronic) 1109-9666 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23912919> >.

GEINAS, J. C. et al. Influence of posture on the regulation of cerebral perfusion. **Aviat Space Environ Med**, v. 83, n. 8, p. 751-7, Aug 2012. ISSN 0095-6562 (Print)

0095-6562 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22872988> >.

GUYENET, P. G. The sympathetic control of blood pressure. **Nat Rev Neurosci**, v. 7, n. 5, p. 335-46, May 2006. ISSN 1471-003X (Print)

1471-003X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16760914> >.

HAGIWARA, S.; BYERLY, L. Membrane biophysics of calcium currents. **Fed Proc**, v. 40, n. 8, p. 2220-5, Jun 1981. ISSN 0014-9446 (Print)

0014-9446 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7238906> >.

HAMAMURA, M.; ONAKA, T.; YAGI, K. Parvocellular neurosecretory neurons: converging inputs after saphenous nerve and hypovolemic stimulations in the rat. **Jpn J Physiol**, v. 36, n. 5, p. 921-33, 1986. ISSN 0021-521X (Print)

0021-521X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3031348> >.

HARDMAN, L., GILMAN. **Goodman and Gilman's The Basis of Therapeutics**. McGraw-Hill, New York, 2001.

HARGENS, A. R.; WATENPAUGH, D. E. Cardiovascular adaptation to spaceflight. **Med Sci Sports Exerc**, v. 28, n. 8, p. 977-82, Aug 1996. ISSN 0195-9131 (Print)

0195-9131 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8871907> >.

HECKMANN, J. G. et al. Transcranial Doppler sonography during acute 80 degrees head-down tilt (HDT) for the assessment of cerebral autoregulation in humans. **Neurol Res**, v. 21, n. 5, p. 457-62, Jul 1999. ISSN 0161-6412 (Print)

0161-6412 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10439426> >.

HERMAN, J. P.; MUELLER, N. K.; FIGUEIREDO, H. Role of GABA and glutamate circuitry in hypothalamo-pituitary-adrenocortical stress integration. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1018, p. 35-45, Jun 2004. ISSN 0077-8923 (Print)

0077-8923 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15240350> >.

HU, L. et al. Response and adaptation of bone cells to simulated microgravity. v. 104, n. 1, p. 396-408, 2014. Disponível em: < <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84908205548&partnerID=40&md5=5353320befee6772dfb499c13820d531> >.

IWASE, S.; NISHIMURA, N.; MANO, T. Role of sympathetic nerve activity in the process of fainting. **Front Physiol**, v. 5, p. 343, 2014. ISSN 1664-042X (Electronic)

1664-042X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25309444> >.

JONES, P. P. et al. Baroreflex buffering is reduced with age in healthy men. **Circulation**, v. 107, n. 13, p. 1770-4, Apr 8 2003. ISSN 1524-4539 (Electronic)

0009-7322 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12665501> >.

KAMIYA, A.; KAWADA, T.; SUGIMACHI, M. Systems physiology of the baroreflex during orthostatic stress: from animals to humans. **Front Physiol**, v. 5, p. 256, 2014. ISSN 1664-042X (Electronic)

1664-042X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25071601> >.

KATAFUCHI, T.; OOMURA, Y.; AOYAGI, K. Single neuron activity of rat hypothalamic paraventricular nucleus during body suspension. **Neurosci Lett**, v. 78, n. 3, p. 301-6, Aug 5 1987. ISSN 0304-3940 (Print)

0304-3940 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3627567> >.

KATAFUCHI, T.; YOSHIMATSU, H.; OOMURA, Y. Responses of lateral hypothalamic neurons to simulative hypogravic condition induced by body suspension. **Brain Res Bull**, v. 12, n. 1, p. 29-31, Jan 1984. ISSN 0361-9230 (Print)

0361-9230 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6713213> >.

KATZ, A. M. Ernest Henry Starling, his predecessors, and the "Law of the Heart". **Circulation**, v. 106, n. 23, p. 2986-92, Dec 3 2002. ISSN 1524-4539 (Electronic)

0009-7322 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12460884> >.

KENNEY, M. J.; WEISS, M. L.; HAYWOOD, J. R. The paraventricular nucleus: an important component of the central neurocircuitry regulating sympathetic nerve outflow. **Acta Physiol Scand**, v. 177, n. 1, p. 7-15, Jan 2003. ISSN 0001-6772 (Print)

0001-6772 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12492774> >.

KRETZ, R. Local cobalt injection: a method to discriminate presynaptic axonal from postsynaptic neuronal activity. **J Neurosci Methods**, v. 11, n. 2, p. 129-35, Jun 1984. ISSN 0165-0270 (Print)

0165-0270 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6090819> >.

KUYPERS, H. G.; MAISKY, V. A. Retrograde axonal transport of horseradish peroxidase from spinal cord to brain stem cell groups in the cat. **Neurosci Lett**, v. 1, n. 1, p. 9-14, Jul 1975. ISSN 0304-3940 (Print)

0304-3940 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19604744> >.

MARTIN, D. S.; HAYWOOD, J. R. Sympathetic nervous system activation by glutamate injections into the paraventricular nucleus. **Brain Res**, v. 577, n. 2, p. 261-7, Apr 17 1992. ISSN 0006-8993 (Print)

0006-8993 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1535018> >.

MARTIN, D. S.; SEGURA, T.; HAYWOOD, J. R. Cardiovascular responses to bicuculline in the paraventricular nucleus of the rat. **Hypertension**, v. 18, n. 1, p. 48-55, Jul 1991. ISSN 0194-911X (Print)

0194-911X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1860711> >.

MARTIN, J. H.; GHEZ, C. Pharmacological inactivation in the analysis of the central control of movement. **J Neurosci Methods**, v. 86, n. 2, p. 145-59, Jan 1999. ISSN 0165-0270 (Print)

0165-0270 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10065983> >.

MARTINS-PINGE, M. C. et al. Attenuated pressor responses to amino acids in the rostral ventrolateral medulla after swimming training in conscious rats. **Auton Neurosci**, v. 122, n. 1-2, p. 21-8, Oct 30 2005. ISSN 1566-0702 (Print)

1566-0702 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16139573> >.

MARTINS-PINGE, M. C. et al. Regulation of arterial pressure by the paraventricular nucleus in conscious rats: interactions among glutamate, GABA, and nitric oxide. **Front Physiol**, v. 3, p. 490, 2012. ISSN 1664-042X (Electronic)

1664-042X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23316170> >.

MIGHIU, A. S.; HEXIMER, S. P. Controlling Parasympathetic Regulation of Heart Rate: A Gatekeeper Role for RGS Proteins in the Sinoatrial Node. **Front Physiol**, v. 3, p. 204, 2012. ISSN 1664-042X (Electronic)

1664-042X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22707940> >.

MUELLER, P. J. et al. Proposed role of the paraventricular nucleus in cardiovascular deconditioning. **Acta Physiol Scand**, v. 177, n. 1, p. 27-35, Jan 2003. ISSN 0001-6772 (Print)

0001-6772 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12492776> >.

MUELLER, P. J. et al. Increased nitric oxide synthase activity and expression in the hypothalamus of hindlimb unloaded rats. **Brain Res**, v. 1115, n. 1, p. 65-74, Oct 18 2006. ISSN 0006-8993 (Print)

0006-8993 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16938283> >.

MUELLER, P. J. et al. Regulation of plasma vasopressin and renin activity in conscious hindlimb-unloaded rats. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 291, n. 1, p. R46-52, Jul 2006. ISSN 0363-6119 (Print)

0363-6119 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16469838> >.

MUSACCHIA, X. J.; STEFFEN, J. M.; DOMBROWSKI, J. Rat cardiovascular responses to whole body suspension: head-down and non-head-down tilt. **J Appl Physiol (1985)**, v. 73, n. 4, p. 1504-9, Oct 1992. ISSN 8750-7587 (Print)

0161-7567 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1447098> >.

NELSON, M. D. et al. Reductions in cerebral blood flow during passive heat stress in humans: partitioning the mechanisms. **J Physiol**, v. 589, n. Pt 16, p. 4053-64, Aug 15 2011. ISSN 1469-7793 (Electronic)

0022-3751 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21690194> >.

NEWTON, I. **Four letters from Sir Isaac Newton to Doctor Bentley containing some arguments in proof of a Deity**. London: R. and J. Dodsley., 1756.

NORESSON, E.; JONES, J. V.; HALLBACK, M. Haemodynamic changes during tilt after autonomic blockade in spontaneously hypertensive rats. **Cardiovasc Res**, v. 11, n. 6, p. 475-80, Nov 1977. ISSN 0008-6363 (Print)

0008-6363 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/603871> >.

OOMURA, Y.; KATAFUCHI, T. Neurophysiological responses in suspended animal models. **Physiologist**, v. 30, n. 1 Suppl, p. S106-8, Feb 1987. ISSN 0031-9376 (Print)

0031-9376 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3562601> >.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates**. New York: Academic Press, 1998.

RAFFAI, G. et al. Inverse-orthostasis may induce elevation of blood pressure due to sympathetic activation. **J Cardiovasc Pharmacol**, v. 47, n. 2, p. 287-94, Feb 2006. ISSN 0160-2446 (Print)

0160-2446 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16495768> >.

RUBINI, R. et al. Power spectrum analysis of cardiovascular variability monitored by telemetry in conscious unrestrained rats. **J Auton Nerv Syst**, v. 45, n. 3, p. 181-90, Dec 1993. ISSN 0165-1838 (Print)

0165-1838 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8106708> >.

SANDKUHLER, J.; MAISCH, B.; ZIMMERMANN, M. The use of local anaesthetic microinjections to identify central pathways: a quantitative evaluation of the time course and extent of the neuronal block. **Exp Brain Res**, v. 68, n. 1, p. 168-78, 1987. ISSN 0014-4819 (Print)

0014-4819 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3691692> >.

SAPER, C. B. et al. Direct hypothalamo-autonomic connections. **Brain Res**, v. 117, n. 2, p. 305-12, Nov 26 1976. ISSN 0006-8993 (Print)

0006-8993 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/62600> >.

SCHLENKER, E. et al. Cardiorespiratory and metabolic responses to injection of bicuculline into the hypothalamic paraventricular nucleus (PVN) of conscious rats. **Brain Res**, v. 895, n. 1-2, p. 33-40, Mar 23 2001. ISSN 0006-8993 (Print)

0006-8993 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11259757> >.

SCHRAGE, W. G. Not a search in vein: novel stimulus for vascular dysfunction after simulated microgravity. **J Appl Physiol (1985)**, v. 104, n. 5, p. 1257-8, May 2008. ISSN 8750-7587 (Print)

0161-7567 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18276902> >.

SEEDHOUSE, E. **Pulling G: Human Responses to High and Low Gravity**. Ontario: Springer, 2013.

SEPS, B.; BECKERS, F.; AUBERT, A. E. Heart rate variability during gravity transitions. **Comput Cardiol**, v. 29, p. 433-6, 2002. ISSN 0276-6574 (Print)

0276-6574 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14686451> >.

STOEBNER, R.; BELLIN, D. A.; HAIGNEY, M. C. Cardiac electrophysiology and the athlete: a primer for the sports clinician. **Curr Sports Med Rep**, v. 11, n. 2, p. 70-7, Mar-Apr 2012. ISSN 1537-8918 (Electronic)

1537-890X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22410697> >.

STRACK, A. M. et al. CNS cell groups regulating the sympathetic outflow to adrenal gland as revealed by transneuronal cell body labeling with pseudorabies virus. **Brain Res**, v. 491, n. 2, p. 274-96, Jul 10 1989. ISSN 0006-8993 (Print)

0006-8993 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2548665> >.

SWANSON, L. W.; KUYPERS, H. G. The paraventricular nucleus of the hypothalamus: cytoarchitectonic subdivisions and organization of projections to the pituitary, dorsal vagal complex, and spinal cord as demonstrated by retrograde fluorescence double-labeling methods. **J Comp Neurol**, v. 194, n. 3, p. 555-70, Dec 1 1980. ISSN 0021-9967 (Print)

0021-9967 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7451682> >.

SWANSON, L. W.; SAWCHENKO, P. E. Hypothalamic integration: organization of the paraventricular and supraoptic nuclei. **Annu Rev Neurosci**, v. 6, p. 269-324, 1983. ISSN 0147-006X (Print)

0147-006X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6132586> >.

TEN HARKEL, A. D.; VAN LIESHOUT, J. J.; WIELING, W. Effects of leg muscle pumping and tensing on orthostatic arterial pressure: a study in normal subjects and patients with autonomic failure. **Clin Sci (Lond)**, v. 87, n. 5, p. 553-8, Nov 1994. ISSN 0143-5221 (Print)

0143-5221 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7874844> >.

TERAI, C. et al. Effects of mild Trendelenburg on central hemodynamics and internal jugular vein velocity, cross-sectional area, and flow. **Am J Emerg Med**, v. 13, n. 3, p. 255-8, May 1995. ISSN 0735-6757 (Print)

0735-6757 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7755812> >.

TEZINI, G. C.; DIAS, D. P.; SOUZA, H. C. Aerobic physical training has little effect on cardiovascular autonomic control in aging rats subjected to early menopause. **Exp Gerontol**, v. 48, n. 2, p. 147-53, Feb 2013. Disponível em: <www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23201548>.

TRAON, A. P. et al. Cardiovascular responses to orthostatic tests after a 42-day head-down bed-rest. **Eur J Appl Physiol Occup Physiol**, v. 77, n. 1-2, p. 50-9, 1998. ISSN 0301-5548 (Print)

0301-5548 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9459521> >.

TRAON, A. P. L. et al. From space to Earth: advances in human physiology from 20 years of bed rest studies (1986-2006). **European Journal of Applied Physiology**, v. 101, n. 2, p. 143-194, Sep 2007. ISSN 1439-6319. Disponível em: < <Go to ISI>://000249240300001 >.

WEISE, F. et al. Effect of head-down tilt on cardiovascular control in healthy subjects: a spectral analytic approach. **Clin Sci (Lond)**, v. 88, n. 1, p. 87-93, Jan 1995. ISSN 0143-5221 (Print)

0143-5221 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7705007> >.

ZHANG, K.; PATEL, K. P. Effect of nitric oxide within the paraventricular nucleus on renal sympathetic nerve discharge: role of GABA. **Am J Physiol**, v. 275, n. 3 Pt 2, p. R728-34, Sep 1998. ISSN 0002-9513 (Print)

0002-9513 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9728069> >.