



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

OZAHYR DE ANDRADE

**PARTICIPAÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO NO NÚCLEO
PARAVENTRICULAR DO HIPOTÁLAMO (PVN) DURANTE
OS AJUSTES CARDIOVASCULARES EM MODELOS DE
ESTRESSE ORTOSTÁTICO EM RATOS ACORDADOS**

OZAHYR DE ANDRADE

**PARTICIPAÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO NO NÚCLEO
PARAVENTRICULAR DO HIPOTÁLAMO (PVN) DURANTE
OS AJUSTES CARDIOVASCULARES EM MODELOS DE
ESTRESSE ORTOSTÁTICO EM RATOS ACORDADOS**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Estadual de Londrina, para a obtenção do título de doutor.

Orientadora: Profa. Dra Marli Cardoso Martins Pinge (UEL)

Londrina
2015

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

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

A553p Andrade, Ozahyr de.
Participação do óxido nítrico no Núcleo Paraventricular do Hipotálamo (PVN) durante os ajustes cardiovasculares em modelos de estresse ortostático em ratos acordados / Ozahyr de Andrade. – Londrina, 2015.
179 f. : il.

Orientador: Marli Cardoso Martins Pinge.
Tese (Doutorado 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. Hipotálamo – Teses. 3. Óxido nítrico – Teses. 4. Pressão arterial – Teses. 5. Rato como animal de laboratório – Teses. I. Pinge, Marli Cardoso Martins. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas. III. Título.

CDU 612.1

OZAHYR DE ANDRADE

**PARTICIPAÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO NO NÚCLEO
PARAVENTRICULAR DO HIPOTÁLAMO (PVN) DURANTE OS
AJUSTES CARDIOVASCULARES EM MODELOS DE ESTRESSE
ORTOSTÁTICO EM RATOS ACORDADOS**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Estadual de Londrina, para a obtenção do título de doutor.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Marli Cardoso Martins
Pinge
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Rubens Fazan Júnior Prof.
Universidade de São Paulo – USP

Dr. Hugo Celso Dutra de Souza
Universidade de São Paulo – USP

Profa. Dra. Karen Barros P. Fernandes
Universidade Norte do Paraná – UNOPAR

Profa. Dra. Graziela Sciantti Ceravolo
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 19 de fevereiro de 2015.

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente a Deus por me dar força, resignação, paciência, compreensão, para me manter firme nesta longa trajetória.

À minha mãe Helena, pelo seu enorme carinho, amor e estímulo em toda minha formação pessoal e profissional e pelo seu incentivando para continuar firme em meu caminho.

Aos meus irmãos queridos, Edna, Aurélio, Enezy e Johara pelo constante apoio e carinho em nossos encontros, pelas conversas e trocas de experiências necessárias que me auxiliaram a lidar com as adversidades.

Aos meus sobrinhos Mariana, Arthur e Henrique pelas alegrias proporcionadas nos encontros em família, onde é possível sentir que “ser criança é uma das melhores partes da vida”.

A minha querida esposa Adriana, por depositar em mim a confiança e o amor necessários para permanecer ao meu lado em todos os momentos desta minha escolha, e por tornar mais suave esta longa trajetória.

À minha linda filha Isabela, que nasceu durante esse processo de aperfeiçoamento intelectual e que veio para me mostrar que a vida vai muito além disso.

Ao meu lindo filho Vinícius, que também chega durante a finalização de mais uma etapa deste projeto de vida, trazendo muita confiança e vontade para esse pai continuar.

À minha orientadora profa. Dra. Marli, por ter aberto as portas de seu laboratório, e permitido que eu pudesse aprender a fazer pesquisa.

Aos meus colegas de laboratório os quais tive o prazer de conhecer, pelas amizades que fizeram nosso trabalho ficar mais agradável.

A todos os professores que me auxiliaram nesses longos anos nos corredores deste departamento, pelas trocas de experiências e pelas dicas muito importantes.

Aos técnicos do departamento de Fisiologia da UEL pelo auxílio e pelas conversas que deixavam nossos dias mais alegres.

Aos meus animais (ratos) que foram de suma importância para o desenvolvimento deste projeto e contribuíram para mais um achado científico em prol da humanidade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro para a realização das minhas pesquisas.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) pelo suporte financeiro de parte das minhas pesquisas no exterior.

As coisas tangíveis

tornam-se insensíveis

à palma da mão.

Mas as coisas findas

Muito mais que lindas

essas ficarão.

Carlos Drummond de Andrade

Não sou obrigado a vencer, mas tenho o dever de ser verdadeiro. Não sou obrigado a ter sucesso, mas tenho o dever de corresponder à luz que tenho.

Abraham Lincoln

ANDRADE, Ozahyr de. **Participação do óxido nítrico no Núcleo Paraventricular do Hipotálamo (PVN) durante os ajustes cardiovasculares em modelos de estresse ortostático em ratos acordados.** Tese de doutorado. Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas. Centro de Ciências Biológicas. Departamento de Ciências Fisiológicas. Universidade Estadual de Londrina, 2015.

RESUMO

A manutenção da pressão arterial em níveis adequados é de extrema importância para a sobrevivência humana. Para isso o organismo lança mão de mecanismos reflexos que realizam esse controle o momento a momento, mandando informações periféricas para regiões do sistema nervoso central. Áreas como o núcleo do trato solitário, área rostral ventrolateral do bulbo, área caudal ventrolateral do bulbo e núcleo ambíguos, são bem conhecidas dentro da literatura como reguladoras do tonus da pressão arterial. Atualmente, diversas evidências tem demonstrado que o núcleo paraventricular (PVN) do hipotálamo está envolvido nas respostas reflexas cardiovasculares relacionados com o volume sanguíneo e que o óxido nítrico (NO) é um importante neuromodulador da função cardiovascular e autonômica no PVN. Assim, o principal objetivo deste trabalho foi avaliar a modulação cardiovascular e autonômica exercida pelo NO no PVN durante as situações agudas e crônicas ocasionadas pelos modelos de estresse ortostático. No primeiro estudo foram utilizados ratos Wistar adultos, com cânulas-guia direcionadas para o PVN e com cateteres na artéria e veia femoral. Os animais foram submetidos ao registro da pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) em estado consciente. Depois de parâmetros basais serem registrados, foi realizada a microinjeção bilateral no PVN de solução salina ou de DEA-NONOato, ou Nw-propyl-L-arginina ou 1400W antes da mudança postural ou o head-up tilt (HUT) . Nesse estudo os dados encontrados sugerem um envolvimento do óxido nítrico no PVN durante os ajustes cardiovasculares solicitados na mudança postural, principalmente durante a inibição da iNOS que atenuou as variações da pressão arterial e a frequência cardíaca, assim como uma diminuição do componente simpático durante a mudança postural. Em um segundo estudo, ratos Sprague-Dawley adultos foram suspensos pela cauda durante 14 dias (hindlimb unloaded), cânulas-guia direcionadas para o PVN e com cateteres na artéria e veia femoral além de um eletrodo no nervo renal. Os animais foram submetidos ao registro da pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) e do registro da atividade simpática do nervo renal em estado consciente. Durante a retomada das patas traseiras na caixa, foi realizada a microinjeção bilateral de L-NMMA no PVN. Nesse estudo, pudemos evidenciar um aumento do efeito tonico pelo óxido nítrico no PVN na regulação cardiovascular e autonômica. Em um terceiro estudo, utilizou-se ratos Wistar adultos, com artéria e veia femurais cateterizadas e com cânulas-guia direcionadas ao PVN para a microinjeção de Nw-Propyl-L-Arginina ou 1400W bilateralmente em ratos conscientes para em seguida realizar o head-down tilt (HDT).. Os dados encontrados nesse estudo sugerem a participação da via neuronal do óxido nítrico no PVN envolvido nas alterações de pressão arterial e autonômicas durante a manobra anti ortostática. Dessa maneira nossos dados sugerem uma participação diferenciada das isoformas da via nitrérgica no PVN durante as situações de mudança postural agudas e crônicas.

Palavras-chave: Núcleo paraventricular do Hipotálamo. Desafio postural agudo. Descondicionamento cardiovascular. Anti ortostase. Modulação autonômica. Sistema cardiovascular.

ANDRADE, Ozahyr de. **Nitric Oxide into the Hypothalamic Paraventricular Nucleus is involved in cardiovascular and autonomic modulations during different models of orthostatism in conscious rats.** Tese de doutorado. Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas. Centro de Ciências Biológicas. Departamento de Ciências Fisiológicas. Universidade Estadual de Londrina, 2015.

ABSTRACT

The maintenance of blood pressure at appropriate levels is of paramount importance for human survival. For this, organism makes use of reflex mechanisms that perform this control moment by moment, sending information from peripheral regions to the central nervous system. Areas such as the nucleus of the solitary tract, rostral ventrolateral medulla, caudal ventrolateral medulla and nucleus ambiguus are well known in the literature as the regulatory tonus of blood pressure. Recently, several evidences has shown that the paraventricular nucleus (PVN) of the hypothalamus is involved in cardiovascular reflex responses related to blood volume and nitric oxide (NO) is an important neuromodulator of autonomic cardiovascular function. Thus, the main objective of this study was to evaluate the cardiovascular and autonomic modulation exerted by NO in the PVN during acute and chronic models of postural challenge. In the first study adult male Wistar rats were used, with guide cannulas directed to the PVN and catheters in the femoral artery and vein were implanted to record mean arterial pressure (MAP) and heart rate (HR) in conscious state. After baseline parameters recordings, bilateral microinjection was performed into the PVN of saline or DEA-NONOate, or Nw-propyl-L-arginine, or 1400W, or Carboxy-PTIO prior to postural change or head-up tilt (HUT). Mean arterial pressure and heart rate spectral analysis of heart rate variability (HRV) were evaluated at baseline and during HUT. In this study, the data suggest an involvement of nitric oxide in the PVN during cardiovascular adjustments requested in postural change, especially during iNOS inhibition attenuated that the variations in blood pressure and heart frequency, as well as a decrease in the sympathetic component during the postural change. In a second study, Sprague-Dawley rats were suspended by the tail for 14 days (hindlimb unloaded), guide cannulas directed to the PVN and catheters in the femoral artery and vein as well as an electrode in the renal nerve were implanted to record mean arterial pressure (MAP) and heart rate (HR) and the sympathetic renal nerve activity (RSNA) in conscious state. Returning play with hind legs the ground, bilateral microinjection of L-NMMA in the PVN was performed in conscious rats. In this study, we observed a tonic increased effect by nitric oxide into the PVN in cardiovascular and autonomic modulation. In a third study, we used adult male Wistar rats and similar procedures were performed as in the first study. Bilateral microinjections of Nw-Propyl-L-Arginine or 1400W were administered into the PVN. An anti orthostatic maneuver was performed. Thus, this study suggests nNOS pathway into the PVN alters blood pressure and autonomic drive during head-down tilt. Thus, our data suggest a differential involvement of the nitric pathway in the PVN during acute and chronic postural changes.

Key-words: Hypothalamic paraventricular nucleus. Short-term orthostatism. Cardiovascular decoditioning. Anti orthostatism. Autonomic modulation. Cardiovascular system.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** – Histologia do tecido cerebral, evidenciando os sítios de microinjeção bilateral no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN). A: fotomicrografia de uma lâmina histológica do PVN e B: representação esquemática dos locais de microinjeção em secções rostral (1,4 mm) à caudal (2,12 mm) da região do PVN. As marcações em preto representam os pontos centrais de microinjeção no PVN. Os números indicam a distância posterior ao bregma para cada secção de acordo com o Atlas de Paxinos e Watson (1986). Abreviaturas: 3V, terceiro ventrículo; AH, hipotálamo anterior.63
- Figura 2** – Variações de pressão arterial média (PAM) e de frequência cardíaca (FC) no grupo tratado com DEA-NONOato quando comparado com o grupo controle66
- Figura 3** – Variações de pressão arterial média (PAM) e de frequência cardíaca (FC) no grupo tratado com Nw-Propyl-L-Arginina quando comparado com o grupo controle68
- Figura 4** – Variações de pressão arterial média (PAM) e de frequência cardíaca (FC) no grupo tratado com 1400w quando comparado com o grupo controle70
- Figura 5** – Efeito da microinjeção de salina (n = 7) ou 1400W (2 nmol, n = 6) ou Nw-Propil (4nmol, n=6) no PVN sobre mudanças da pressão arterial média (MAP) e da frequência cardíaca (FC) durante o HUT (pico de resposta do HUT menos o último minuto de contensão)72
- Figura 6** – Parâmetros espectrais de pressão arterial sistólica dos grupos tratado com DEA-nonoato, Nw-Propyl e 1400w em comparação com o grupo controle74
- Figura 7** – Parâmetros espectrais de intervalo de pulso dos grupos tratado com DEA-nonoato, Nw-Propyl e 1400w em comparação com o grupo controle).....75
- Figura 8** – Efeito do tratamento com salina, DEA-nonoato, 1400W e Nw-propil-L-Arginina no PVN de ratos nas flutuações espontâneas de

	reflexo barorreceptor durante o período basal e o head-up tilt (HUT).....	77
Figura 9	– Fotomicrografia representativa dos sítios de microinjeção bilateral no núcleo paraventricular (PVN) do hipotálamo de um rato individual.....	79
Figura 10	– Traçados típicos de pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC) em um exemplo de um registro original do grupo experimental.....	83
Figura 11	– Traçados típicos de um curto período (2 min) do registro de atividade nervosa simpática renal cru e integrada de um grupo experimental original de um registro original do grupo experimental. Grupo controle L-NMMA.....	84
Figura 12	– Traçados típicos de pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC) em um exemplo de um registro original do grupo experimental. Grupo Hindlimb Unloaded L-NMMA.....	86
Figura 13	– Traçados típicos de um curto período (2 min) do registro de atividade nervosa simpática renal cru e integrada de um grupo experimental original de um registro original do grupo experimental. Grupo controle L-NMMA.....	87
Figura 14	– Efeitos da microinjeção bilateral de aCSF no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) na PAM, FC e RSNA em ratos conscientes.....	89
Figura 15	– Efeitos do bloqueio bilateral com L-NMMA do núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) na PAM, FC e RSNA em ratos conscientes.....	90
Figura 16	– Confirmação histológica do tecido cerebral, fotomicrografia de uma lâmina histológica evidenciando os sítios de microinjeção bilateral no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN).....	91
Figura 17	– Variações de pressão arterial média (PAM) e de frequência cardíaca (FC) ao longo do tempo no grupo tratado com Nw-Propyl-L-Arginina quando comparado com o grupo controle.....	94

Figura 18 – Variações de pressão arterial média (PAM) e de frequência cardíaca (FC) ao longo do tempo no grupo tratado com 1400W quando comparado com o grupo controle.....	96
Figura 19 – Efeito da microinjecção de salina (n = 7) ou 1400W (2 nmol, n = 6) ou NW-Propil (4 nmol, n = 6) no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) nos parâmetros cardiovasculares de pressão arterial média (PAM) e de frequência cardíaca (FC) durante o HDT (último minuto de contenção em relação ao pico de resposta do HUT)	98
Figura 20 – Parâmetros espectrais de pressão arterial sistólica dos grupos tratado com Nw-Propyl e 1400w em comparação com o grupo controle	100
Figura 21 – Parâmetros espectrais de intervalo de pulso dos grupos tratado com Nw-Propyl e 1400w em comparação com o grupo controle	101
Figura 22 – Efeito do tratamento com salina, 1400W e Nw-propil-L-Arginina no PVN de ratos nas flutuações espontâneas de reflexo barorreceptor durante o período basal e o head-down tilt (HUT). Gráfico mostra o índice de efetividade do barorreflexo (BEI) e o ganho total do barorreflexo	103

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Valores basais de pressão arterial média (PAM mmHg) e frequência cardíaca (FC bpm) de todos os grupos experimentais antes e após-tratamento farmacológico.....64
- Tabela 2** – Peso corporal, músculos, da glândula adrenal, valores de PAM e FC em repouso81
- Tabela 3** – Valores basais de pressão arterial média (PAM mmHg) e frequência cardíaca (FC bpm) de todos os grupos experimentais antes e após-tratamento farmacológico.....92

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADH	Hormônio anti-diurético
AMPA	Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico
Ang	Angiotensina
ANSL	Atividade Nervosa Simpática Lombar
AT1	Receptor de Angiotensina II do subtipo AT1
AOGEN	Angiotensinogênio
A5	Área A5
DMH	Hipotálamo Dorsomedial
ECA	Enzima Conversora de Angiotensina
FC	Frequência Cardíaca
GABA	Ácido γ -aminobutírico
GABA _A	Receptor GABA do tipo A
GLU	Glutamato
HF	Alta frequência
HU	Hindlimb Unloaded
HUT	Head-up Tilt
HDT	Head-down Tilt
IML	Intermediolateral
LF	Baixa frequência
NOS	Óxido Nítrico Sintase
nNOS	Óxido Nítrico Sintase Neuronal
iNOS	Óxido Nítrico Sintase Induzida
eNOS	Óxido Nítrico Sintase Endotelial
NTS	Núcleo do trato solitário
NMDA	<i>N</i> -metil-D-aspartato
NO	Óxido Nítrico
NSP	Núcleo supra-óptico
OVLT	Órgão Vasculoso da Lâmina Terminal
PA	Pressão Arterial
PAP	Pressão Arterial Pulsátil
PAM	Pressão Arterial Média
IP	Intervalo de Pulso

PVN	Núcleo Paraventricular do Hipotálamo
RSNA	Atividade Simpática do nervo renal
RVLM	Área Rostro Ventrolateral do Bulbo
RVMM	Área Rostroventromedial do Bulbo
RVP	Resistência Vascular Periférica
SNC	Sistema Nervoso Central
SNA	Sistema Nervoso Autônomo
SNS	Sistema Nervoso Simpático
SRA	Sistema Renina - Angiotensina
TILT	Manobra Ortostática
VFC	Variabilidade da Frequência Cardíaca
VLF	Muito Baixa Frequência

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
1.1	Controle cardiovascular durante o ortostatismo	19
1.2	Grupamentos dos neurônios premotores simpáticos envolvidos no controle da pressão arterial	20
1.3	O núcleo paraventricular do hipotálamo e a manutenção do tônus simpático e da pressão arterial	22
1.4	O núcleo paraventricular do hipotálamo e o óxido nítrico	26
1.5	O PVN na regulação da volemia	27
1.6	Modelos para avaliar os parâmetros cardiovasculares durante o estresse ortostático	28
1.6.1	Head-up tilt	28
1.6.2	Hindlimb-Unloaded	30
1.6.3	Head-down tilt	31
2	JUSTIFICATIVA	32
3	OBJETIVOS	33
3.1	Objetivo Geral	33
3.2	Objetivos Específicos	33
4	MATERIAIS E MÉTODOS	35
4.1	Estudo I - Head-up tilt	35
4.1.2	Animais	35
4.1.3	Implante de cânulas-guia direcionadas ao PVN	36
4.1.4	Cateterização da artéria e veia femorais	37
4.1.5	Registro da pressão arterial e da frequência cardíaca	38
4.1.6	Protocolo experimental	39
4.1.7	Marcação e histologia do cérebro	40
4.1.8	Variabilidade da pressão arterial (PA) e da frequência cardíaca (FC)	41
4.1.9	Análise da sensibilidade do barorreflexo espontâneo	42
4.1.10	Análise estatística	43

4.2	Estudo II - Hindlimb Unloaded	44
4.2.1	Animais	44
4.2.3	Hindlimb unloaded	44
4.2.4	Implante de cânulas-guia direcionadas ao PVN	45
4.2.5	Cateterização da artéria e veia femorais	46
4.2.6	Implante de eletrodo no nervo renal	47
4.2.7	Registro da pressão arterial e da frequência cardíaca	48
4.2.8	Registro da atividade simpática do nervo renal	49
4.2.9	Protocolo experimental	49
4.2.10	Marcação e histologia do cérebro	51
4.2.11	Análise estatística	52
4.3	Estudo III – Head-down tilt	53
4.3.1	Animais	53
4.3.2	Implante de cânulas-guia direcionadas ao PVN	54
4.3.3	Cateterização da artéria e veia femorais	55
4.3.4	Registro da pressão arterial e da frequência cardíaca	56
4.3.5	Protocolo experimental	57
4.3.6	Marcação e histologia do cérebro	58
4.3.7	Variabilidade da pressão arterial (PA) e da frequência cardíaca (FC)	59
4.3.8	Análise da sensibilidade do barorreflexo espontâneo	60
4.3.9	Análise estatística	61
5	RESULTADOS	62
5.1	Estudo I – Head-Up Tilt	62
5.1.1	Confirmação histológica dos sítios de microinjeção	62
5.1.2	Pressão arterial média e frequência cardíaca basal dos 4 grupos	64
5.1.3	Efeitos cardiovasculares após microinjeção de salina e Dea-NONOato no PVN durante o estresse ortostático	65
5.1.4	Efeitos cardiovasculares após microinjeção de salina e Nw-Propyl-L-Arginina no PVN durante a restrição e a mudança postural	67

5.1.5	Efeitos cardiovasculares após microinjeção de salina e 1400W no PVN durante o a restrição e o mudança postural	69
5.1.6	Variação da pressão arterial média e da frequência durante a mudança postural.....	71
5.1.7	Análise espectral do intervalo de pulso e da pressão arterial sistólica durante a mudança postural	73
5.1.8	Análise da sensibilidade do barorreflexo.....	76
5.2	Estudo II – Hindlimb Unloaded	78
5.2.1	Confirmação histológica dos sítios de microinjeção	78
5.2.2	Análise dos parâmetros corporais e cardiovasculares do modelo Hindlimb unloaded	80
5.2.3	Traçado típico de um animal controle, e logo após a microinjeção de L-NMMA bilateralmente no PVN.....	82
5.2.4	Registro da atividade nervosa simpática renal	84
5.2.5	Traçado típico de um animal Hindlimb Unloaded, e logo após a microinjeção de L-NMMA bilateralmente no PVN.....	85
5.2.5	Registro da atividade nervosa simpática renal	87
5.2.6	Variação da pressão arterial média, da frequência cardíaca e da atividade nervosa simpática renal de animais controle e hindlimb unloaded.....	88
5.3	Estudo III – Head-Down Tilt.....	91
5.3.1	Confirmação histológica dos sítios de microinjeção	91
5.3.2	Pressão arterial média e frequência cardíaca basal dos 4 grupos	92
5.3.3	Efeitos cardiovasculares após microinjeção de salina e NW-Propyl-L-Arginina no PVN durante o head down tilt	93
5.3.4	Efeitos cardiovasculares após microinjeção de salina e 1400W no PVN durante o head down tilt	95
5.3.5	Variação da pressão arterial média e da frequência durante a manobra antiortostática “head down tilt”	97
5.3.6	Análise espectral do intervalo de pulso e da pressão arterial sistólica durante a manobra antiortostática	99
5.3.7	Análise da sensibilidade do barorreflexo.....	102

6	DISCUSSÃO	104
6.1	Estudo I – Head-Up Tilt.....	104
6.2	Estudo II- Hindlimb Unloaded.....	109
6.3	Estudo III – Head-Down Tilt.....	112
7	CONCLUSÃO GERAL	117
	REFERÊNCIAS	118
	ANEXOS	129
9.1	Artigo I	130
9.2	Artigo II	156

1. INTRODUÇÃO

1.1 Controle cardiovascular durante o ortostatismo

Para sobreviver na Terra, todas as espécies devem possuir a habilidade de regular momento a momento as alterações dos parâmetros fisiológicos, permitindo que seu ambiente interno permaneça estável apesar das mudanças bruscas no ambiente externo. Nos seres humanos, esta homeostase é alcançada por reflexos neurais e endócrinos os quais são coordenados pelo sistema nervoso central (SNC) (VERHEYDEN, 2007).

A adoção da postura ortostática promove um grande desafio para o controle da pressão arterial. A ação da gravidade afeta a distribuição de fluido circulante, levando a um aumento do volume sanguíneo nas regiões mais inferiores do corpo, cerca de 300 ml a 800 ml são represados na região esplâncnica, pélvica e na vasculatura das pernas durante uma mudança postural, levando a uma diminuição do retorno venoso e do débito cardíaco (ROWELL, 1993).

Um dos principais papéis do sistema nervoso autônomo (SNA) em humanos, principalmente o sistema nervoso simpático (SNS), é a manutenção dos níveis de pressão arterial após um desafio ortostático. 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 aos vasos sanguíneos. O resultado é manifestado como uma mudança na frequência cardíaca (FC), contratilidade do miocárdio, capacitância venosa e

resistência nas arteríolas. A manutenção de uma pressão arterial em níveis normais é de fundamental importância para manter a perfusão de órgãos importantes como o cérebro e o próprio coração, entre outros (ROWELL, 1993; VERHEYDEN, 2007).

1.2 Grupamentos dos neurônios premotores simpáticos envolvidos no controle da pressão arterial

O Sistema Nervoso Simpático (SNS) desempenha um papel fundamental na manutenção da homeostase do organismo sob condições normais ou sob condições de estresse agudo ou crônico (KENNEY et al., 2003). O tônus simpático, particularmente para o sistema cardiovascular, é gerado por descargas simpáticas originadas em áreas específicas do tronco encefálico. Alguns dos grupamentos neuronais localizados nesta região do Sistema Nervoso Central (SNC), denominados neurônios premotores simpáticos, enviam projeções diretas para os neurônios pré-ganglionares simpáticos da coluna intermédio lateral da medula (IML) (DAMPNEY, 1994).

A coluna IML constitui uma das 4 regiões dentro da coluna torácica e lombar superior que contém os corpos celulares dos neurônios pré-ganglionares simpáticos, mediadores do tônus simpático para o organismo (DAMPNEY, 1994; KENNEY et al., 2003; DAMPNEY et al., 2003). Historicamente o estudo de AMENDT et al. (1979) foi pioneiro em demonstrar a existência de grupamentos neuronais que regulam o fluxo simpático para a coluna IML e daí para os principais gânglios simpáticos e medula adrenal em ratos. Estudos posteriores, utilizando a técnica de traçador transneuronal retrógrado (JANSEN et al., 1995) possibilitaram a

identificação de pelo menos 5 grupos de neurônios premotores simpáticos conforme pode ser observado na Figura 1. Fazem parte desses grupos a área Rostroventrolateral do bulbo (RVLM), área Rostroventromedial (RVMM), Núcleo Caudal da Rafe, Área A5 (A5) e o Núcleo Paraventricular do Hipotálamo (PVN) (DAMPNEY, 1994). Dentre estes, o PVN desempenha um importante papel na manutenção do tônus simpático direcionado para o sistema cardiovascular, e por ser foco deste estudo, será descrito em detalhe.

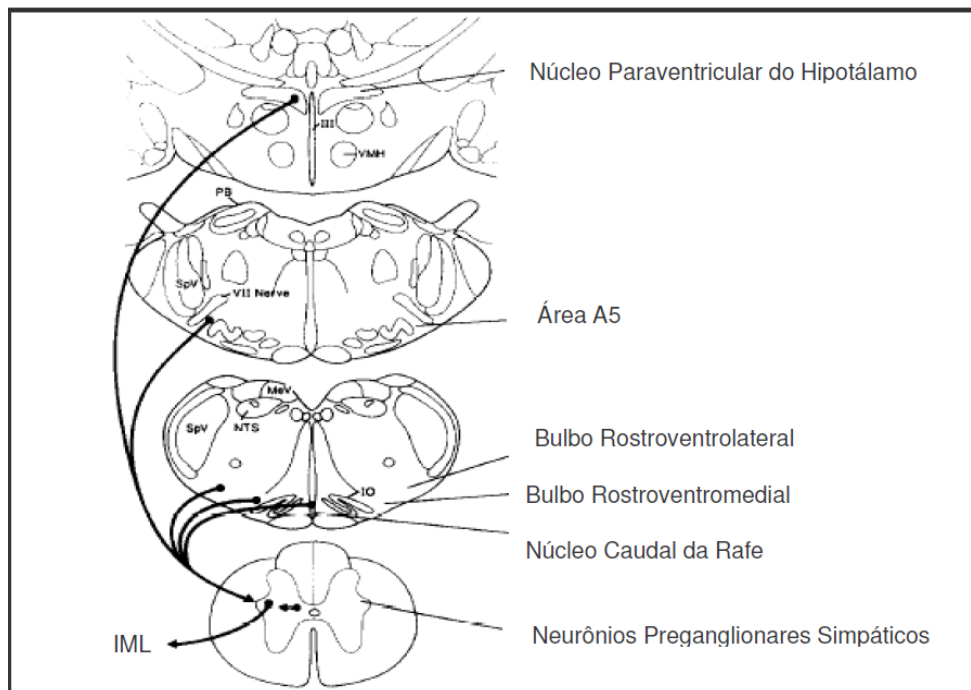


Figura 1- Esquema ilustrativo da localização dos 5 principais grupos de neurônios premotores simpáticos do SNC e suas projeções para os neurônios preganglionares simpáticos da coluna IML. Adaptado de DAMPNEY, *Physiological Review* vol. 74, n°2, April, 1994.

1.3 O núcleo paraventricular do hipotálamo e a manutenção do tônus simpático e da pressão arterial

O PVN localiza-se bilateralmente ao terceiro ventrículo, e pode ser dividido em duas regiões principais compostas por neurônios magnocelulares e neurônios parvicelulares. Os neurônios magnocelulares localizam-se nas porções laterais do PVN e são especializados na síntese de vasopressina (ADH) e ocitocina. Estes hormônios são transportados através de projeções axonais até a hipófise posterior, onde são liberados na circulação. Dessa forma o PVN participa do controle neuroendócrino. Os neurônios parvicelulares localizam-se medialmente e constituem uma população heterogênea de neurônios, contendo múltiplos neurotransmissores destinados a realização de diversas funções. Parte desses neurônios, especificamente aqueles localizados na porção dorsal e ventral da região parvocelular, projetam-se para outras regiões do SNC envolvidas no controle das funções autonômicas, como o RVLM e a coluna IML (BLAIR et al., 1996; BADOER, 2001).

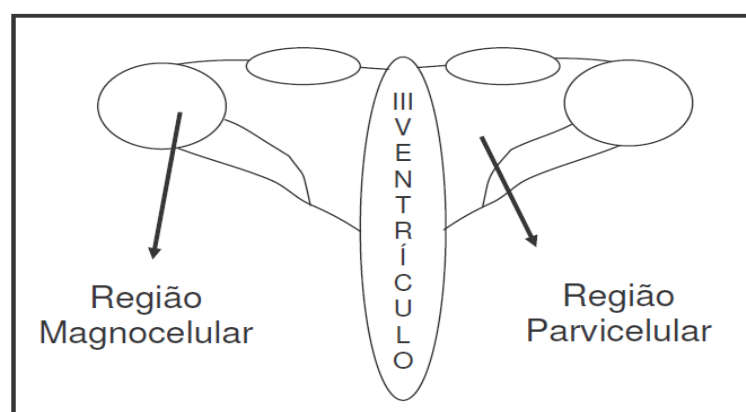


Figura 2- Desenho ilustrando a divisão do PVN em duas regiões distintas: região magnocelular e parvicelular. Adaptado de BLAIR et al., *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 23: 161-165, 1996.

Os neurônios do PVN que enviam projeções para os neurônios da RVLM têm sido alvo de muitos estudos, devido à importância deste núcleo na regulação simpática do sistema cardiovascular (DAMPNEY, 1994). A área RVLM é uma região crítica para a manutenção do tônus simpático e dos níveis basais de pressão arterial (PA) (GUERTZENSTEIN & SILVER, 1974; DAMPNEY, 1994). Estudos com traçador neuronal anterógrado, mostraram que as células da RVLM enviam projeções para núcleos pré-motores simpáticos específicos e para os neurônios pré-ganglionares simpáticos em todos os níveis da coluna IML, podendo assim exercer um potente e difuso controle do fluxo simpático (DAMPNEY et al., 1987; ROSS et al., 1984).

Badoer (2001) demonstrou que a maioria dos neurônios de um dos lados do PVN projeta-se para a RVLM ipsilateral, sendo que a maior concentração de neurônios relacionados a esta projeção, encontram-se na porção rostro-dorsal do PVN. Badoer (2001) observou ainda, que a distribuição dos neurônios do PVN que enviam projeções para a coluna IML foi bastante similar, possibilitando afirmar pela primeira vez que existem neurônios do PVN que enviam projeções tanto para a área RVLM quanto para neurônios pré-ganglionares simpáticos da coluna IML, inclusive aqueles que se projetam para o coração, medula adrenal e rins (SAWCHENKO & SWAMSON, 1983; STRACK et al., 1989).

Dessa forma, os neurônios do PVN podem influenciar o tônus simpático através de suas conexões diretas com a coluna IML indiretamente, através de suas conexões com a área RVLM, que subsequentemente também inerva a coluna IML, e ainda das duas formas simultaneamente (BADOER, 2001; BLAIR et al. 1996, SWANSON & MCKELLAR, 1979; SWANSON & SAWCHENKO, 1980; TAILOR &

WEAVER, 1992). Quanto às aferências, sabe-se que os neurônios do PVN recebem projeções de várias áreas envolvidas na regulação do sistema cardiovascular (DAMPNEY, 1994).

O núcleo do Trato Solitário (NTS), uma área envolvida com a regulação reflexa da PA, envia projeções primariamente para neurônios da região parvicelular, enquanto que a RVLM envia projeções tanto para os neurônios da região parvicelular quanto da magnocelular (CUNNINGHAM & SAWCHENKO, 1988; CUNNINGHAM et al., 1990; SWANSON & SAWCHENKO, 1983). Estas conexões neuroanatômicas permitem que informações determinantes ao sistema cardiovascular oriundas do NTS e RVLM, áreas críticas envolvidas na regulação reflexa da PA, sejam provavelmente moduladas pelos neurônios do PVN (BLAIR et al., 1996; DAMPNEY, 1994). O PVN recebe ainda aferências de outras áreas hipotalâmicas importantes na regulação cardiovascular, como o Hipotálamo Dorsomedial (DMH), um núcleo envolvido na resposta cardiovascular ao estresse (DIMICCO e cols., 2002).

Além das inter-relações dos neurônios do PVN com outras áreas do SNC envolvidas na regulação autonômica, o PVN tem sido implicado em funções diversas como o controle da osmolaridade, temperatura, termogênese e secreção de hormônios (MARTIN & HAYWOOD, 1992). Dessa forma o PVN pode ser reconhecido como um local de integração de respostas autonômicas, neuroendócrinas, e comportamentais (SWANSON & SAWCHENKO, 1980; BLAIR et al., 1996), exibindo um grande número de neurotransmissores inibitórios e excitatórios para a realização destas funções (SWANSON & SAWCHENKO, 1983).

Numerosos estudos têm sido realizados com o objetivo de avaliar os efeitos de diferentes neurotransmissores na região do PVN sobre os níveis de atividade eferente simpática e no controle cardiovascular (KENNEY et al., 2003).

A maioria dos neurotransmissores presentes no SNC são encontrados no PVN. Entre estes, o ácido gama-aminobutírico (GABA) (ZHANG & PATEL, 1998; ZHANG et al, 2002; ALLEN, 2002) e o óxido nítrico (NO) atuam como mediadores inibitórios no PVN para influenciar respostas cardiovasculares, enquanto que o glutamato (GLU) (BAINS & FERGUSON, 1997 a, b) e angiotensinas (Ang II) (Li & FERGUSON, 1996; PFISTER et al., 1997) exercem efeitos excitatórios sobre reflexos cardiovasculares e atividade simpática reflexa (MIYAWAKI et al., 1996).

Os mecanismos GABAérgicos quando alterados podem resultar em modificações dos níveis de atividade simpática. O bloqueio GABAérgico no PVN promove elevação acentuada de descargas simpáticas, indicando que existe uma potente inibição tônica simpática, mediada por GABA nesta região (LI & PATEL, 2003). Isto foi evidenciado através de estudos em que a desinibição do PVN através da microinjeção do antagonista do receptor GABA_A, bicuculina, promoveu uma elevação acentuada de descarga simpática e dos níveis de PA e FC (MARTIN et al., 1991; KANNAN et al., 1988; CHEN & TONEY, 2003). Por outro lado, a inibição do PVN com muscimol, um agonista do receptor GABA_A, reduziu os níveis de atividade simpática e de PA em animais normotensos anestesiados (ALLEN, 2002). ALLEN (2002) demonstrou inclusive, que sub-regiões do PVN apresentam um efeito mais pronunciado de redução destas variáveis quando inibidas por agonista de receptor GABA_A. Quanto mais próximas ou dentro do PVN forem as microinjeções, mais

acentuado é o efeito de inibição simpática e cardiovascular demonstrando que este efeito deve-se à interação do muscimol com os receptores GABA_A no PVN, e não devido a um efeito inespecífico (ALLEN, 2002).

1.4 O núcleo paraventricular do hipotálamo e o óxido nítrico

O NO é considerado como um neurotransmissor atípico conhecido por desempenhar um importante papel no PVN em estudos *in vivo* e *in vitro* (HORN et al., 1994; STERN et al., 2003 E MARTINS-PINGE et al., 2013), assim como o seu envolvimento no controle da atividade simpática (ZHANG et al., 1997;. ZHANG e PATEL, 1998). Estudos descrevem a participação do NO no PVN e a sua relação com o sistema cardiovascular. Bains e Ferguson (1994) observaram que o NO age no PVN inibindo a liberação de angiotensina e dessa forma atenuando a pressão arterial, assim como Horn et al. (1994) observaram que o NO aumenta a liberação de determinados aminoácidos no PVN e levando a diminuição da pressão arterial. Outros trabalhos demonstram que o sistema nitrérgico endógeno no PVN produz diminuição da atividade nervosa simpática renal (ZHANG et al., 1997; LI et al., 2003). Além disso, o NO no PVN exerce um importante papel modulando a atividade nervosa simpática renal, e na regulação da excreção de sódio e água durante o reflexo de volume (LI et al., 2003) .

Algumas evidências sugerem que o NO é um neurotransmissor inibitório no PVN (BAINS e FERGUSON, 1997), alterações na sinalização nitrérgica neste núcleo podem contribuir para os estados patológicos como o descondicionamento

cardiovascular (MUELLER et al., 2003), e evidências mais recentes mostraram a contribuição da glia na liberação de NO e a sua diminuição contribuindo para o mecanismo neurohumoral da insuficiência cardíaca (BIANCARDI et al., 2011). Além disso, tem-se sugerido que a intolerância ortostática possa ser influenciada por alterações endoteliais da óxido nítrico sintase, bem como a exposição à microgravidade ou o repouso prolongado levariam a redução do óxido nítrico nas artérias sistêmicas (VAZIRI et al., 2000), e níveis aumentados nas regiões do cérebro contribuindo para alterações nos ajustes cardiovasculares e autonômicos quando retomada a posição ortostática (MUELLER et al., 2005)..

1.5 O PVN na regulação da volemia

Numerosos estudos demonstram que mudanças na pressão arterial ocorrem em resposta à ativação do PVN. Ele recebe uma variedade de aferências, e os neurônios parvocelulares que se projetam para a espinha dorsal respondem a numerosos estímulos cardiovasculares. Estudos eletrofisiológicos sugerem que os neurônios do PVN são baro-sensíveis, e respondem a mudanças do volume de sangue (MUELLER *et al.*, 2003). Estudos realizados em ratos, usando proteínas Fos para identificar neurônios ativados no cérebro sugerem que os neurônios no PVN com projeções para a coluna intermédio-lateral ou para a RVLM podem ser ativados por quedas no volume sanguíneo (BADOER *et al.*, 1993). O PVN expressa a proteína Fos em resposta a mudanças na pressão arterial (MUELLER, *et al.*, 2003). Segundo estudos realizados por BADOER em 2001, uma hemorragia severa em que 20-25% do volume de sangue foi retirado e a pressão arterial foi reduzida

drasticamente, houve um aumento significativo na ativação de neurônios do PVN que expressam Fos.

Alguns trabalhos do nosso laboratório evidenciaram a participação do núcleo paraventricular do hipotálamo nas respostas cardiovasculares às mudanças posturais em ratos não anestesiados quando realizado o bloqueio deste núcleo revelando uma contínua queda da pressão arterial durante o desafio ortostático (De ANDRADE *et al.*, 2012; 2014). Dessa forma, é provável que neurônios do PVN participem das respostas compensatórias do sistema cardiovascular devido às mudanças posturais, quando a pressão arterial e o volume de sangue ao nível dos corpos carotídeos diminuem, como ocorre durante a manobra de “head up tilt”.

1.6 Modelos para avaliar os parâmetros cardiovasculares durante o estresse ortostático

1.6.1 “Head-up tilt”

Os testes de ortostatismo (tilt) em humanos, como a prancha de inclinação, promovem decréscimos no retorno venoso e no débito cardíaco que resultam em aumentos reflexos na FC e na resistência vascular periférica (RVP) através das vias barorreflexas arteriais e cardiopulmonares, permitindo a manutenção da pressão arterial durante o desafio ortostático. Respostas autonômicas normais devido à ortostase parecem envolver um equilíbrio entre a atividade vagal cardíaca eferente e atividade simpática para o coração e vasculatura (balanço simpato-vagal) (BAHJAQUI-BOUHADDI *et al.*, 2000; PARKER-JONES *et al.*, 2003). Dessa forma, o

aumento reflexo da FC com o “tilt” envolve um decréscimo da atividade parassimpática e um aumento da atividade simpática para o coração.

A maioria dos protocolos com animais usados nos estudos de ortostatismo foram realizados com o animal em um estado anestesiado, que embora tenha a vantagem de minimizar a variabilidade cardiovascular dos animais não anestesiados, devido à interferência da anestesia, são conhecidos por alterar os padrões das respostas cardiovasculares reflexas (MAGGI & MELI, 1986). Até o momento apenas poucos estudos foram conduzidos em modelos animais no estado não anestesiado. RAFFAI e colaboradores. (2005) observaram que a manobra postural em animais (head-up tilt) promoveu um aumento do pico pressórico o qual foi atenuado com o tratamento com prazosin, e que em ratos conscientes respondem a ortostase sustentada com aumento do pico pressórico provavelmente como um resultado do aumento da atividade simpática. Em outro trabalho (RAFFAI et al., 2006) foi demonstrado que ratos não anestesiados respondem ao head-down tilt com uma elevação sustentada da pressão sanguínea independente da síntese de NO. No trabalho de BEDETTE e colaboradores (2008), os autores mostraram que ambos os tratamentos com losartan e telmisartan, antagonistas dos receptores AT1, promovem uma significativa resposta hipotensiva após o tilt.

1.6.2 “Hindlimb-Unloaded”

Indivíduos que permanecem muito tempo em missões espaciais ou aqueles que permanecem acamados por longos períodos de tempo, apresentam várias alterações fisiológicas, incluindo uma mudança central nos fluidos corporais, seguida por uma redução do volume de sangue e de plasma total e atrofia muscular são bem conhecidos após a exposição prolongada a microgravidade ou repouso acamado em humanos (CHOBANIAN et al., 1974; BUCKEY et al., 1996; FRITSCH-YELLE 1994). Quando ocorre o retorno ao ambiente de 1G ou à atividade normal, esses indivíduos podem exibir taquicardia de repouso, diminuição da capacidade de exercício e aumento da incidência de intolerância ortostática (SHELLOCK et al., 1985; OVERTON et al., 1989; OVERTON et al., 1990; MARTEL et al., 1996).

Os mecanismos que explicam essas mudanças ainda não estão solucionados, embora a atrofia cardíaca, reatividade vascular alterada, hipovolemia e controle barorreflexo alterado de atividade nervosa simpática tenham sido sugeridos (COVERTINO et al., 1990; FORTNEY et al., 1996; PAWELCZYK et al., 2001). O hindlimb unloaded (HU) em ratos é um modelo que apresenta várias alterações observadas em humanos expostos à microgravidade ou repouso prolongado, como: taquicardia de repouso, redução da capacidade de exercício e intolerância ortostática. Alguns estudos mostraram que as alterações no sistema do NO periférico e central podem contribuir de forma importante na regulação cardiovascular (MUELLER et al., 2003, 2005).

1.6.3 “Head-down tilt”

Com o desenvolvimento da medicina espacial nas últimas décadas, houve grande interesse em investigar as adaptações fisiológicas que ocorrem em indivíduos expostos à situações que mimetizam a microgravidade. Mudanças orgânicas e sistêmicas como cardiovasculares podem levar à intolerância ortostática, e possivelmente essa alteração seja devido a redução da resposta do barorreflexo (COVERTINO, 1990; FRITSCH, 1992).

Quando um indivíduo assume a posição antiortostática, ocorre uma modificação nos fluidos corporais levando a aumento do retorno venoso e do volume de ejeção, da mesma forma, ocorrendo aumento da pressão arterial sistólica imediatamente após assumir o head-down tilt (HDT) (RAFFAI et al., 2006), ao mesmo tempo em que ocorre diminuição da frequência cardíaca (BUTLER, 1990). Embora os efeitos hemodinâmicos e reflexos sejam bem conhecidos, possíveis participações de áreas do sistema nervoso central relacionadas com a volemia ainda não estão bem esclarecidas durante situações anti ortostáticas a curto prazo.

2. JUSTIFICATIVA

Embora os mecanismos responsáveis pela ativação do sistema nervoso simpático nas respostas compensatórias à mudança postural estejam bem compreendidos, o envolvimento de áreas do sistema nervoso central e os possíveis neurotransmissores envolvidos nessas respostas ainda não são conhecidos totalmente. Trabalhos anteriores do nosso laboratório mostraram a participação do núcleo paraventricular do hipotálamo na modulação da PA e do SNS durante a exposição a um desafio ortostático. No entanto, os possíveis neurotransmissores no PVN envolvidos nesses ajustes, ainda não foram elucidados. Também é sabido que o NO exerce uma importante modulação sobre os neurônios do PVN em situações fisiológicas e patológicas e parece possuir papéis diferentes dependendo da via pela qual sua produção foi ativada. Dessa forma, para este estudo pretendeu-se avaliar os efeitos do bloqueio seletivo das vias do óxido nítrico no PVN sobre os parâmetros cardiovasculares e autonômicos em diferentes modelos de estresse ortostático, tanto em situações agudas como crônicas. Tendo considerado a interferência da anestesia sobre a função cardiovascular, este estudo avaliou todos os parâmetros em animais não anestesiados.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

O objetivo principal deste estudo foi o de avaliar o envolvimento do óxido nítrico no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) durante as alterações cardiovasculares e autonômicas em ratos não anestesiados submetidos a diferentes modelos de mudança postural.

3.2 Objetivos Específicos

- 1- Evidenciar a participação do óxido nítrico no PVN, através de inibidores da óxido nítrico sintase nas compensações cardiovasculares durante o head-up tilt (HUT).
- 2- Avaliar a participação do sistema nervoso autônomo, através dos parâmetros espectrais da variabilidade da PA e da FC, nos ajustes cardiovasculares nos animais acordados e submetidos ao head-up tilt (HUT).
- 3- Evidenciar a participação do óxido nítrico no PVN, através do inibidor não específico da óxido nítrico sintase nas compensações cardiovasculares no modelo crônico que mimetiza microgravidade em animais acordados (hindlimb unloaded).

-
- 4- Avaliar a participação do sistema nervoso autônomo, através da atividade simpática do nervo renal, no modelo crônico que mimetiza microgravidade em animais acordados, “hindlimb unloaded” (HU).

 - 5- Evidenciar a participação do óxido nítrico no PVN durante os ajustes cardiovasculares na mudança postural anti ortostática pelo “head down tilt” (HDT).

 - 6- Avaliar a participação do sistema nervoso autônomo, através da análise espectral, durante os ajustes cardiovasculares na mudança postural anti ortostática pelo “head down tilt” (HDT).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Estudo I - Head-up tilt

O estudo I foi realizado no Departamento de Ciências Fisiológicas (CIF) do Centro de Ciências Biológicas (CCB) da Universidade Estadual de Londrina (UEL) no Brasil, 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. 5519.2012.22.

4.1.2 Animais

Para o estudo I foi utilizado ratos Wistar, pesando entre 330 e 350g, provenientes do biotério central da Universidade Estadual de Londrina. Os animais foram divididos aleatoriamente em 4 grupos experimentais: Salina, DEA-NONOato, 1400w, Nw-Propyl-L-Arginina. Os ratos foram mantidos no biotério do Departamento de Ciências Fisiológicas em gaiolas coletivas (máximo de 5 animais) à temperatura de 21°C, com ciclo claro/escuro de 12h. Água e ração padrão para animais de laboratório foram fornecidos “ad libitum”.

4.1.3 Implante de cânulas-guia direcionadas ao PVN

Este procedimento foi realizado em todos os animais de acordo com DE ABREU e colaboradores (2009). Inicialmente os ratos foram anestesiados com tribromoetanol (50 mg/kg i.p.), 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 forâmes bilaterais e eqüidistantes da linha média, para o implante das cânulas-guia, cujas coordenadas estereotáxicas (PAXINOS e 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 encaixe 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, foi introduzido nas mesmas um ocluser. Em seguida, o animal foi retirado do aparelho estereotáxico e como medida profilática, após a cirurgia cerebral foi administrada uma dose de penicilina por via intramuscular. Em seguida, o animal retornou ao biotério e lá permaneceu por 5 dias para recuperação da cirurgia.

4.1.4 Cateterização da artéria e veia femorais

Após os 5 dias de recuperação (24 horas antes dos experimentos), os animais foram submetidos à nova cirurgia sob anestesia de tribromoetanol (50 mg/kg i.p.) para cateterização crônica da artéria e veia femorais, com o objetivo de monitorização da pressão arterial e administração de drogas quando necessário, respectivamente. As cânulas foram confeccionadas a partir de 3 cm de polietileno PE-10 conectado a um segmento de 17 cm de PE-50.

Uma incisão de 1,0 cm foi realizada na fossa ilíaca direita do animal e a artéria femoral foi dissecada. Uma linha de costura foi utilizada para isolar a região distal da artéria femoral e uma pinça hemostática foi nela colocada, obstruindo 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 trocáter por via subcutânea e fixadas à pele por sutura cirúrgica. As cânulas foram preenchidas com salina heparinizada e fechadas com um oclisor.

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 animal era colocado em uma gaiola individual com água e ração, e permanecendo até a hora do experimento no dia seguinte.

4.1.5 Registro da pressão arterial e da frequência cardíaca

Após 24 horas da canulação, os animais foram submetidos ao registro basal da pressão arterial, seguido do protocolo experimental. O registro direto da pressão arterial (PA) e frequência cardíaca (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 do laboratório (MARTINS-PINGE et al., 2005, 2007).

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

Durante o período de registro os animais foram mantidos em caixas individuais em ambiente silencioso e desprovidos 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.

4.1.6 Protocolo experimental

Após o registro basal da pressão arterial (\pm 30 minutos) era realizada a microinjeção de drogas no PVN.

4.1.6.1 Tratamento Farmacológico do PVN

Em grupos experimentais diferentes foi realizada a microinjeção de drogas bilateralmente no PVN: grupo DEA-NONOato (doador de NO, 50 nmol/100 nL), grupo Nw-Propyl-L-Arginina (inibidor seletivo da nNOS, 4 nmol/100 nL), grupo 1400W (inibidor reversível da iNOS, 2 nmol/100 nL), ou grupo salina fisiológica (grupo controle, 100 nL). Uma cânula microinjetora com comprimento de 21 mm, conectada em um tubo de polietileno (PE-10), e este a uma seringa Hamilton (701), foi colocada no interior da cânula guia, injetando-se 100 nanolitros (nL) de cada droga. As concentrações da droga foram baseadas em trabalho seguinte literatura: Saline (Martins Pinge et al 2007); Nw-Propil-L-arginina (Busnardo et al., 2010); DEA-NONOate (Yao et al., 2007); 1400W (Tabrizian et al., 2010).

4.1.6.2 Head-up Tilt

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 estresse ortostático de acordo com o descrito por BEDETTE et al., 2008, que consistia em elevar a plataforma, pelo lado onde estava posicionada a cabeça do animal de uma posição horizontal para uma inclinação de 75°, em aproximadamente 1 segundo. Os ratos, conectados ao sistema de registro cardiovascular, eram mantidos nessa posição por 15 minutos. Após esse período, os animais retornavam a posição horizontal (em 1 segundo) e permaneceram por mais outro período de 15 minutos, até que os parâmetros cardiovasculares se estabilizassem (período de recuperação). Após a conclusão do protocolo experimental, os animais eram sacrificados com sobredose de pentobarbital sódico.

4.1.7 Marcação e histologia do cérebro

Após o término do protocolo experimental e sacrifício 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 µm para a região do PVN. Os cortes obtidos foram posicionados e fixados em lâminas de vidro e corados pela técnica do 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.

4.1.8 Variabilidade da pressão arterial (PA) e da frequência cardíaca (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.

4.1.9 Análise da sensibilidade do barorreflexo espontâneo

A sensibilidade barorreflexa (SBR) foi avaliada no domínio da frequência por meio do Método da Sequência. Utilizando-se o programa computacional CardioSeries v2.4 (<http://www.danielpenteado.com>), séries temporais batimento-a-batimento com valores de IP e PAS foram utilizadas para análise da SBR. As séries temporais foram analisadas em busca de sequências de quatro ou mais batimentos nos quais aumentos progressivos da PAS foram acompanhados por aumentos progressivos do IP, ou reduções progressivas da PAS foram acompanhadas por reduções progressivas do IP. Para detecção das alterações da PAS e do IP foram utilizados os limiares de 0 mmHg e 0 ms, respectivamente. Após a detecção de uma rampa de PAS (sequência de quatro ou mais batimentos, nos quais aumentos ou reduções progressivas da PAS foram acompanhados, ou não de aumentos ou reduções do PI), o programa computacional buscava por alterações no IP sem qualquer intervalo, ou seja, *delay* de zero batimento. Uma sequência barorreflexa só foi utilizada quando o coeficiente de correlação (r) entre os valores de PAS e IP for maior ou igual a 0,8. A SBR foi determinada a partir da média de inclinação da reta

da regressão linear entre os valores de PAS e IP de cada sequência barorreflexa encontrada.

4.1.10 Análise estatística

A análise estatística dos resultados foi realizada utilizando-se o programa estatístico “INSTAT” (GraphPad, San Diego, CA). As comparações feitas ao longo do tempo foram analisadas por Análise de Variância (two-way ANOVA) seguido do pós test Bonferroni; e as comparações entre os grupos controles e experimentais foram analisadas pelo teste t-Student, considerando as diferenças significantes para um valor de $p < 0,05$.

4.2 Estudo II – “Hindlimb Unloaded”

O estudo II foi realizado no Instituto John Dalton Cardiovascular Research Center na Universidade de Columbia no Missouri nos Estados Unidos da América, e todos os experimentos foram revisados e aprovados pelo Animal Care and Use Comettee (ACUC) da mesma instituição sob o protocolo 6573. E todos os procedimentos foram realizados seguindo o guia estabelecido pelo Instituto Nacional de Saúde (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals).

4.2.1 Animais

No estudo II foram utilizados ratos Spreague Dawley (Harlan Spreague Dawley, Indianapolis, IN), pesando entre 220 e 250g. Os animais foram divididos aleatoriamente em grupos experimentais: sem suspensão e com suspensão. Ração (Formulab Diet, 0.28% sodium; Purina, St. Louis, MO) e água foram ofertadas à vontade para todos os grupos de animais. Os animais foram mantidos no biotério do Instituto com ciclo claro e escuro de 12h a uma temperatura de 21°C.

4.2.3 “Hindlimb unloaded”

Os ratos foram divididos aleatoriamente em grupo controle e grupo “hindlimb unloaded”, foram anestesiados com isoflurano para implantar o aparelho de suspensão e colocar pequeno e leve gesso torácica (10g; Specialist plaster bandages; Johnson & Johnson). O aparelho de suspensão é composto por dois fios

de aço inoxidável (0.029-mm diameter; Small Parts) passado através do quinto e sétimo espaço intervertebral caudal e formado um círculo (4,5 cm de diâmetro) com um pequeno anel isolante (0,5 cm de diâmetro). Um período de 10 dias foi dado para o animal se recuperar antes da aclimação à suspensão (HU). A aclimação consiste na suspensão dos membros posteriores (30-35°) durante três dias em um período de 1 a 2 horas por dia. Após o período de aclimação, os animais eram suspensos (HU) durante 14 dias. Os animais controle (CC) eram mantidos em gaiolas individuais para um período de tempo semelhante. Ao término do período de suspensão, os animais eram retirados do aparelho de suspensão colocados em uma caixa para o registro da pressão arterial, frequência cardíaca e atividade do nervo renal. Após o registro dos parâmetros basais, era realizado o tratamento farmacológico. Após a conclusão do protocolo experimental, os animais eram sacrificados com sobredose de pentobarbital sódico.

4.2.4 Implante de cânulas-guia direcionadas ao PVN

Este procedimento foi realizado em todos os animais de acordo com De Abreu e colaboradores (2009). Inicialmente os ratos foram anestesiados com isoflurano, 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 forâmes bilaterais e eqüidistantes da linha média, para o implante das cânulas-guia, cujas coordenadas estereotáxicas (PAXINOS e 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 encaixe 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, foi introduzido nas mesmas um oclisor. Em seguida, o animal foi retirado do aparelho estereotáxico e como medida profilática, após a cirurgia cerebral foi administrada uma dose de penicilina por via intramuscular. Em seguida, o animal retornou ao biotério e lá permaneceu por 5 dias para recuperação da cirurgia.

4.2.5 Cateterização da artéria e veia femorais

Após os 5 dias de recuperação (24 horas antes dos experimentos), os animais foram submetidos à nova cirurgia sob anestesia isofluroano, para cateterização crônica da artéria e veia femorais, com o objetivo de monitorização da pressão arterial e administração de drogas quando necessário, respectivamente.

Uma incisão de 1,0 cm foi realizada na fossa ilíaca direita do animal e a artéria femoral foi dissecada. Uma linha de costura foi utilizada para isolar a região distal da artéria femoral e uma pinça hemostática foi nela colocada,

obstruindo 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 trocáter por via subcutânea e fixadas à pele por sutura cirúrgica. As cânulas foram preenchidas com salina heparinizada e fechadas com um oclusor.

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 animal era colocado em uma gaiola individual com água e ração, e permanecendo até a hora do experimento no dia seguinte.

4.2.6 Implante de eletrodo no nervo renal

Após a anestesia com isoflurano, era realizada uma incisão na cavidade retroperitoneal do lado esquerdo do animal para a identificação do nervo renal. Com o auxílio de afastadores, o nervo renal era dissecado e limpo de tecido conjuntivo e um eletrodo era colocado. O eletrodo era composto de dois fios de prata e isolados por Teflon (0,0005 de diâmetro). O isolamento de teflon era removido nas pontas do eletrodo e as pontas eram dobradas até formarem pequenos ganchos para possível conexão com o nervo renal. Após a colocação do eletrodo no nervo renal esquerdo, tanto o nervo quanto o eletrodo foram recobertos com gel polyinylsiloxane que foi deixado endurecer antes da finalização da cirurgia. Um fio terra foi implantado na musculatura circunvizinha do dorso do animal. O fio do

eletrodo foi exteriorizado juntamente com os cateteres da veia e da artéria femurais, na região cervical dorsal do animal. Após a recuperação da enestesia, os animais eram devolvidos as suas gaiolas, com ou sem suspensão e eram levados ao biotério para descansar por 24 horas.

4.2.7 Registro da pressão arterial e da frequência cardíaca

Após 24 horas da canulação, os animais foram submetidos ao registro basal da pressão arterial, seguido do protocolo experimental. O registro direto da pressão arterial (PA) e frequência cardíaca (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 do laboratório (MARTINS-PINGE et al., 2005, 2007).

A cânula arterial do animal foi acoplada a um transdutor de pressão (Powerlab modelo MLT0380) e conectado a um sistema de registro computadorizado (Powerlab/ADInstruments), obtendo-se assim a pressão arterial pulsátil (PAP). A pressão arterial média (PAM) e a frequência cardíaca (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 acontecesse, os animais eram imediatamente anestesiados e descartados como sujeitos experimentais.

4.2.8 Registro da atividade simpática do nervo renal

A atividade simpática do nervo renal foi amplificada 1000 vezes, utilizando um filtro (30 Hz-3 kHz). A atividade do nervo foi monitorada com o auxílio de um osciloscópio (Tektronix) e um monitor de áudio (Grass M8). A atividade do nervo foi retificada e integrada usando um conversor (root-mean square) com uma constante de tempo de 28 ms. O sinal foi então medido electronicamente e a média do sinal foi usada como uma medida relativa da atividade simpática renova renal (RSNA). O ruído de fundo na gravação do nervo simpático foi determinado após os ratos serem sacrificados. Todas as experiências foram realizadas dentro de uma gaiola de Faraday para diminuir o ruído elétrico. Todos os dados foram registrados em um computador utilizando um software de aquisição de dados (PowerLab; ADI Instruments).

4.2.9 Protocolo experimental

Após o registro basal da pressão arterial (\pm 30 minutos) era realizada a microinjeção de droga no PVN.

4.2.9.1 Tratamento Farmacológico do PVN

Em grupos experimentais diferentes foi realizada a microinjeção de drogas bilateralmente no PVN: Grupo Controle ou Hindlimb Unloaded L-NMMA (inibidor não seletivo das óxido nítrico sintases, 2 Mm/100nL), ou grupo aCSF (100 nL) controle ou Hindlimb Unloaded. Uma agulha microinjetora com comprimento de 21 mm, conectada em um tubo de polietileno (PE-10), e este a uma seringa Hamilton (701), foi colocada no interior da cânula guia, injetando-se 100 nanolitros (nL) de cada droga bilateralmente.

4.2.9.2 Retorno à ação da gravidade

Para mimetizar as condições de retorno para um ambiente de 1G ou a uma postura erecta, foram realizados todos os experimentos com os ratos removidos do aparelho de suspensão e em uma posição horizontal. Os animais foram colocados numa gaiola experimental preenchido serragem da sua gaiola de origem. A gaiola experimental foi localizado em uma sala tranquila e com isolamento acústico. Para registo da pressão sanguínea arterial, o cateter arterial foi ligado a um transdutor de pressão. A pressão arterial média (PAM) foi obtida eletronicamente usando um filtro. A FC foi determinada a partir do pulso de pressão arterial usando o PowerLab (ADI Instruments). A Atividade simpática do nervo renal foi amplificada 1000 vezes, utilizando um filtro (30 Hz, 3-kHz). Todos os dados foram registados utilizando um sistema baseado em computador de aquisição de dados (PowerLab; ADI Instruments). Todos os experimentos começaram com um período de estabilização

de ~ 30 min, durante o qual foram registrados os parâmetros hemodinâmicos basais. No final deste período de micro-injecções bilaterais no PVN com Fluido artificial Cérebro Espinhal (ACSF) (100nL) ou NG-monometil-L-arginina (L-NMMA) (um inibidor não específica de todas as NO sintases, 2 mM, 100nL). No final dos experimentos, os ratos foram sacrificados com uma sobredose de anestésico através do cateter venoso (Beuthanasia, 0,2 ml). Os músculos sóleo e plantar músculos e também as glândulas adrenais foram removidos e pesados.

4.2.10 Marcação e histologia do cérebro

Após o término do protocolo experimental e sacrifício 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 % contendo sacarose para posterior corte histológico e análise das lâminas.

Os cérebros foram seccionados em micrótomo através de cortes de 40 μ m para a região do PVN. Os cortes obtidos foram posicionados e fixados em lâminas de vidro. 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.

4.2.11 Análise estatística

Todos os dados foram apresentados como média \pm erro padrão da média. Os pesos corporais, dos músculo dos membros posteriores e das glândulas supra-renais foram analisados utilizando o teste t de Student para grupos independentes. Os pesos corporais foram examinadas utilizando análise de variância de duas vias (ANOVA) com o grupo (controle vs HU) e do tempo (dias 1 e 14) como fatores. Nós também utilizamos o teste t Student não pareado para comparar a resposta entre os grupos CC e grupos HU após o tratamento aCSF ou L-NMMA. $P \leq 0,05$ foi considerado para indicar a significância estatística.

4.3 Estudo III – Head-down tilt

O estudo III foi realizado no Departamento de Ciências Fisiológicas (CIF) do Centro de Ciências Biológicas (CCB) da Universidade Estadual de Londrina (UEL) no Brasil, e todos os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da Universidade Estadual de Londrina com registro no CEEA nº: 17114.2013.64.

4.3.1 Animais

Para o estudo III foram utilizados ratos Wistar, pesando entre 330 e 350g, provenientes do biotério central da Universidade Estadual de Londrina. Nos dois estudos, os animais foram divididos aleatoriamente em 3 grupos experimentais: Salina, 1400w, Nw-Propyl-L-Arginina. Os ratos foram mantidos no biotério do Departamento de Ciências Fisiológicas em gaiolas coletivas (máximo de 5 animais) à temperatura de 21°C, com ciclo claro/escuro de 12h. Água e ração comum para animais de laboratório foram fornecidos “ad libitum”.

4.3.2 Implante de cânulas-guia direcionadas ao PVN

Este procedimento foi realizado em todos os animais de acordo com De Abreu e colaboradores (2009). Inicialmente os ratos foram anestesiados com Cloridrato de Cetamina (100mg/kg) e Cloridrato de Xylasina (20mg/kg) intraperitoneal, 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 forâmes bilaterais e eqüidistantes da linha média, para o implante das cânulas-guia, cujas coordenadas estereotáxicas (PAXINOS e 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 encaixe 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, foi introduzido nas mesmas um ocluser. Em seguida, o animal foi retirado do aparelho estereotáxico e como medida profilática, após a cirurgia cerebral foi administrada uma dose de penicilina por via intramuscular. Em seguida, o animal retornou ao biotério e lá permaneceu por 5 dias para recuperação da cirurgia.

4.3.3 Cateterização da artéria e veia femorais

Após os 5 dias de recuperação (24 horas antes dos experimentos), os animais foram submetidos à nova cirurgia sob anestesia de Cloridrato de Cetamina (100mg/kg) e Cloridrato de Xylasina (20mg/kg) intraperitoneal, para cateterização crônica da artéria e veia femorais, com o objetivo de monitorização da pressão arterial e administração de drogas quando necessário, respectivamente.

Uma incisão de 1,0 cm foi realizada na fossa ilíaca direita do animal e a artéria femoral foi dissecada. Uma linha de costura foi utilizada para isolar a região distal da artéria femoral e uma pinça hemostática foi nela colocada, obstruindo 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 trocáter por via subcutânea e fixadas à pele por sutura cirúrgica. As cânulas foram preenchidas com salina heparinizada e fechadas com um ocluser.

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 animal era colocado em uma gaiola individual com água e ração, e permanecendo até a hora do experimento no dia seguinte.

4.3.4 Registro da pressão arterial e da frequência cardíaca

Após 24 horas da canulação, os animais foram submetidos ao registro basal da pressão arterial, seguido do protocolo experimental. O registro direto da pressão arterial (PA) e frequência cardíaca (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 do laboratório (MARTINS-PINGE et al., 2005, 2007).

A cânula arterial do animal foi acoplada a um transdutor de pressão (Powerlab modelo MLT0380) e conectado a um sistema de registro computadorizado (Powerlab/ADInstruments), obtendo-se assim a pressão arterial pulsátil (PAP). A pressão arterial média (PAM) e a frequência cardíaca (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 acontecesse, os animais eram imediatamente anestesiados e descartados como sujeitos experimentais.

4.3.5 Protocolo experimental

Após o registro basal da pressão arterial (\pm 30 minutos) era realizada a microinjeção de droga no PVN.

4.3.5.1 Tratamento Farmacológico do PVN

Em grupos experimentais diferentes foi realizada a microinjeção de drogas bilateralmente no PVN: Grupo Nw-Propyl-L-Arginina (inibidor seletivo da nNOS, 4 nmol/100 nL), grupo 1400W (inibidor reversível da iNOS, 2 nmol/100 nL), ou grupo salina fisiológica (grupo controle, 100 nL). Uma cânula microinjetora com comprimento de 21 mm, conectada em um tubo de polietileno (PE-10), e este a uma seringa Hamilton (701), foi colocada no interior da cânula guia, injetando-se 100 nanolitros (nL) de cada droga. As concentrações das drogas foram baseadas nos seguintes trabalhos da literatura: Saline (Martins Pinge et al 2007.); Nw-Propil-L-arginina (Busnardo et al., 2010); 1400W (Tabrizian et al., 2010).

4.3.5.2 Head-down Tilt

Da mesma forma que o head-up tilt, o head-down tilt realizou o mesmo protocolo, a única diferença consistiu em elevar a plataforma pelo lado onde estava posicionada a cauda do animal, ou seja, deixando o rato de cabeça para baixo. Partindo de uma posição horizontal para uma inclinação de 75° em aproximadamente 1 segundo. Os ratos, conectados ao sistema de registro cardiovascular, eram mantidos nessa posição por 15 minutos. Após esse período,

os animais retornavam a posição horizontal (em 1 segundo) e permaneceram por mais outro período de 15 minutos, até que os parâmetros cardiovasculares se estabilizassem (período de recuperação). Após a conclusão do protocolo experimental, os animais eram sacrificados com sobredose de pentobarbital sódico.

4.3.6 Marcação e histologia do cérebro

Após o término do protocolo experimental e sacrifício 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 μm para a região do PVN. Os cortes obtidos foram posicionados e fixados em lâminas de vidro e corados pela técnica do 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.

4.3.7 Variabilidade da pressão arterial (PA) e da frequência cardíaca (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.

4.3.8 Análise da sensibilidade do barorreflexo espontâneo

A sensibilidade barorreflexa (SBR) foi avaliada no domínio da frequência por meio do Método da Sequência. Utilizando-se o programa computacional CardioSeries v2.4 (<http://www.danielpenteado.com>), séries temporais batimento-a-batimento com valores de IP e PAS foram utilizadas para análise da SBR. As séries temporais foram analisadas em busca de sequências de quatro ou mais batimentos nos quais aumentos progressivos da PAS foram acompanhados por aumentos progressivos do IP, ou reduções progressivas da PAS foram acompanhadas por reduções progressivas do IP. Para detecção das alterações da PAS e do IP foram utilizados os limiares de 0 mmHg e 0 ms, respectivamente. Após a detecção de uma rampa de PAS (sequência de quatro ou mais batimentos, nos quais aumentos ou reduções progressivas da PAS foram acompanhados, ou não de aumentos ou reduções do PI), o programa computacional buscava por alterações no IP sem qualquer intervalo, ou seja, delay de zero batimento. Uma sequência barorreflexa só foi utilizada quando o coeficiente de correlação (r) entre os valores de PAS e IP for maior ou igual a 0,8. A SBR foi determinada a partir da média de inclinação da reta

da regressão linear entre os valores de PAS e IP de cada sequência barorreflexa encontrada.

4.3.9 Análise estatística

A análise estatística dos resultados foi realizada utilizando-se o programa estatístico "INSTAT" (GraphPad, San Diego, CA). As comparações feitas ao longo do tempo foram analisadas por Análise de Variância (two-way ANOVA) seguido do pós test Bonferroni; e as comparações entre os grupos controles e experimentais foram analisadas pelo teste t-Student, considerando as diferenças significantes para um valor de $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 Estudo I – Head-Up Tilt

5.1.1 Confirmação histológica dos sítios de microinjeção

A análise histológica permitiu demonstrar que os efeitos sobre os níveis de PAM e FC, em resposta a microinjeção das drogas utilizadas nos diferentes grupos experimentais, foram evidentes para os experimentos em que os sítios de microinjeção marcados pelo corante Vermelho Neutro encontravam-se no PVN ou nas bordas deste núcleo. A extensão do PVN considerada para a confirmação histológica foi de -1,40 e -2,12 posterior ao Bregma, de acordo com o Atlas de Paxinos e Watson (1986). Não foi possível distinguir a localização precisa na região magnocelular ou parvocelular dos grupos de neurônios atingidos pelas microinjeções. A figura 1 mostra a confirmação histológica dos sítios de microinjeção.

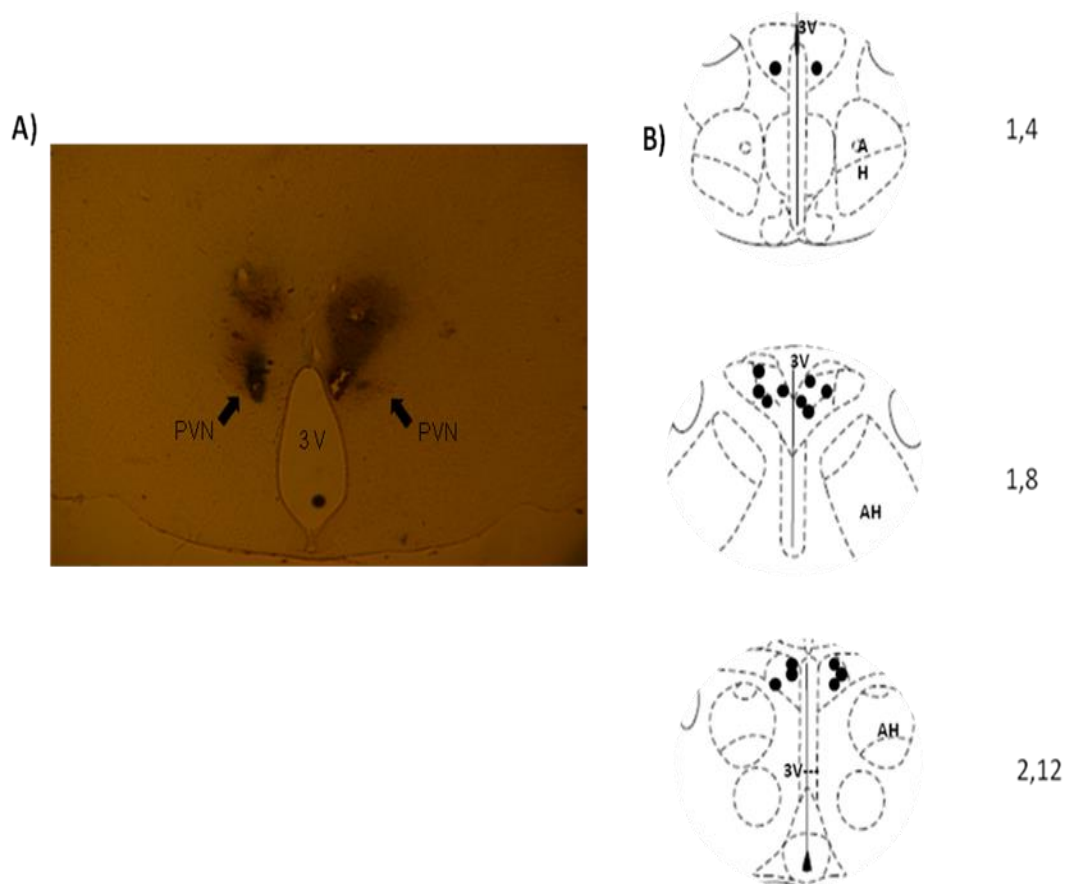


Figura 1 - Histologia do tecido cerebral, evidenciando os sítios de microinjeção bilateral no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN). A: fotomicrografia de uma lâmina histológica do PVN e B: representação esquemática dos locais de microinjeção em secções rostral (1,4 mm) à caudal (2,12 mm) da região do PVN. As marcações em preto representam os pontos centrais de microinjeção no PVN. Os números indicam a distância posterior ao bregma para cada secção de acordo com o Atlas de Paxinos e Watson (1986). Abreviaturas: 3V, terceiro ventrículo; AH, hipotálamo anterior.

5.1.2 Pressão arterial média e frequência cardíaca basal

A tabela 1 mostra que a pressão arterial média e a frequência cardíaca dos animais controle (salina) e os animais nos quais seria realizada a microinjeção de drogas não teve diferença durante o estado basal.

Tabela 1 – Valores basais de pressão arterial média (PAM mmHg) e frequência cardíaca (FC bpm) de todos os grupos experimentais antes e após-tratamento farmacológico. Valores expressos como média \pm EPM.

	Salina (n = 7)	DEA-nonoate (n = 6)	Nw-Propyl-L-Arginine (n = 6)	1400w (n = 6)
BASAL				
PAM mmHg	111 \pm 4	116 \pm 2	124 \pm 5	114 \pm 2
FC bpm	370 \pm 13	365 \pm 9	356 \pm 19	360 \pm 6

5.1.3 Efeitos cardiovasculares após microinjeção de salina e Dea-NONOato no PVN durante o estresse ortostático

O protocolo de restrição em ratos conscientes no grupo controle (microinjeção de salina no PVN) promoveu um aumento na variação da pressão arterial média ($\Delta\text{MAP HUT} = 14 \pm 2$ mmHg), e na frequência cardíaca ($\Delta\text{FC HUT} = 50 \pm 10$ bpm) comparado com os valores basais. O estresse ortostático induziu também a um aumento na variação da pressão arterial média ($\Delta\text{MAP HUT} = 14 \pm 2$ mmHg), e um aumento ainda maior na frequência cardíaca ($\Delta\text{FC HUT} = 77 \pm 14$ bpm). Quando comparado com o grupo que foi realizado a microinjeção de DEA-NONOato, não houve nenhuma diferença significativa na curva de variação ao longo do tempo como mostrado na figura 2.

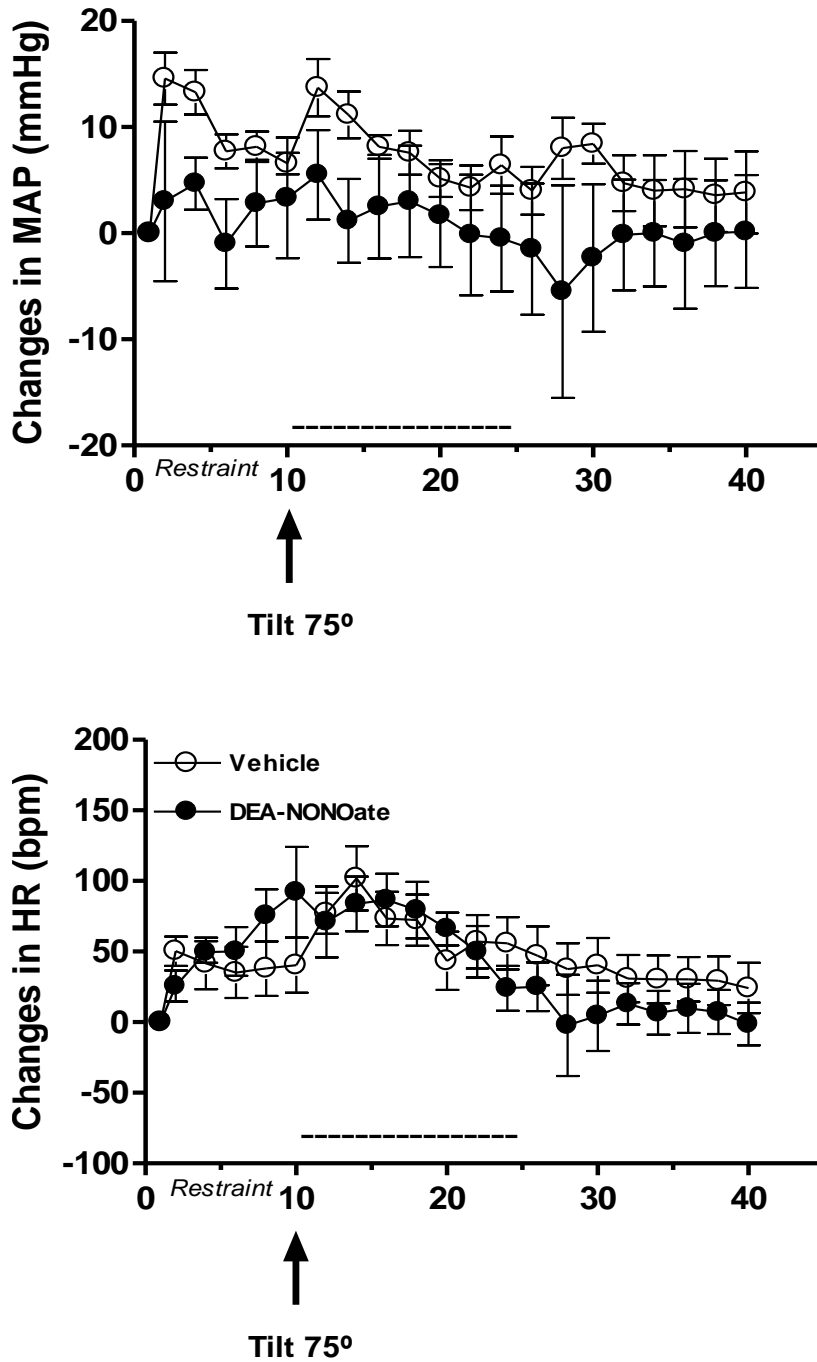


Figura 2 - Variações de pressão arterial média (PAM) e de frequência cardíaca (FC) no grupo tratado com DEA-NONOato quando comparado com o grupo controle.

5.1.4 Efeitos cardiovasculares após microinjeção de salina e Nw-Propyl-L-Arginina no PVN durante a restrição e a mudança postural

A microinjeção de Nw-Propyl-L-Arginina não promoveu alteração cardiovascular durante o estresse de restrição, assim como durante a mudança postural quando comparado com o grupo controle, como mostrado na figura 3.

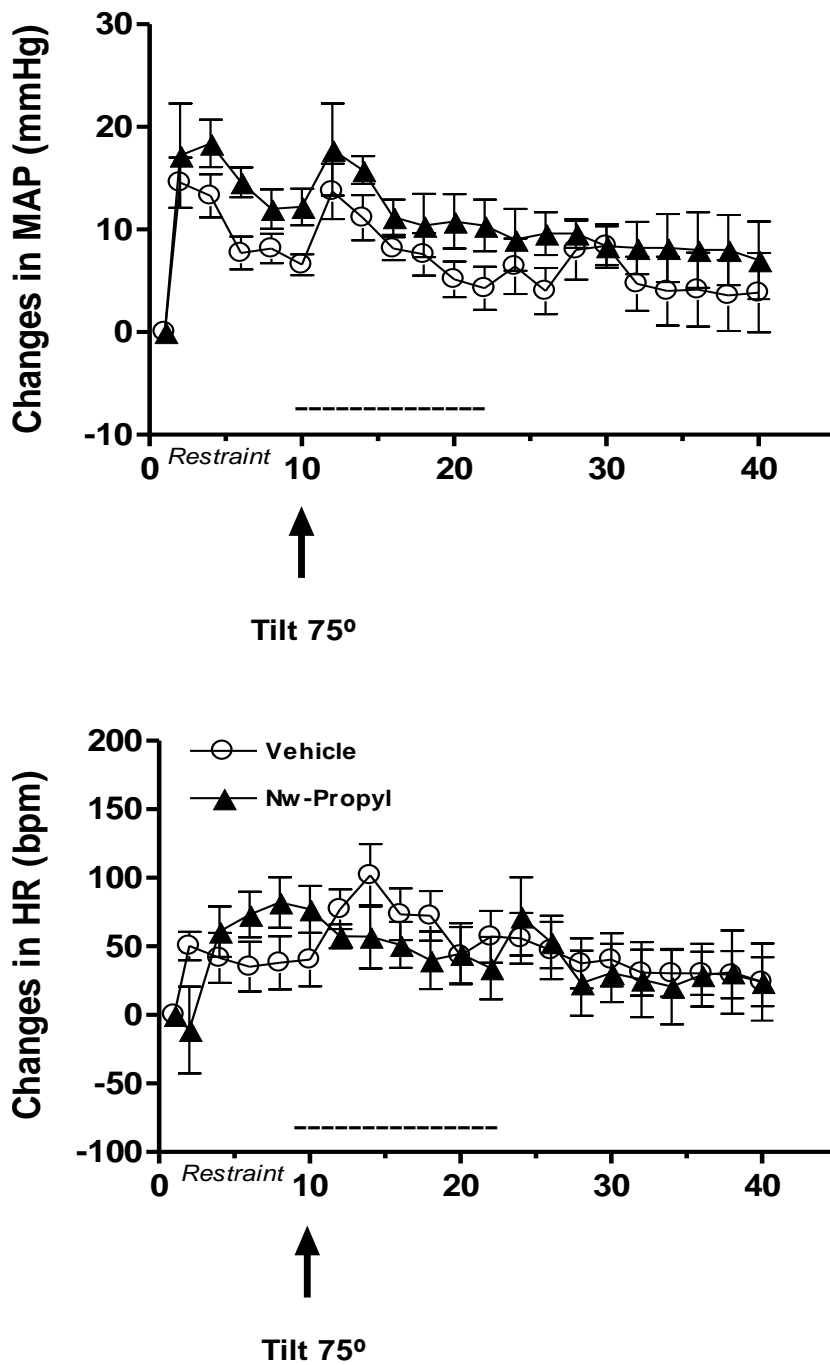


Figura 3 - Variações de pressão arterial média (PAM) e de frequência cardíaca (FC) no grupo tratado com Nw-Propyl-L-Arginina quando comparado com o grupo controle.

5.1.5 Efeitos cardiovasculares após microinjeção de salina e 1400W no PVN durante a restrição e a mudança postural

A figura 4 mostra a variação da pressão arterial média e da frequência cardíaca ao longo do tempo nos grupos controle e com microinjeção de 1400W. Após a inibição da iNOS com 1400W ocorreu uma atenuação do pico pressórico ocasionada pela mudança postural do grupo controle (controle Δ MAP HUT = 14 ± 2 mmHg, 1400W Δ MAP HUT = 2 ± 1 mmHg, $P < 0,05$). Na frequência cardíaca não houve nenhuma modificação em comparação ao grupo salina.

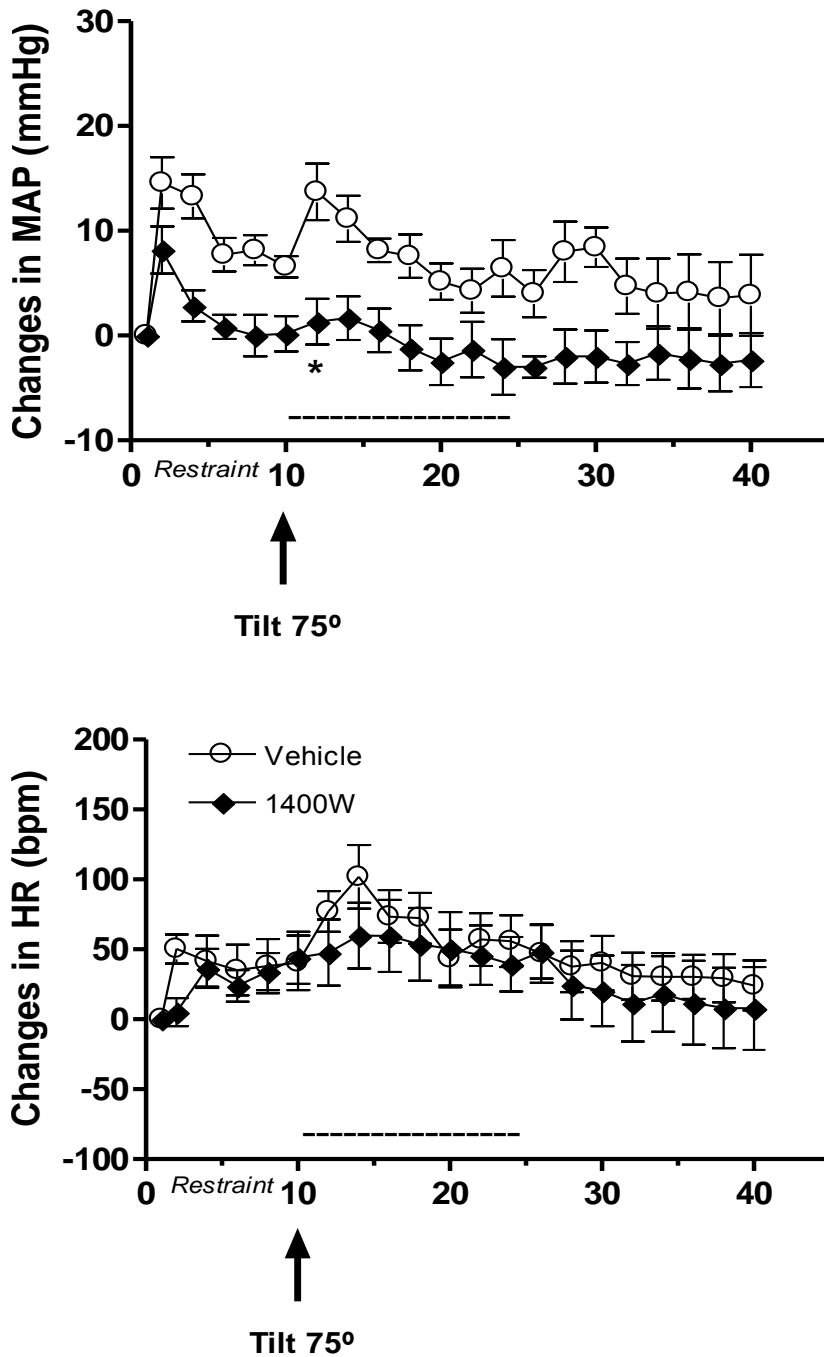


Figura 4 - Variações de pressão arterial média (PAM) e de frequência cardíaca (FC) no grupo tratado com 1400w quando comparado com o grupo controle. *p<0,05 comparado ao controle. (two- way ANOVA).

5.1.6 Variação da pressão arterial média e da frequência durante a mudança postural

A figura 5 mostra o pico de resposta da pressão arterial média e da frequência cardíaca durante a mudança postural. A inibição da via indutiva do óxido nítrico com a microinjeção de 1400W promoveu uma hipotensão da variação pressão arterial média (controle $\Delta\text{MAP HUT} = 15 \pm 2$ mmHg vs 1400W $\Delta\text{MAP HUT} = -2 \pm 0.5$ mmHg, $P < 0,05$) assim como uma atenuação da frequência cardíaca durante a mudança postural (controle $\Delta\text{FC HUT} = 62 \pm 7$ bpm; 1400W $\Delta\text{FC HUT} = 26 \pm 5$ bpm, $P < 0,05$). A inibição da via neuronal do óxido nítrico não promoveu nenhuma alteração quando comparado ao grupo salina.

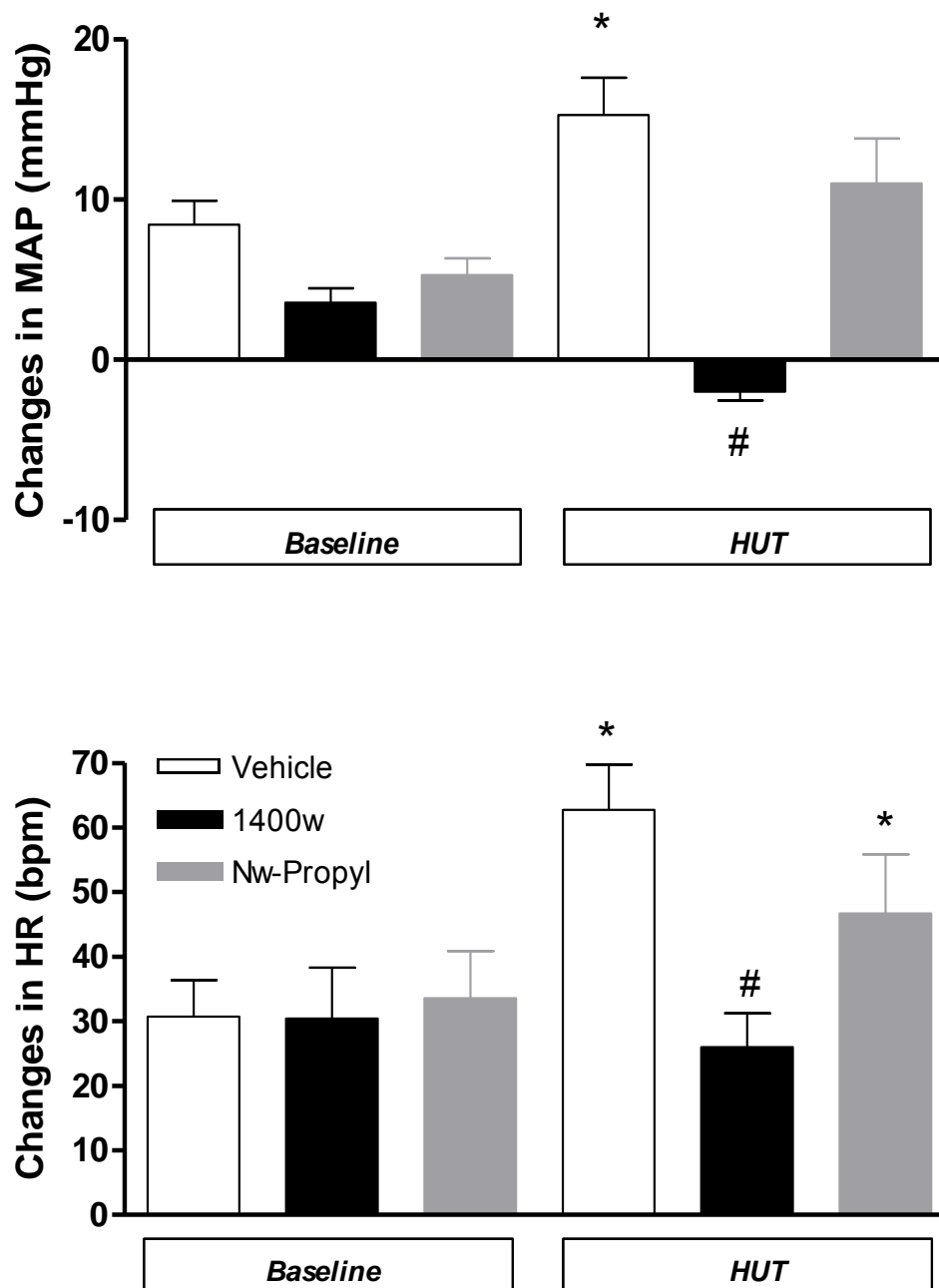


Figura 5 - Efeito da microinjeção de salina (n = 7) ou 1400W (2 nmol, n = 6) ou Nw-Propil (4nmol, n=6) no PVN sobre mudanças da pressão arterial média (MAP) e da frequência cardíaca (FC) durante o HUT (pico de resposta do HUT menos o último minuto de contensão). Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média (SEM). Observou-se uma diferença significativa entre o grupo 1400W com o grupo salina (vehicle) nas respostas de PAM e FC (# e * p <0,05, two-way ANOVA).

5.1.7 Análise espectral da pressão arterial sistólica e do intervalo de pulso durante a mudança postural

A figura 6 mostra um aumento da variância na análise espectral da pressão sistólica no grupo controle (basal = $132 \pm 4 \text{ mmHg}^2$; HUT = $148 \pm 4 \text{ mmHg}^2$, $P < 0,05$) e um aumento do componente LF (basal = $9 \pm 2 \text{ mmHg}^2$; HUT = $20 \pm 4 \text{ mmHg}^2$, $P < 0,05$) durante a mudança postural. A microinjeção de ambos inibidores da NOS e do doador de NO não promoveu modificações nesses efeitos.

A figura 7 mostra uma atenuação no parâmetro espectral da variância nos animais que tiveram microinjeções de 1400W ou do doador de NO no PVN durante a mudança postural em comparação ao grupo controle no intervalo de pulso (HUT controle = $166 \pm 7 \text{ ms}^2$; HUT 1400W = $129 \pm 2 \text{ ms}^2$, $P < 0,05$) e (HUT controle = $166 \pm 7 \text{ ms}^2$; HUT Dea = $124 \pm 3 \text{ ms}^2$, $P < 0,05$). O componente LF absoluto dos animais que receberam 1400W foi atenuado (LF controle HUT = $16 \pm 3 \text{ ms}^2$; 1400W HUT = $1 \pm 0,4 \text{ ms}^2$, $P < 0,05$) assim como para os valores normalizados em comparação ao grupo controle (LF controle HU nu = $49 \pm 4 \text{ ms}^2$; 1400w HUT nu = $30 \pm 6 \text{ ms}^2$, $P < 0,05$). No grupo controle, o componente HF apresentou diminuição durante o estresse postural (HF controle basal = $70 \pm 4 \text{ nu}$; controle HUT = $47 \pm 3 \text{ nu}$, $P < 0,05$), que foi revertido com a microinjeção de DEA, Nw-Propyl e 1400W em valores normalizados (controle HUT = $47 \pm 3 \text{ nu}$, DEAHUT $64 \pm 1 \text{ nu}$, $P < 0,05$), (controle HUT = $47 \pm 3 \text{ nu}$, Nw-Propyl HUT $66 \pm 3 \text{ nu}$, $P < 0,05$), (controle HUT = $47 \pm 3 \text{ nu}$, Nw-Propyl HUT $69 \pm 6 \text{ nu}$, $P < 0,05$) respectivamente.

Pressão Arterial Sistólica

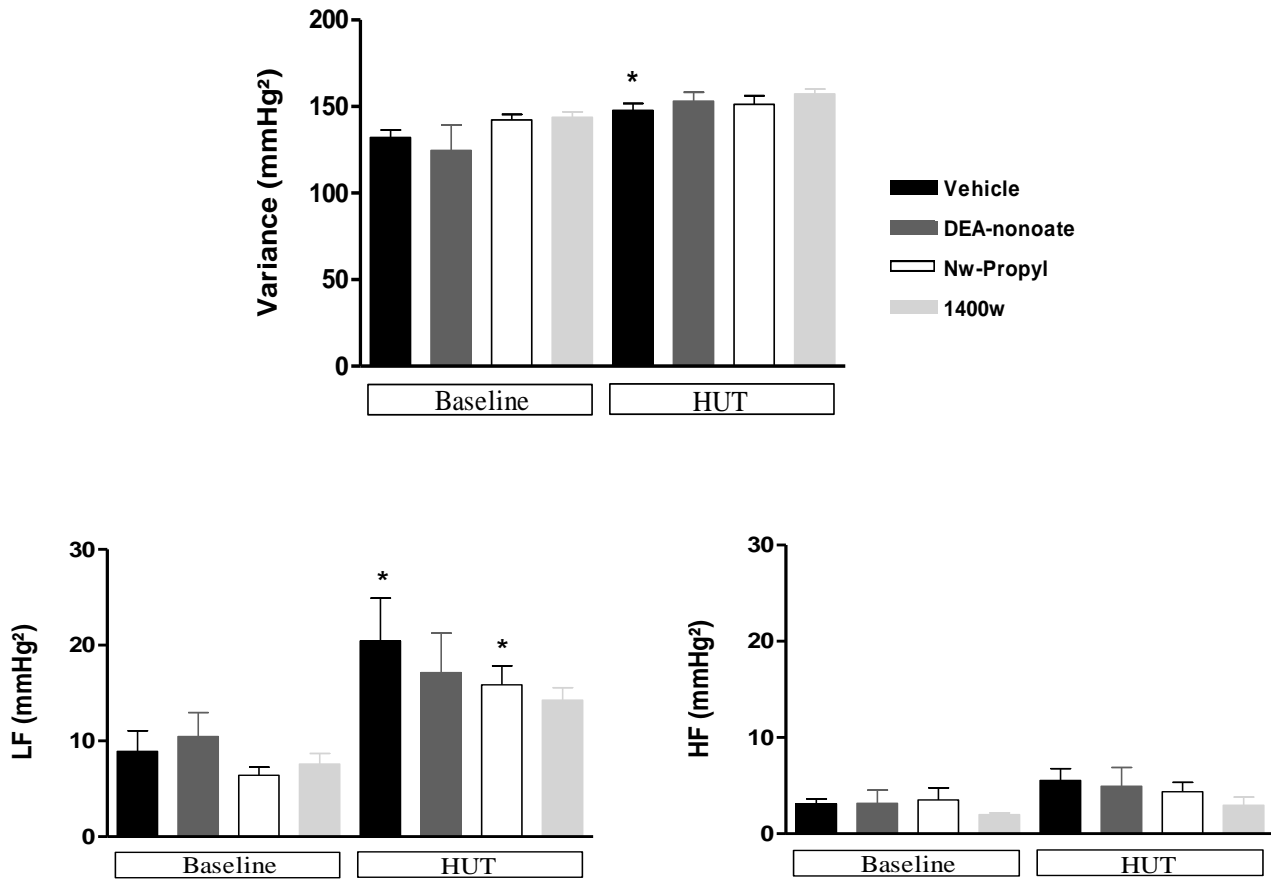


Figura 6 - Parâmetros espectrais de pressão arterial sistólica dos grupos tratado com DEA-nonoato, Nw-Propyl e 1400w em comparação com o grupo controle. LF: faixa de baixa frequência absoluta; HF: faixa de alta frequência absoluta; *p<0,05 comparado ao controle. (two-way ANOVA).

Intervalo de Pulso

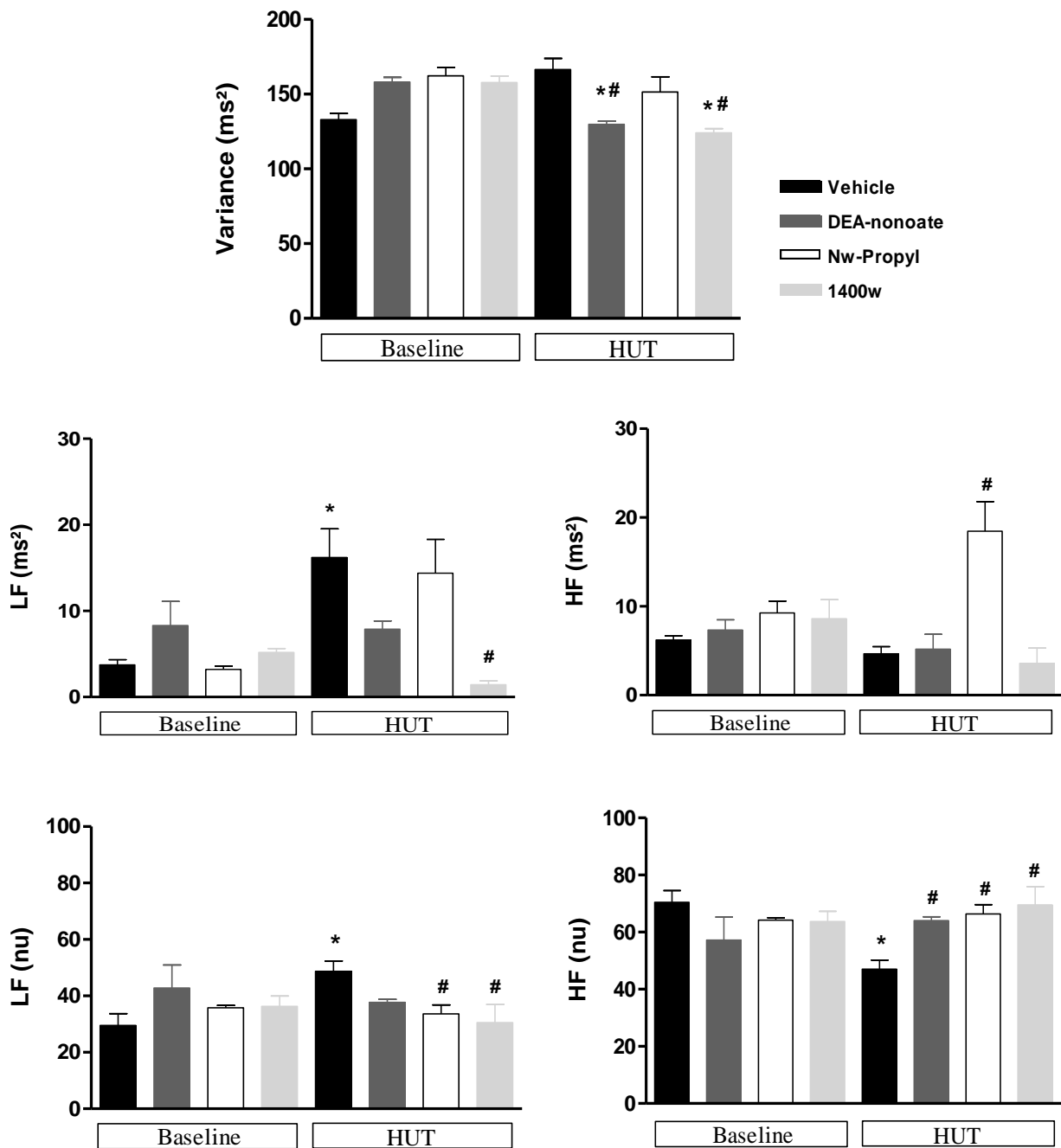


Figura 7 - Parâmetros espectrais de intervalo de pulso dos grupos tratado com DEA-nonoato, Nw-Propyl e 1400w em comparação com o grupo controle. LF: faixa de baixa frequência absoluta; LFun: faixa de baixa frequência normalizada; HF: faixa de alta frequência absoluta; HFun: faixa de alta frequência normalizada; *p<0,05 comparado ao controle, # p<0,05 comparado com o controle tilt. (two-way ANOVA).

5.1.8 Análise da sensibilidade do barorreflexo espontâneo

Os resultados mostraram que houve um aumento no índice de efetividade do barorreflexo espontâneo após a microinjeção das drogas no PVN em comparação ao grupo salina (controle basal = 0.11 ± 0.01 ; Dea-NONOato = 0.29 ± 0.03 , $P < 0,05$), (controle basal = 0.11 ± 0.01 ; Nw-Propyl = 0.28 ± 0.03 , $P < 0,05$), (controle basal = 0.11 ± 0.01 ; 1400W = 0.29 ± 0.05 , $P < 0,05$) e apenas os animais que receberam 1400W tiveram uma reversão desse aumento durante a mudança postural (1400W basal = 0.29 ± 0.05 ; 1400W HUT = 0.12 ± 0.02 , $P < 0,05$). No caso do ganho barorreflexo apenas o grupo Dea-NONOato apresentou um aumento durante a mudança postural (Dea-NONOato basal = 1.03 ± 0.12 ms/mmHg; Dea-NONOato HUT = 2.41 ± 0.66 ms/mmHg, $P < 0,05$).

Sensibilidade do Barorreflexo Espontâneo

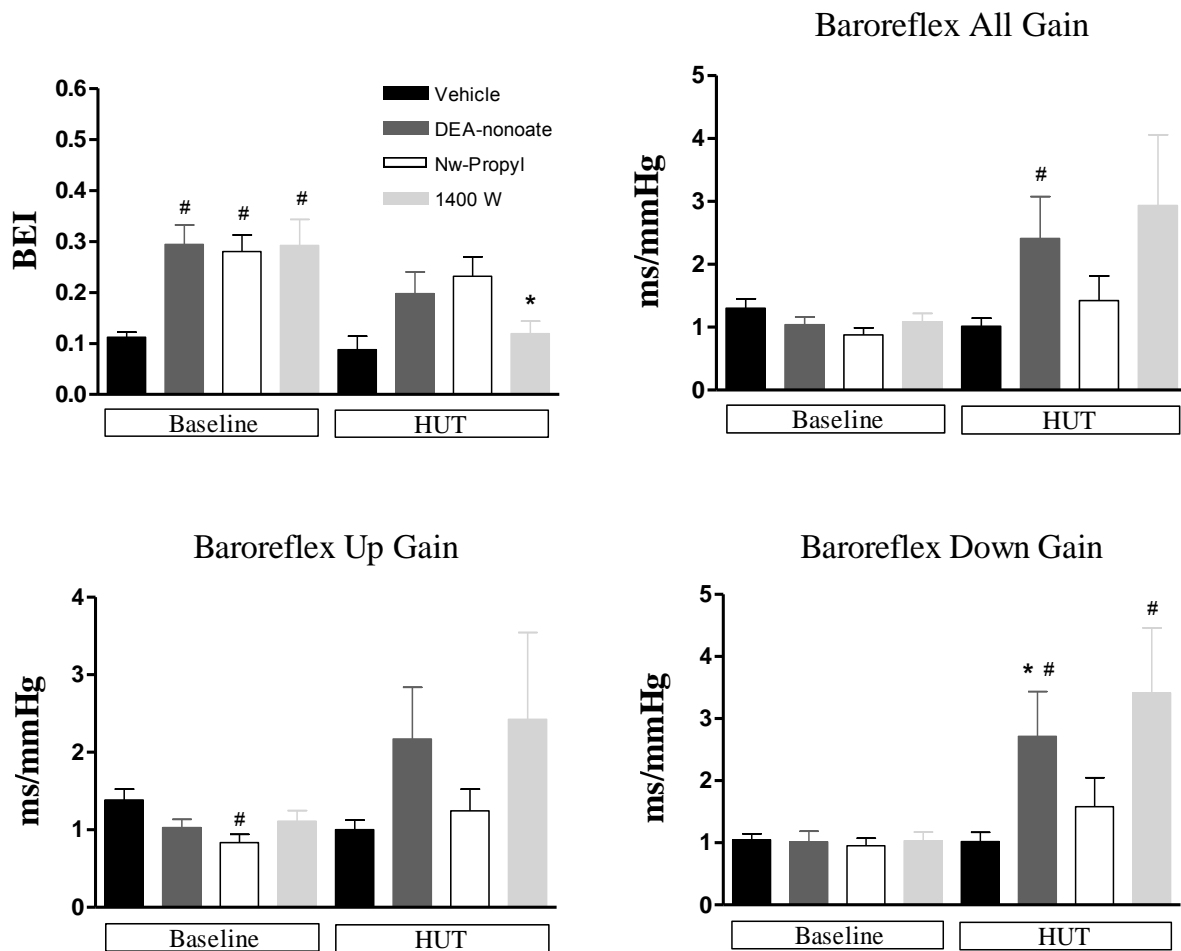


Figura 8 – Efeito do tratamento com salina, DEA-nonoato, 1400W e Nw-propil-L-Arginina no PVN de ratos nas flutuações espontâneas de reflexo barorreceptor durante o período basal e o head-up tilt (HUT). Gráfico mostra o índice de efetividade do barorreflexo (BEI), ganho total do barorreflexo, up gain e down gain.* p < 0,05 em comparação com o basal; #P < 0,05 comparado com o veículo, two-way ANOVA.

5.2 Estudo II – Hindlimb Unloaded

5.2.1 Confirmação histológica dos sítios de microinjeção

A figura 9 mostra a confirmação histológica dos sítios de microinjeção. Não foi possível distinguir a localização precisa na região magnocelular ou parvocelular dos grupos de neurônios atingidos pelas microinjeções.



Figura 9 – Fotomicrografia representativa dos sítios de microinjeção bilateral no núcleo paraventricular (PVN) do hipotálamo de um rato individual. 100 nL de corante azul de Evans (2%) foi injetado na conclusão de todos os experimentos.

5.2.2 Análise dos parâmetros corporais e cardiovasculares do modelo Hindlimb unloaded (HU)

Na tabela 2 os resultados mostram que houve uma diferença estatística entre o grupo controle e o grupo HU no peso corporal após os 14 dias de suspensão. Houve também uma diminuição do peso dos músculos sóleo e plantaris, porém, não houve diferença significativa no peso das adrenais. Em relação à pressão arterial média não houve diferença significativa entre os grupos, no entanto os animais HU apresentaram uma taquicardia de repouso.

Tabela 2 – Peso corporal, músculos, glândula adrenal, valores de PAM e FC em repouso. Os valores são médias \pm erro padrão da média. O peso corporal (BW) foi medido antes da suspensão no dia 1 (D1) e após a remoção da suspensão, que normalmente era no dia 14 (D14). Os pesos dos músculos sóleos, plantares e da glândula adrenal foram verificados no D14. * $P \leq 0,05$.

	n	Peso, g		Sóleo Wt, mg	Sóleo Wt/ peso	Plantaris Wt, mg	Plantaris Wt/ peso	Adrenal, mg	PAM, mmHg	FC, bpm
		Dia 1	Dia 14							
Controle	5	261 \pm 10	315 \pm 5	115 \pm 7	0.36 \pm 0.01	307 \pm 14	0.95 \pm 0.01	30 \pm 4	119 \pm 6	370 \pm 5
Hindlimb Unloaded	7	253 \pm 10	282 \pm 7 *	55 \pm 2 *	0.20 \pm 0.02*	248 \pm 3*	0.65 \pm 0.01*	30 \pm 3	122 \pm 5	410 \pm 6*

5.2.3 Traçado típico de um animal controle após a microinjeção de L-NMMA bilateralmente no PVN

A figura 10 mostra o traçado típico da pressão arterial pulsátil, pressão arterial média e da frequência cardíaca após a microinjeção de um inibidor não seletivo da NOS e onde se pode observar um leve aumento da frequência cardíaca nesse animal.

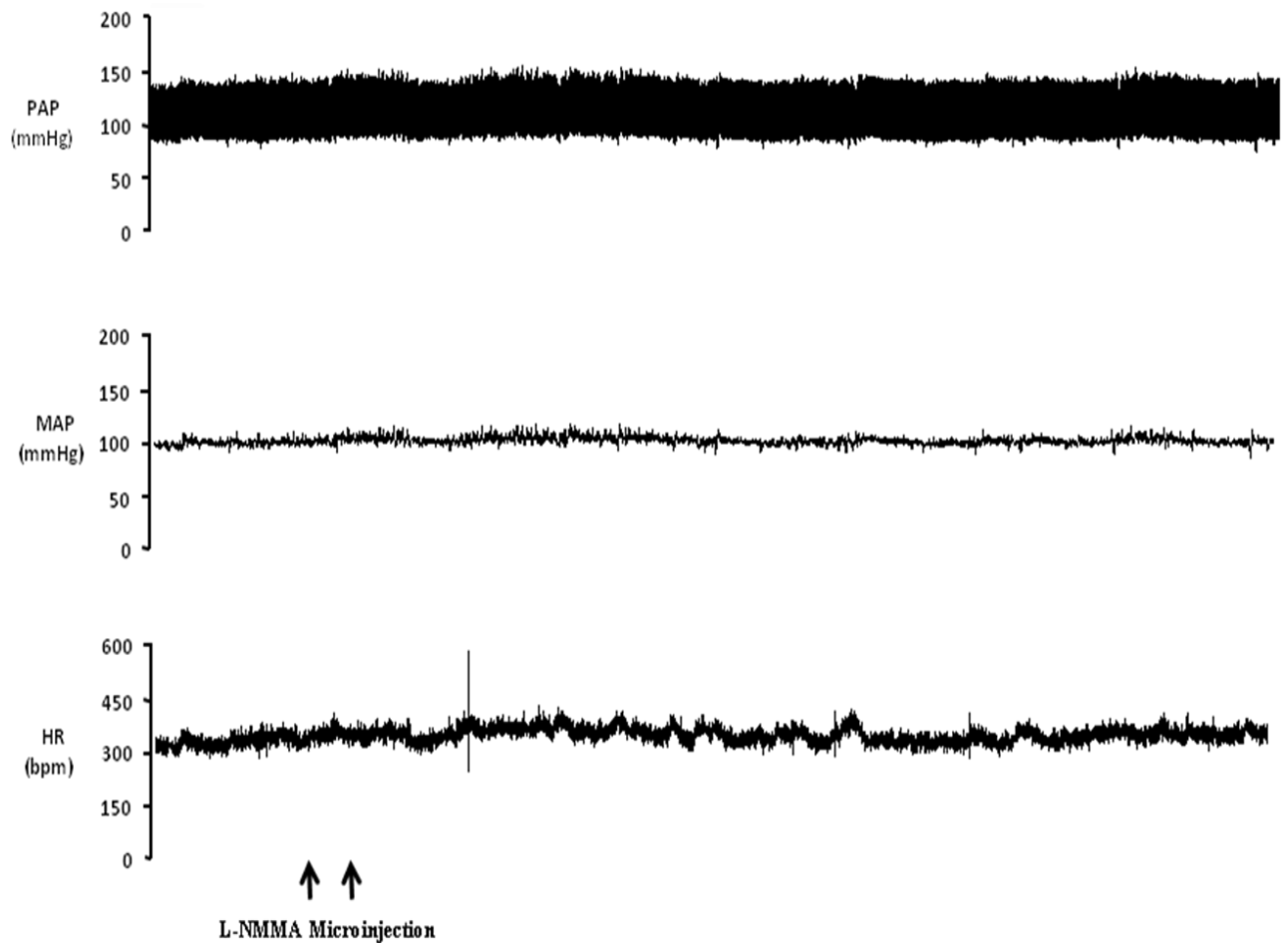


Figura 10 – Traçados típicos de pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC) em um exemplo de um registro original do grupo experimental. Grupo controle L-NMMA. As setas indicam o momento da microinjecção PVN.

5.2.4 Registro da atividade nervosa simpática renal

A figura 11 mostra a atividade nervosa simpática renal de um animal controle sem suspensão. Após a microinjeção de L-NMMA não ocorre nenhuma modificação nos spikes.

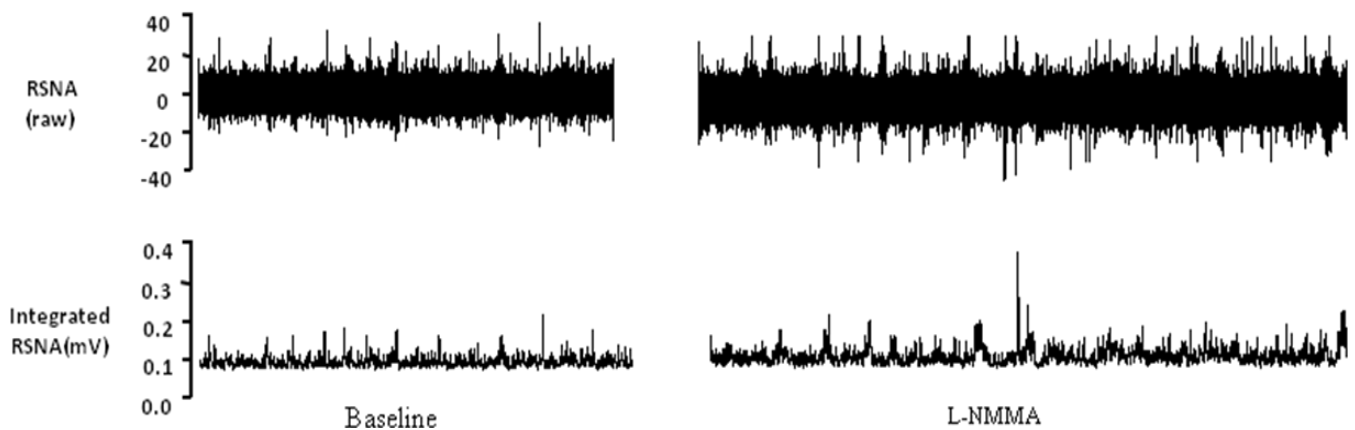


Figura 11 – Taçados típicos de um curto período (2 min) do registro de atividade nervosa simpática renal cru e integrada de um registro original do grupo experimental. Grupo controle L-NMMA. Um único rato antes e depois da microinjeção bilateral de L-NMMA no núcleo paraventricular.

5.2.5 Traçado típico de um animal Hindlimb Unloaded após a microinjeção de L-NMMA bilateralmente no PVN

A figura 12 mostra o traçado típico da pressão arterial pulsátil, pressão arterial média e da frequência cardíaca após a microinjeção de um inibidor não seletivo da NOS e onde se pode observar um aumento mais pronunciado da pressão arterial pulsátil, pressão arterial média e na frequência cardíaca desse animal.

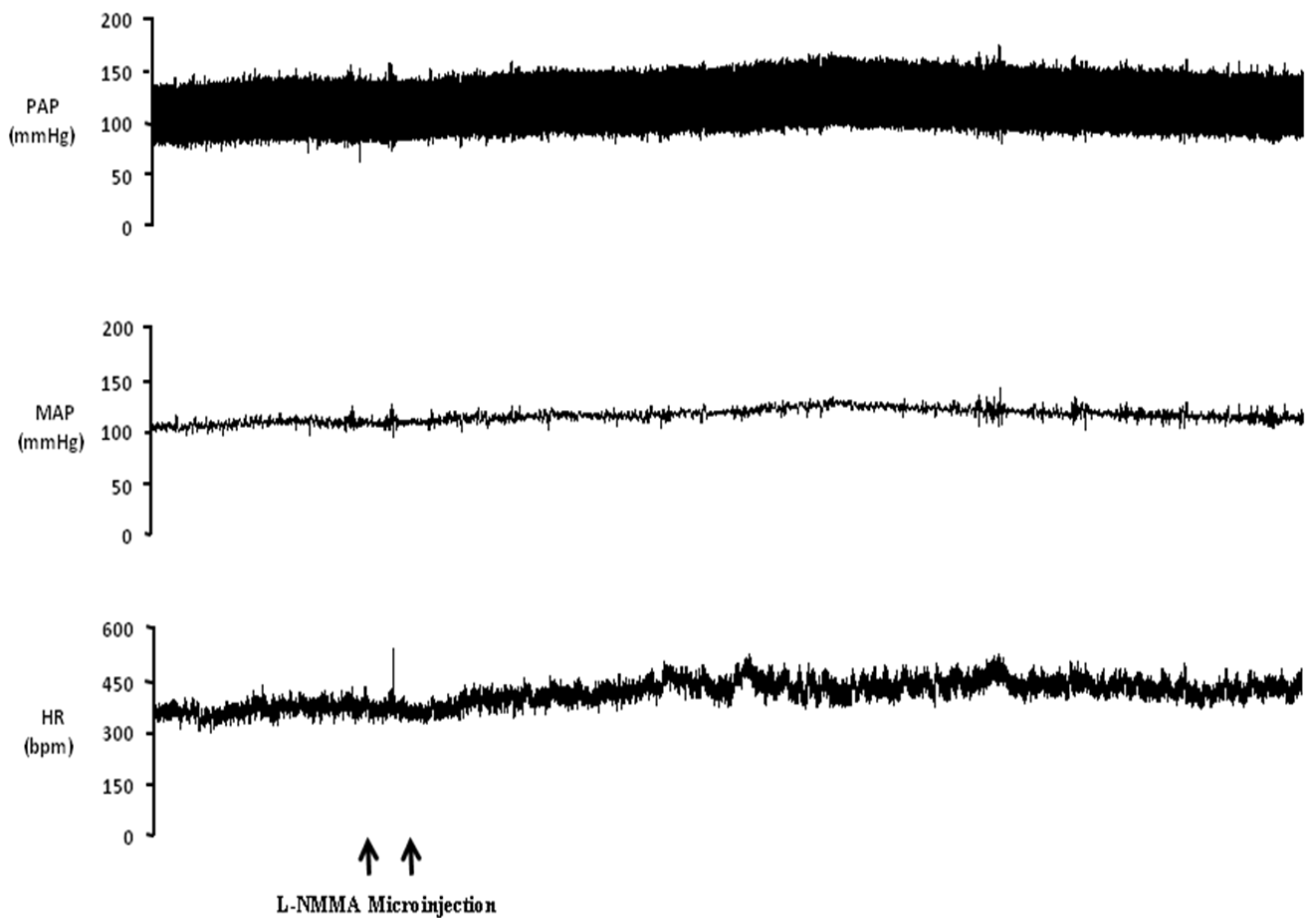


Figura 12 – Traçados típicos de pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC) em um exemplo de um registro original do grupo experimental. Grupo Hindlimb Unloaded L-NMMA. As setas indicam o momento da microinjecção PVN.

5.2.5 Registro da atividade nervosa simpática renal

A figura 13 mostra a atividade nervosa simpática renal de um animal hindlimb unloaded. Após a microinjeção de L-NMMA ocorre um aumento na atividade dos spikes.

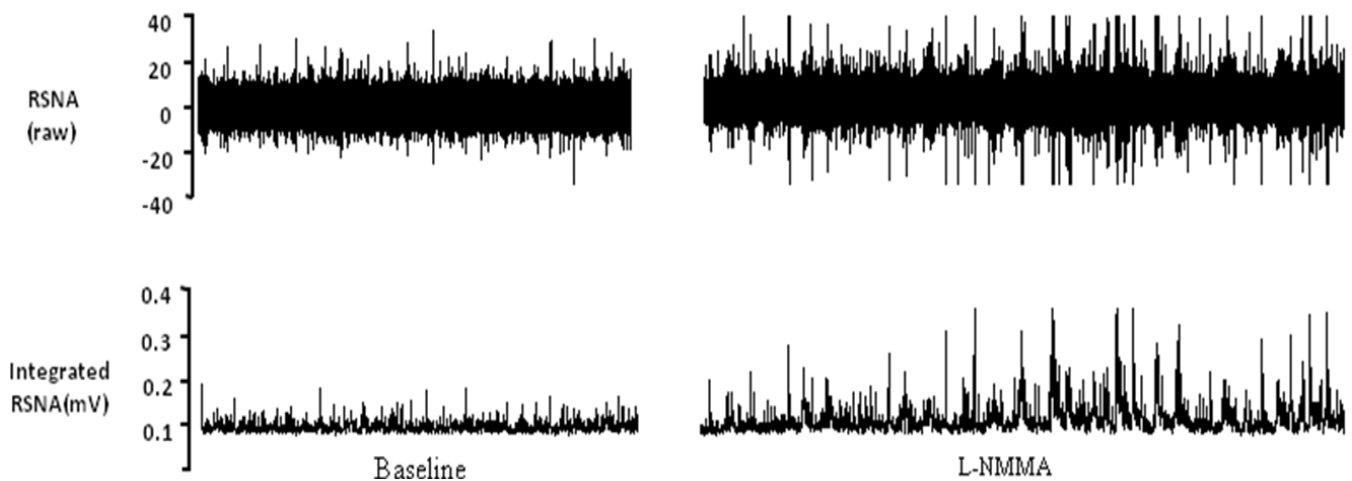


Figura 13 – Taçados típicos de um curto período (2 min) do registro de atividade nervosa simpática renal cru e integrada de um registro original do grupo experimental. Grupo hindlimb unloaded L-NMMA. Um único rato antes e depois da microinjeção bilateral de L-NMMA no núcleo paraventricular.

5.2.6 Variação da pressão arterial média, da frequência cardíaca e da atividade nervosa simpática renal de animais controle e hindlimb unloaded

A figura 14 mostra que não houve diferença significativa nos parâmetros de pressão arterial, frequência cardíaca e atividade simpática renal entre os animais HU quando comparados com os animais controle após a microinjeção de aCSF. No entanto, após a microinjeção de L-NMMA ocorre um aumento significativo da pressão arterial média, frequência cardíaca e da atividade nervosa renal nos animais controle, sendo exacerbado nos animais HU (figura 15), com exceção da frequência cardíaca.

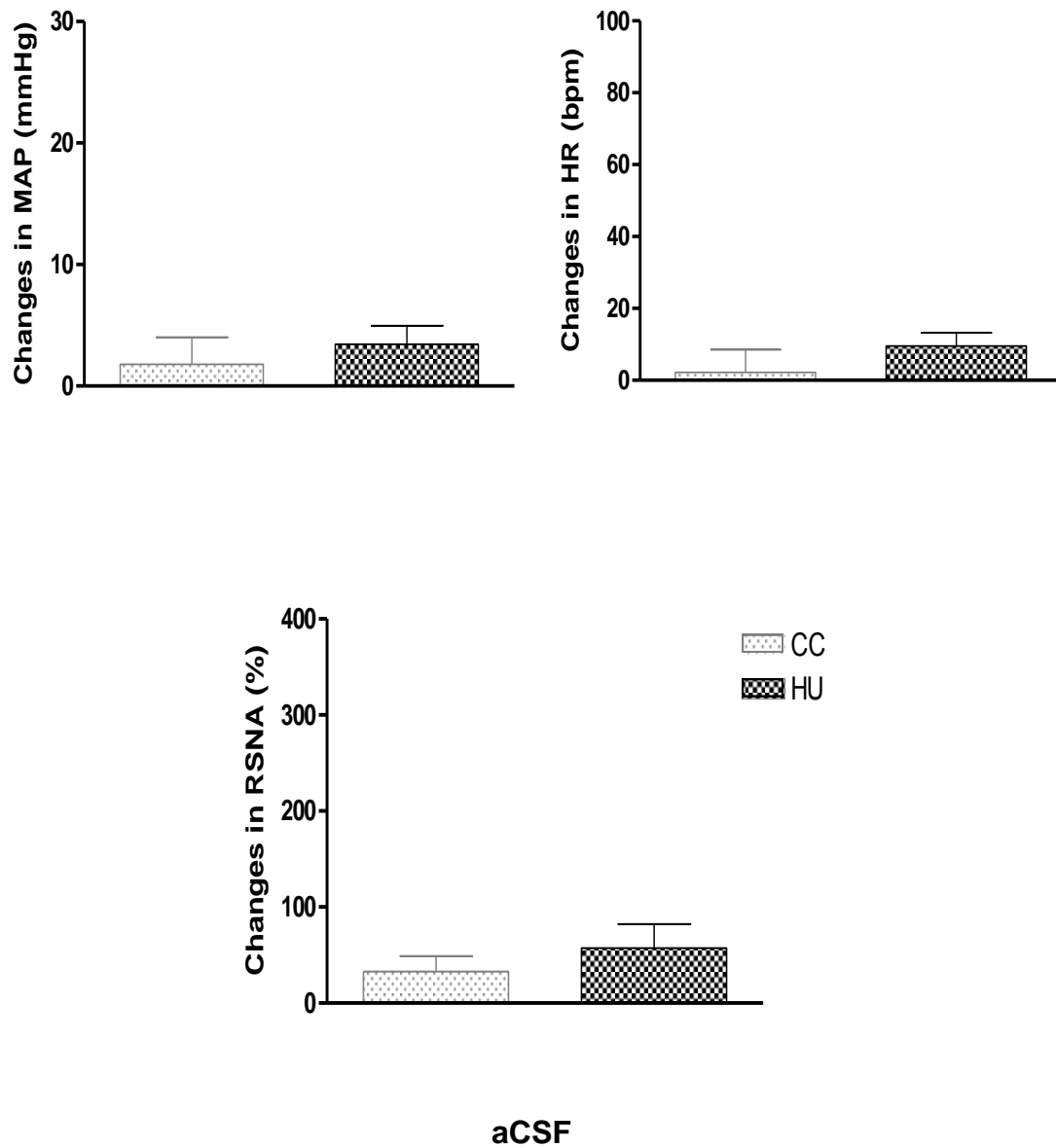


Figura 14 – Efeitos da microinjeção bilateral de aCSF no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) na pressão arterial média (MAP), frequência cardíaca (HR) e atividade nervosa simpática renal (RSNA) em ratos conscientes. Animais controle (CC=5) e animais hindlimb unloaded (HU=7).

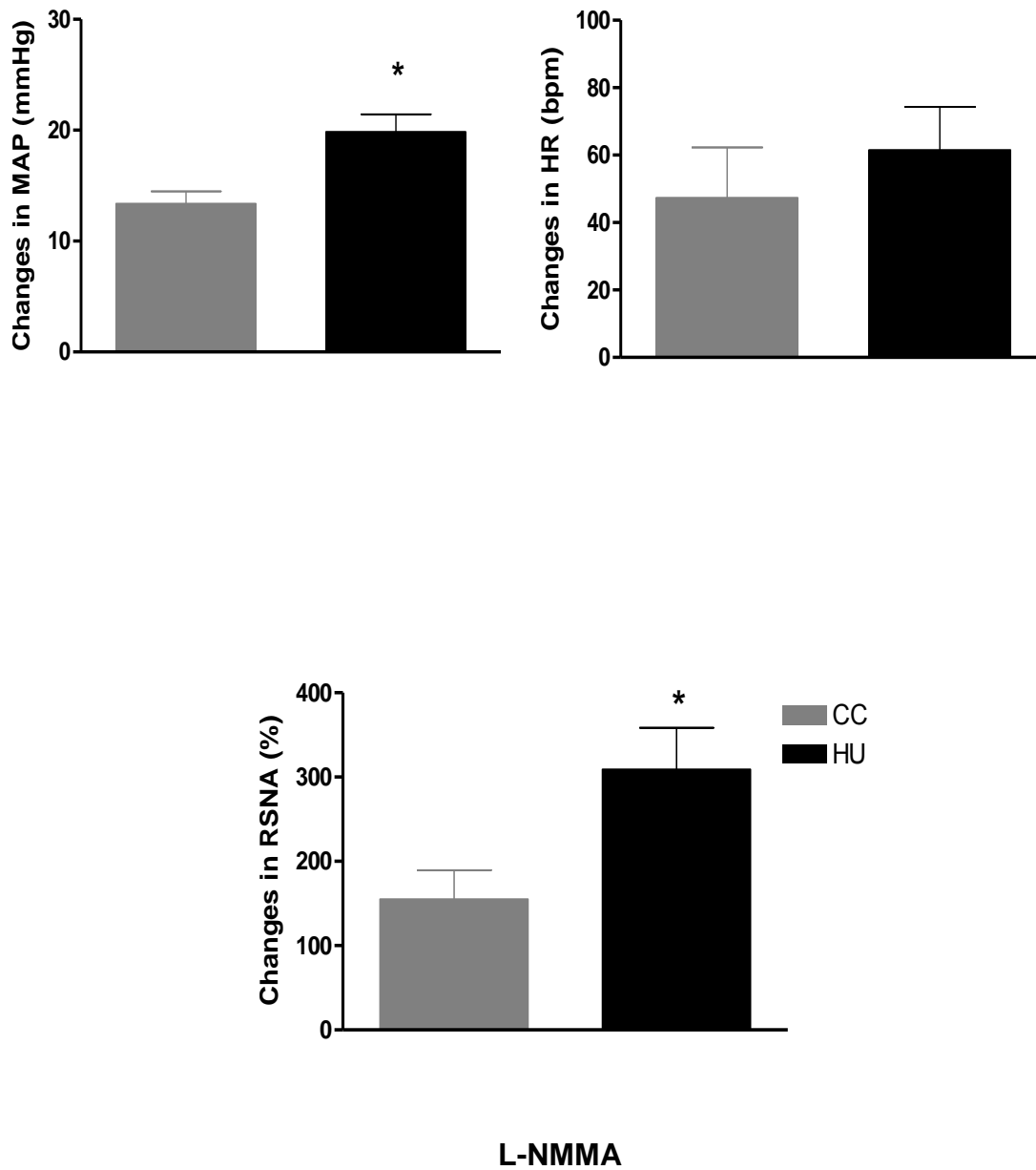


Figura 15 – Efeitos do bloqueio bilateral com L-NMMA do núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) na pressão arterial média (MAP), frequência cardíaca (HR) e atividade nervosa simpática renal (RSNA) em ratos conscientes. Animais controle (CC=5) e animais hindlimb unloaded (HU=7). Microinjeção bilateral de L-NMMA aumentou significativamente a MAP (CC: 13 ± 1 vs. HU: 20 ± 2 mmHg) e RSNA (CC: 155 ± 34 vs. HU: $309 \pm 49\%$) HR foi semelhante entre os grupos. (* $P \leq 0,05$).

5.3 Estudo III – Head-Down Tilt

5.3.1 Confirmação histológica dos sítios de microinjeção

A análise histológica demonstrou que os efeitos sobre os níveis de PAM e FC, em resposta a microinjeção das drogas utilizadas nos diferentes grupos experimentais, foram evidentes para os experimentos em que os sítios de microinjeção marcados pelo corante Vermelho Neutro encontravam-se no PVN ou nas bordas deste núcleo. A extensão do PVN considerada para a confirmação histológica foi de -1,40 e -2,12 posterior ao Bregma, de acordo com o Atlas de Paxinos e Watson (1986). Não foi possível distinguir a localização precisa na região magnocelular ou parvocelular dos grupos de neurônios atingidos pelas microinjeções.



Figura 16 –Fotomicrografia de uma lâmina histológica evidenciando os sítios de microinjeção bilateral no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN), de um animal experimental.

5.3.2 Pressão arterial média e frequência cardíaca basal dos 4 grupos.

A tabela 3 mostra que a pressão arterial média e a frequência cardíaca dos animais controle e os animais nos quais foi realizada a microinjeção de drogas não apresenta-se diferente durante o estado basal.

Tabela 3 – Valores basais de pressão arterial média (PAM, mmHg) e frequência cardíaca (FC, bpm) de todos os grupos experimentais antes e após-tratamento farmacológico. Valores expressos como média \pm EPM.*p < 0,05 comparado com os valores pré-droga.

	Vehicle (n = 7)	Nw-Propyl-L-Arginine (n = 6)	1400w (n = 6)
BASELINE			
MAP (mmHg)	102 \pm 4	100 \pm 3	101 \pm 3
HR (bpm)	350 \pm 10	347 \pm 9	348 \pm 9

5.3.3 Efeitos cardiovasculares após a microinjeção de salina e NW-Propyl-L-Arginina no PVN durante a restrição e o head down tilt (HDT)

A figura 17 mostra que o estresse de restrição induziu a um aumento de pressão arterial e de frequência cardíaca e que a microinjeção de Nw-Propyl elevou ainda mais o pico da variação da pressão arterial média quando comparado ao grupo controle. (Controle $\Delta\text{MAP} = 9 \pm 3$ mmHg ; Nw-propyl $\Delta\text{MAP} = 21 \pm 3$ mmHg, $P < 0,05$). A manobra anti ortostática (HDT) induziu a um aumento da pressão arterial média e o tratamento com Nw-Propyl elevou ainda mais esse aumento quando comparado ao grupo controle (Controle $\Delta\text{MAP} = 11 \pm 1$ mmHg; Nw-propyl $\Delta\text{MAP} = 18 \pm 3$ mmHg, $P < 0,05$). A frequência cardíaca do grupo controle embora tenha apresentado uma queda na variação tanto na restrição (Controle $\Delta\text{FC HUT} = 24 \pm 20$ bpm Nw-Propyl $\Delta\text{FC HUT} = 64 \pm 14$ bpm) quanto da mudança postural (Controle $\Delta\text{FC HUT} = 38 \pm 34$ bpm; Nw-Propyl $\Delta\text{FC HUT} = 93 \pm 15$ bpm) não houve diferença estatística em comparação ao grupo Nw-Propyl-L-Arginina.

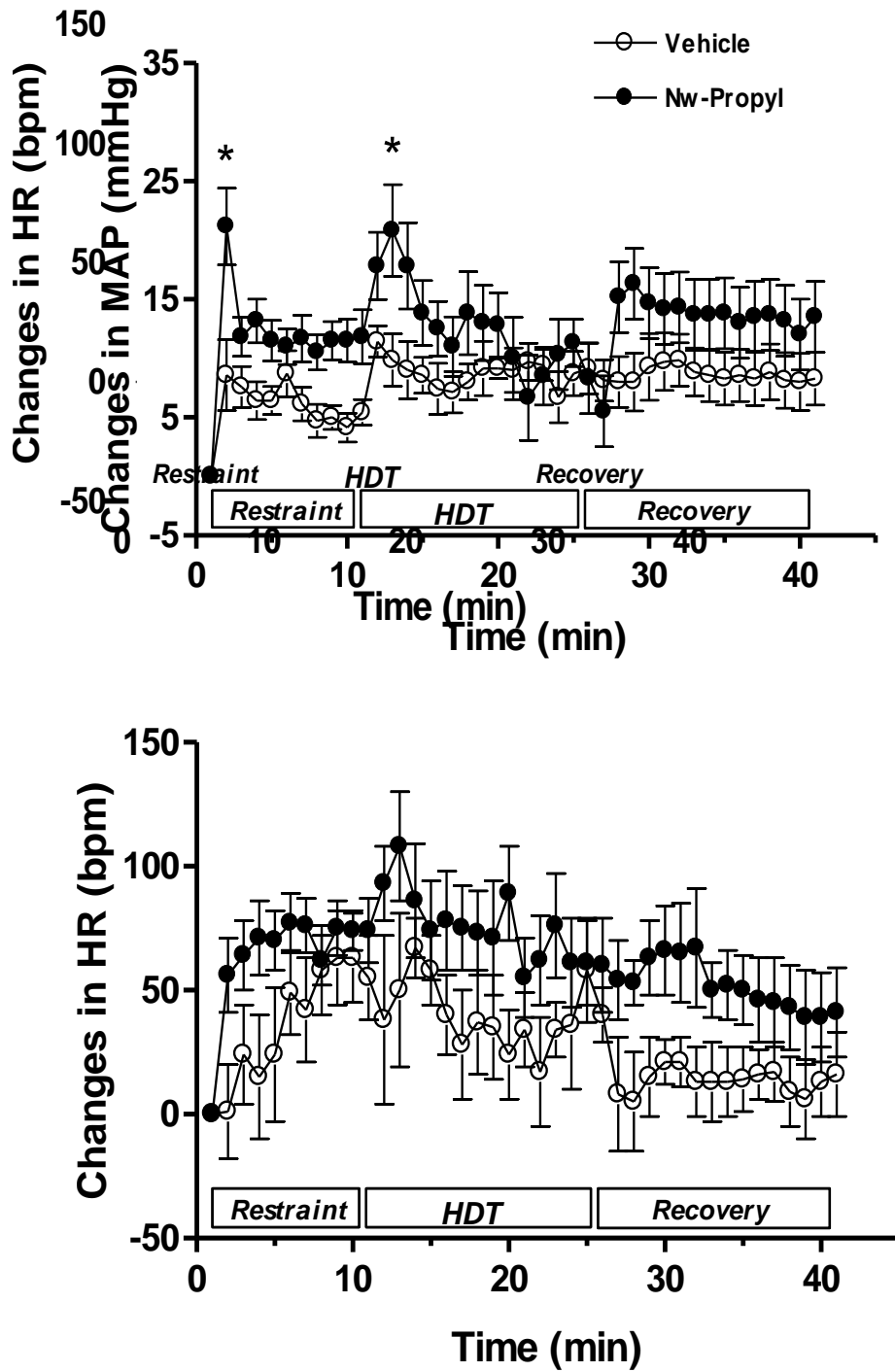


Figura 17 – Variações de pressão arterial média (PAM) e de frequência cardíaca (FC) ao longo do tempo no grupo tratado com Nw-Propyl-L-Arginina quando comparado com o grupo controle. * $p < 0,05$ comparado ao controle. (two-way ANOVA).

5.3.4 Efeitos cardiovasculares após microinjeção de salina e 1400W no PVN durante o head down tilt.

A figura 18 mostra a variação da pressão arterial média e da frequência cardíaca ao longo do tempo nos animais que foram submetidos a microinjeção de 1400W em comparação ao grupo controle. Pode-se observar que após a inibição da via induzível do óxido nítrico não houve nenhuma alteração comparada ao grupo salina.

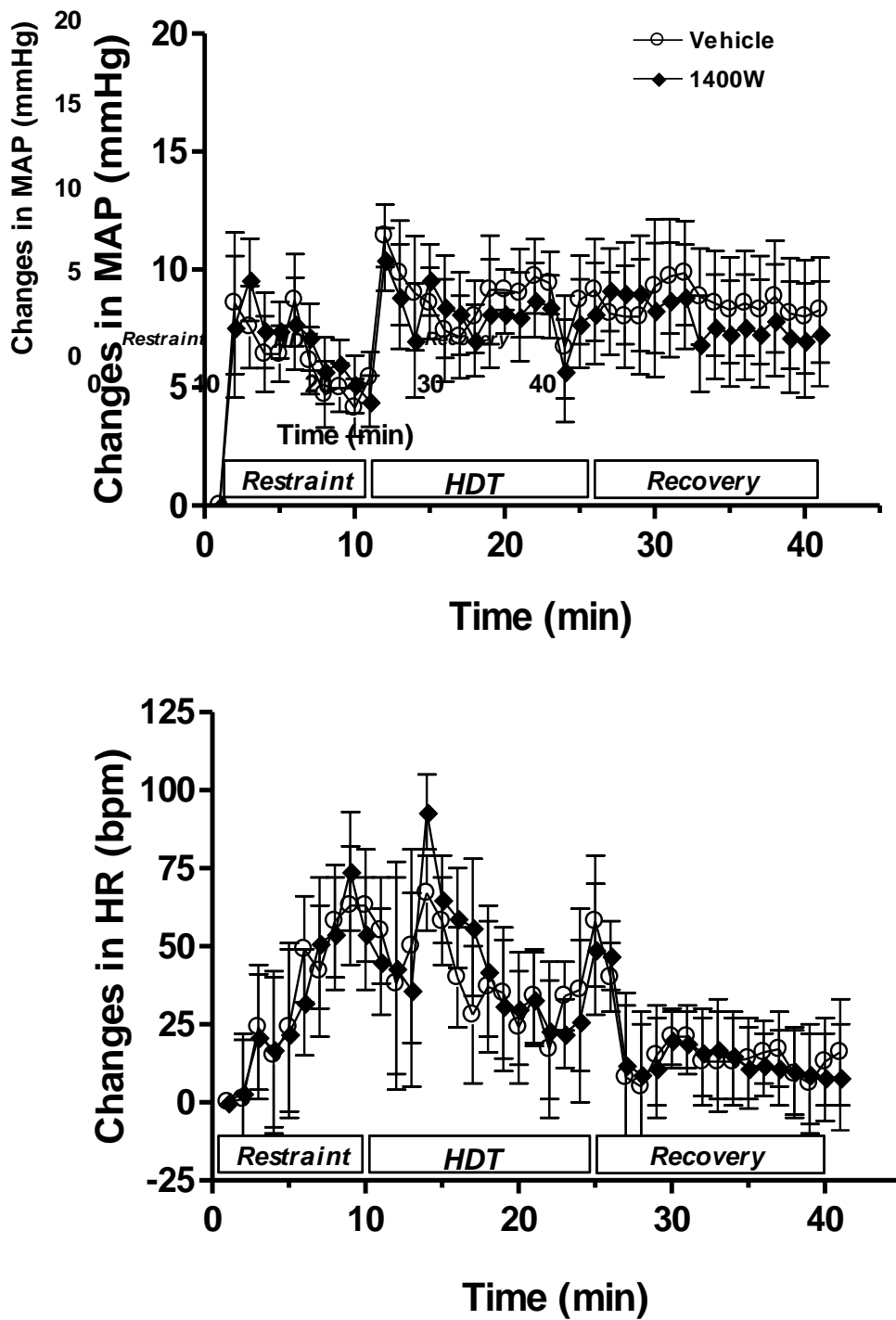


Figura 18 – Variações de pressão arterial média (PAM) e de frequência cardíaca (FC) ao longo do tempo no grupo tratado com 1400W quando comparado com o grupo controle. * $p < 0,05$ comparado ao controle. (two-way ANOVA).

5.3.5 Variação da pressão arterial média e da frequência cardíaca durante o head down tilt (HDT)

A figura 19 mostra o pico de resposta da pressão arterial média e da frequência cardíaca durante a manobra anti ortostática. Houve um aumento do pico de variação na pressão arterial nos 3 grupos quando comparado ao basal sem alteração entre eles. Porém, o grupo que teve a inibição da via neuronal do óxido nítrico no PVN, apresentou um aumento maior no pico de variação da frequência cardíaca (Controle ΔFC HDT = 9 ± 3 bpm; Nw-Propyl ΔFC HDT = 47 ± 17 bpm, $P < 0,05$).

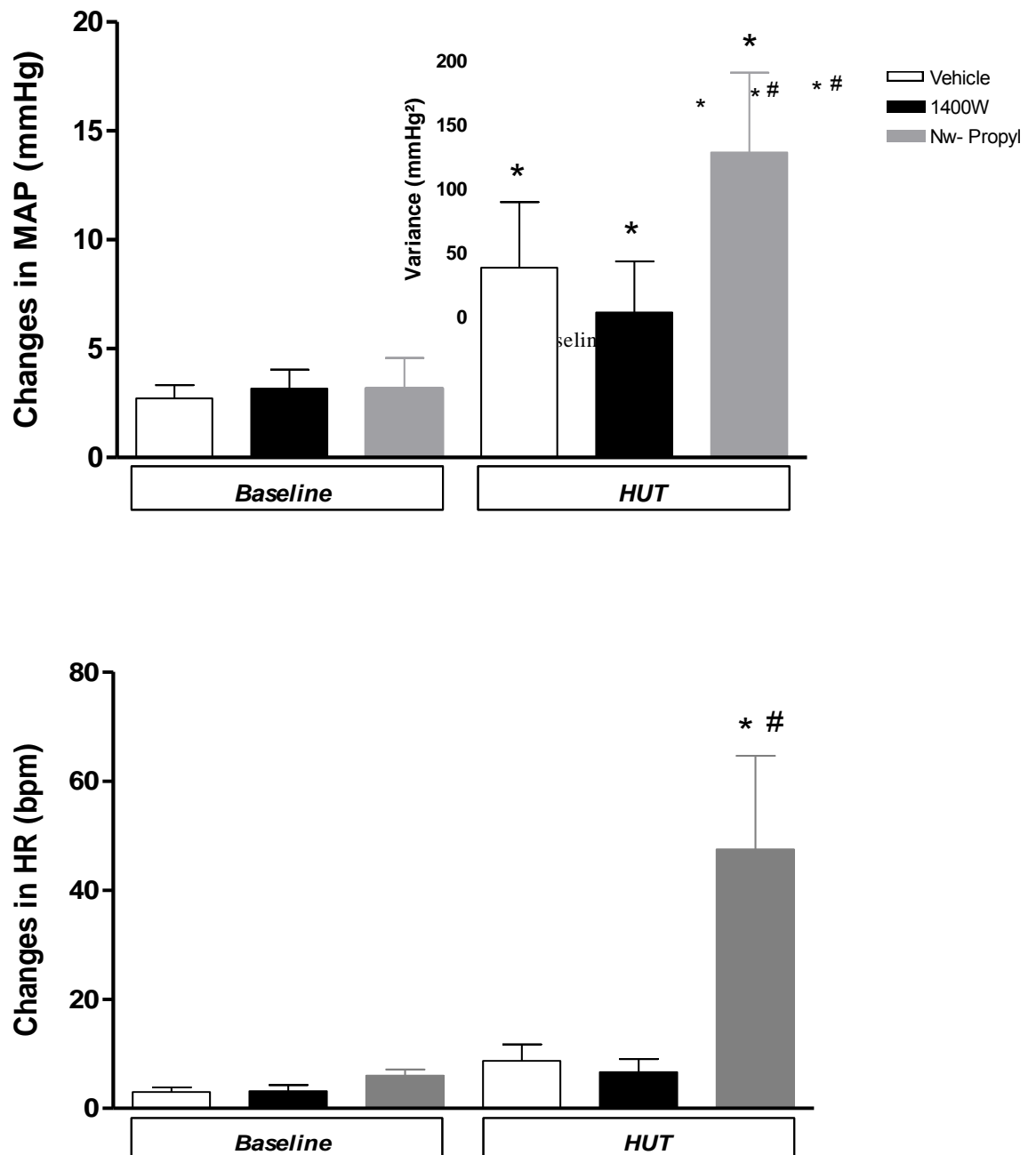


Figura 19 – Efeito da microinjeção de salina (n = 7) ou 1400W (2 nmol, n = 6) ou NW-Propyl (4 nmol, n = 6) no PVN nos parâmetros cardiovasculares de pressão arterial média (PAM) e de frequência cardíaca (FC) durante o HDT (último minuto de contenção em relação ao pico de resposta do HUT). Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média (SEM). Uma diferença significativa foi observada entre o grupo salina em comparação com o grupo Nw-Propyl-L-Arginina na resposta de frequência cardíaca. (*p <0,05 comparação com o basal, # p <0,05 comparação com o controle).

5.3.6 Análise espectral do intervalo de pulso e da pressão arterial sistólica durante o head down tilt (HDT)

Nos parâmetros espectrais da pressão arterial sistólica (PAS) a figura 20 mostra um aumento do componente espectral da variância durante o HDT no grupo controle (basal = 128 ± 2 mmHg²; HDT = 145 ± 3 mmHg², $P < 0,05$) assim como um aumento do componente LF (basal = $5 \pm 0,6$ mmHg²; HDT = 13 ± 1 mmHg², $P < 0,05$). O grupo Nw-Propyl apresentou um aumento no componente da variância (HDT controle = 145 ± 3 mmHg²; HDT Nw-Propyl = 151 ± 5 mmHg², $P < 0,05$) e LF (HDT controle = 13 ± 1 mmHg²; HDT Nw-Propyl = 21 ± 2 mmHg², $P < 0,05$) durante a manobra anti ortostática.

Durante a mudança anti ortostática ocorreu uma diminuição da variância no grupo controle no parâmetro espectral do intervalo de pulso (basal = 153 ± 4 ms²; HDT = 125 ± 3 ms², $P < 0,05$) e um aumento do componente HF (basal = $5 \pm 0,7$ ms²; HDT = 15 ± 2 ms², $P < 0,05$). Apenas a microinjeção de Nw-Propyl promoveu alterações nos componentes LF e HF tanto absolutos quanto normalizados: um aumento no LF absoluto (HDT controle = $3 \pm 0,8$ ms²; HDT Nw-Propyl = 10 ± 1 ms², $P < 0,05$) e normalizado (HDT controle = 28 ± 5 ms² nu; HDT Nw-Propyl = 56 ± 3 ms² nu, $P < 0,05$), e uma atenuação no componente HF tanto absoluto (HDT controle = 15 ± 2 ms²; HDT Nw-Propyl = $6 \pm 0,6$ ms², $P < 0,05$) quanto normalizado (HDT controle = 79 ± 2 ms² nu; HDT Nw-Propyl = 55 ± 4 ms² nu, $P < 0,05$) como mostrado na figura 21.

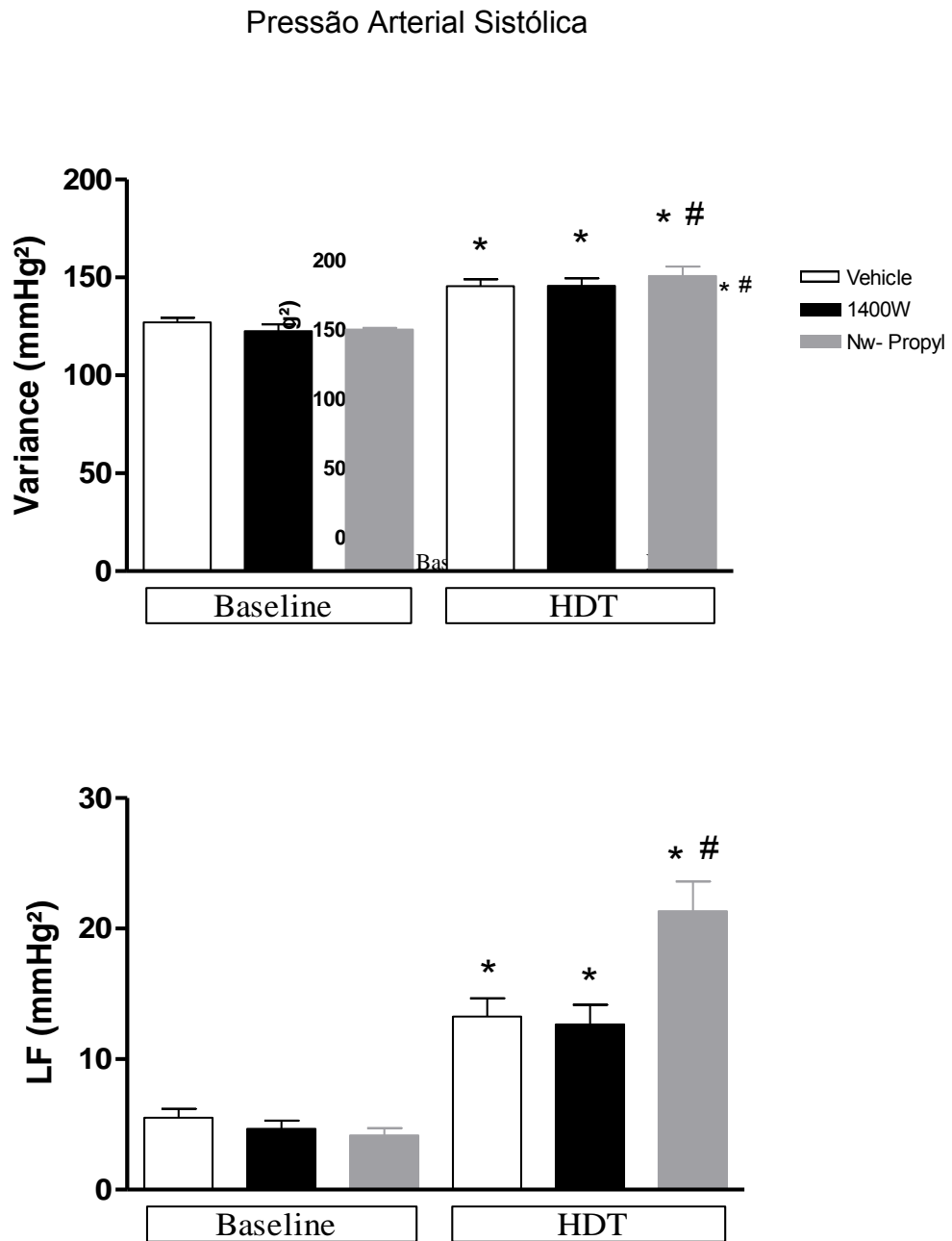


Figura 20 – Parâmetros espectrais de pressão arterial sistólica dos grupos tratado com Nw-Propyl e 1400w em comparação com o grupo controle. LF: faixa de baixa frequência absoluta; HF: faixa de alta frequência absoluta; * $p < 0,05$ comparado ao baseline, # $p < 0,05$ comparado ao controle. (two-way ANOVA).

Intervalo de Pulso

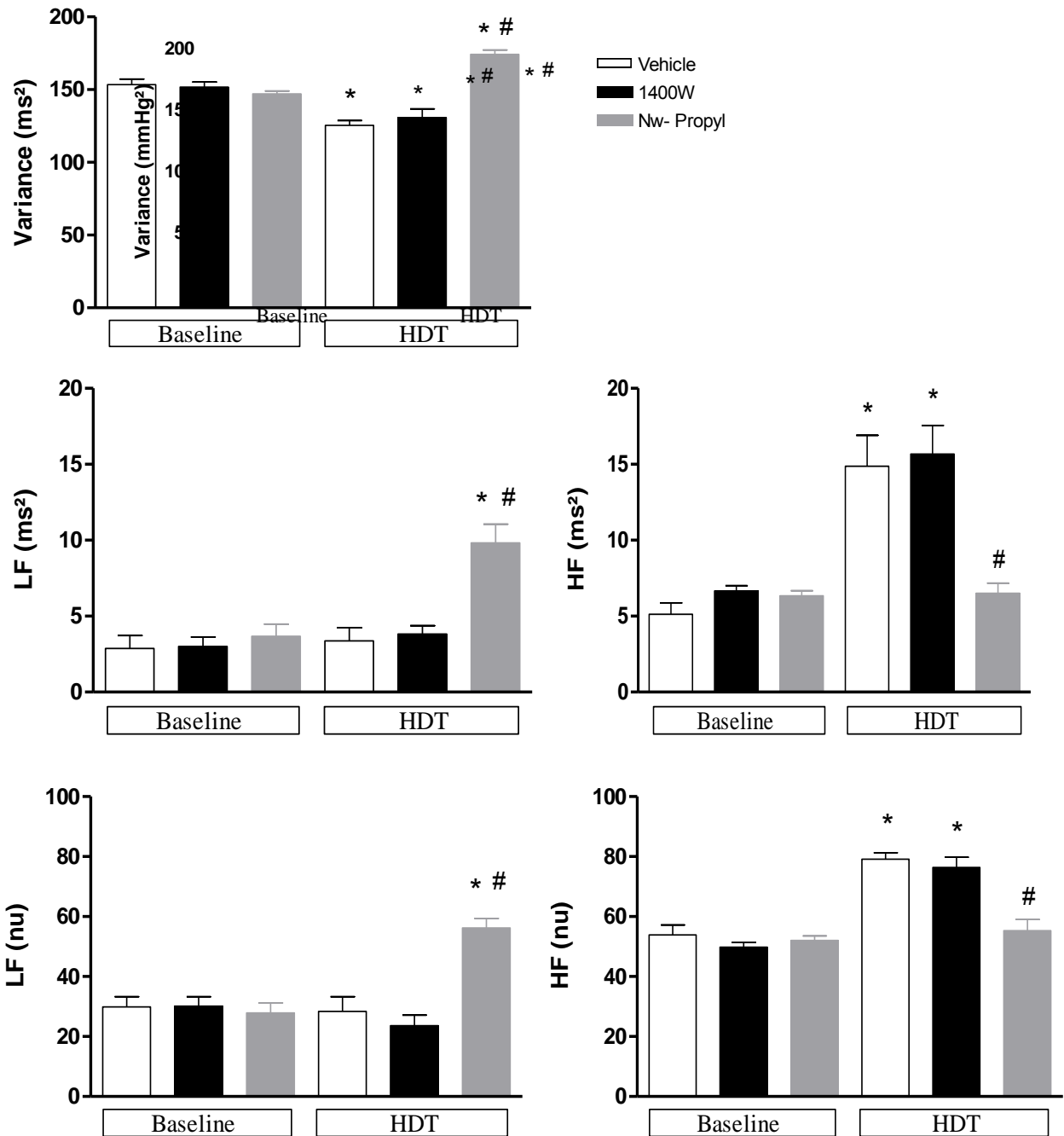


Figura 21 – Parâmetros espectrais de intervalo de pulso dos grupos tratado com Nw-Propyl e 1400w em comparação com o grupo controle. LF: faixa de baixa frequência absoluta; Lfun: faixa de baixa frequência normalizada; HF: faixa de alta frequência absoluta; Hfun: faixa de alta frequência normalizada; *p<0,05 comparado ao baseline, # p<0,05 comparado com o controle. (two-way ANOVA).

5.3.7 Análise da sensibilidade do barorreflexo espontâneo

A figura 22 mostra o índice de efetividade do barorreflexo que está diminuído em todos os grupos após a mudança anti ortostática. No entanto o ganho barorreflexo total não se mostrou diferente entre o período basal e o head down tilt.

Sensibilidade do Barorreflexo Espontâneo

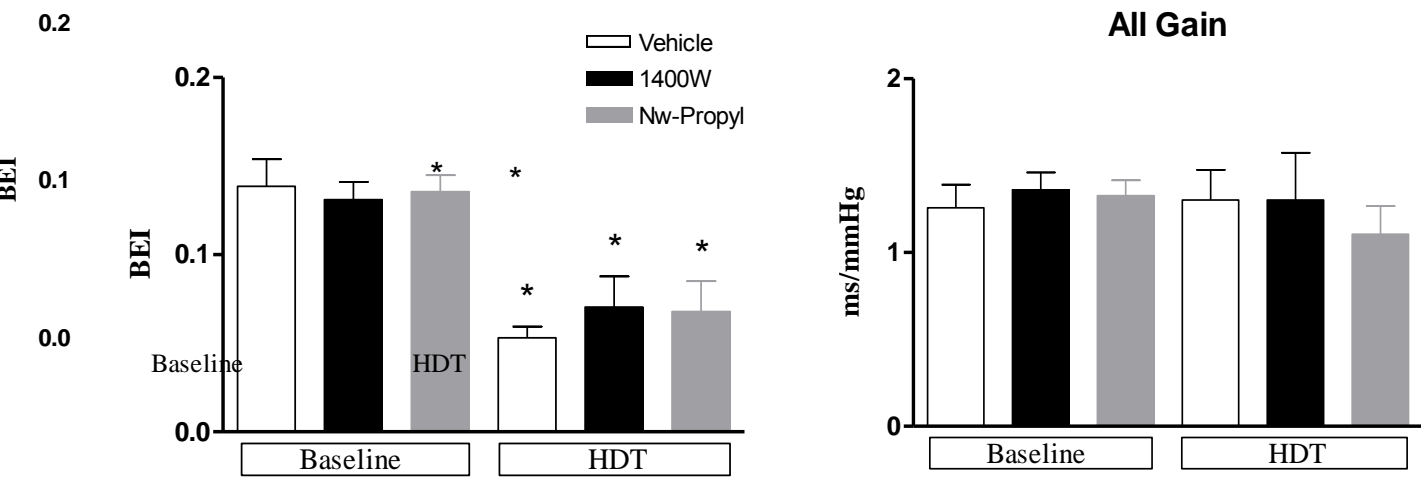


Figura 22 - Efeito do tratamento com salina, 1400W e Nw-propil-L-Arginina no PVN de ratos sobre as flutuações espontâneas do reflexo barorreceptor durante o período basal e o head-down tilt (HUT). Gráfico mostra o índice de efetividade do barorreflexo (BEI) e o ganho total do barorreflexo.* p <0,05 em comparação com o basal, two-way ANOVA.

6. DISCUSSÃO

6.1 Estudo I – Head-Up Tilt

No presente estudo, nós pudemos observar que a adição de NO no PVN (microinjeção do doador de NO) não promoveu alterações nos parâmetros cardiovasculares durante o HUT. Da mesma forma a inibição da nNOS também não promoveu diferenças nos parâmetros cardiovasculares em comparação com o grupo salina durante o HUT. Por outro lado, após a inibição da iNOS observamos uma atenuação da pressão arterial durante o HUT. Os dados sugerem que a fonte de NO a partir de iNOS e não da nNOS no PVN parece participar dos efeitos cardiovasculares induzidos pelo HUT.

A literatura demonstra que a atividade simpática elevada está fortemente associada com o aparecimento de doença cardiovascular e esses efeitos são, em parte, gerados a partir dos neurônios simpáticos do PVN (ZHANG et al., 2002 e FLORAS, 2009), onde com a redução da atividade dos neurônios do PVN em produzir NO podem levar a uma aumento da atividade simpática do nervo renal (LI et al., 2002). Nesse sentido, a análise espectral da pressão arterial sistólica e variabilidade da frequência cardíaca no nosso estudo mostrou que o aumento da concentração de óxido nítrico, adicionando um doador de NO no PVN, promoveu uma diminuição da modulação simpática do intervalo de pulso mostrando um papel inibitório do NO no PVN através da modulação autonômica cardíaca durante o HUT, que está de acordo com a literatura (PATEL et al., 2001 e MASTELARI et al., 2011).

No entanto, os parâmetros espectrais da SAP não apresentaram nenhuma diferença assim como as mudanças na MAP foram mantidas em valores semelhantes em comparação com o grupo controle durante o HUT após a adição de DEA-NONOate. Embora vários investigadores demonstraram a função inibidora de NO na PAM e na atividade do nervo simpático renal (HASHIGUCHI et al, 1997; ZHANG et al, 1997 e LI et al, 2001), evidências recentes têm sugerido um efeito excitatório mediado por um sistema guanilato ciclase-NO local no PVN (BUSNARDO et al., 2010b). Além disso, os efeitos excitatórios e inibitórios do NO foram demonstrados em outras áreas cardiovasculares (HIROOKA e DAMPNEY, 1996; MARTINS-PINGE et al, 1997 e PATEL et al., 2001.). Estas diferenças têm sido discutidas como sendo devido a diferenças nas concentrações dos fármacos utilizados, espécies utilizadas ou estado consciente do animal (MORIMOTO et al., 2000), ou devido as diferentes vias ativadas pelo NO (MARTINS-PINGE et al., 2007).

A ativação do PVN durante o HUT poderia resultar no controle diferencial de fluxo simpático, como evidenciado na RVLM que é capaz de produzir diferentes padrões de ativação simpática em ratos (MUELLER et al., 2011). Em nosso estudo o aumento dos níveis de NO no PVN não produziu qualquer efeito durante alterações posturais agudas, em situações fisiológicas, embora o aumento do nível NO no PVN parece estar relacionado com alterações ortostáticas crônicas, como o descondicionamento cardiovascular que ocorre durante os voos espaciais (MUELLER et al., 2003) .

Os nossos dados sugerem que o NO no PVN pode influenciar os ajustes cardiovasculares encontrados durante o HUT dependendo da via de ativação do

NO, sendo que, enquanto nNOS parece não estar envolvida, a via da iNOS parece contribuir para efeitos excitatórios. Os nossos resultados estão em conformidade com o conceito de que o NO produzido a partir da nNOS tem efeitos inibitórios no PVN (PATEL et al, 2001;. STERN et al, 2003 e MARTINS-PINGE et al, 2013). Já o NO produzido pela ativação da via iNOS, assim como de citocinas inflamatórias, está relacionado com os efeitos simpatoexcitatórios dos neurônios do PVN (YAMAGUCHI et al, 2010;. 2009 e GUGGILAM et al., 2008).

Há uma notável capacidade do sistema cardiovascular para manter a pressão arterial estável quando imposta forças que constantemente mudam e redistribuem o volume de sangue circulante. Ajustes rápidos de curto prazo ao estresse postural são mediados exclusivamente por vias neuronais do sistema nervoso autônomo. O sistema nervoso simpático é essencial para a manutenção do fluxo sanguíneo durante o desafio ortostático e alterações nestes mecanismos fisiológicos podem levar à intolerância ortostática (MUELLER et al., 2003). A modulação cardiovascular e autonômica durante HUT assim como o envolvimento do PVN foi demonstrado em estudos anteriores do nosso grupo (DE ANDRADE et al. 2012 e 2014). Quando a transmissão sináptica no PVN foi bloqueada utilizando-se cloreto de cobalto, a hipertensão observada durante o HUT foi revertida para uma considerável redução na PAM (DE ANDRADE et al., 2012), sugerindo um papel importante do PVN durante as compensações cardiovasculares ao HUT.

Atualmente sabe-se que o estresse contribui para o surgimento de várias doenças humanas, principalmente de distúrbios cardiovasculares e é um dos fatores importantes para ativar o sistema nervoso simpático. O PVN tem sido considerado como um núcleo responsável pela integração de respostas autonômicas,

neuroendócrinas e comportamentais ao estresse agudo de contenção (BUSNARDO et al., 2010a). Por outro lado, estudos utilizando protocolo de estresse por jato de ar observaram um aumento da atividade neuronal no núcleo hipotalâmico dorsomedial (DMH) e não no PVN, na geração das alterações cardiovasculares (STOTZ-POTTER et al., 1996 e DIMICCO et al., 2002) e também, o DMH parece responder na coordenação das respostas neuroendócrinas, autonômicas e comportamentais ao estresse emocional (FONTES et al., 2011).

Recentemente, o baroreflexo espontâneo vem sendo amplamente utilizado para verificar a efetividade e sensibilidade do baroreflexo por meio de técnicas simples, em que as pequenas flutuações espontâneas de pressão arterial geram alterações no intervalo RR (Schwartz et al., 2013). Previamente, um trabalho de nosso laboratório forneceu dados demonstrando que o PVN pode modular tonicamente o barorreflexo, mas durante o estresse ortostático sua efetividade não parece ser necessária (De Andrade et al., 2014). Neste estudo, nós fornecemos evidências de que o NO também está envolvido no ganho do barorreflexo durante o HUT, enquanto após a inibição da nNOS não haja diferenças no barorreflexo espontâneo, quando ocorre a oferta de NO ou a inibição da via da iNOS, observamos alterações nesse parâmetro.

Em nosso estudo, a contenção evidenciou um aumento na variância total no parâmetro da SAP do grupo controle e, depois do tratamento com doador de óxido nítrico, apenas a variância total dos valores dos parâmetros do IP foi diminuída. A mesma resposta ocorre após o tratamento com os inibidores da nNOS e iNOS evidenciando a contribuição do PVN na modulação autonômica durante a

contenção. Entendemos que tanto o núcleo hipotalâmico dorsomedial e o núcleo paraventricular do hipotálamo têm sido implicados no controle neural da resposta ao estresse cardiovascular dada a proximidade e as ligações entre estes núcleos neuronais.

Em resumo, nossos dados sugerem um envolvimento NO no PVN durante o HUT em adaptações cardiovasculares e autonômicas. A inibição da iNOS atenuou a pressão arterial elevada durante o HUT, enquanto que o aumento de NO ou a inibição da nNOS não promoveu nenhuma alteração nos parâmetros cardiovasculares observados. A inibição da iNOS promoveu uma alteração na maioria dos componentes espectrais, principalmente promovendo uma diminuição do componente simpático durante o HUT. Mais estudos são necessários para entender este complexo sistema e determinar de que maneira o NO interage com outros neurotransmissores no PVN no controle das respostas cardiovasculares e autonômicas durante desafios posturais.

6.2 Estudo II- Hindlimb Unloaded

As principais conclusões deste estudo foram que as respostas cardiovasculares e de atividade simpática renal após a inibição da NOS no PVN estão aumentadas após 14 dias de suspensão de membros posteriores pela cauda em ratos em comparação aos animais controle que não foram suspensos. Estas respostas estão atenuadas na condição controle. A simulação de microgravidade ou de repouso prolongado leva a um aumento do NO no PVN (MUELLER, 2003; MUELLER et al., 2006), e esse aumento pode ser responsável pelas alterações cardiovasculares e autonômicas observadas. Os animais suspensos pela cauda em nosso estudo apresentaram um maior aumento da PAM e da RSNA após a microinjeção bilateral de L-NMMA no PVN em animais conscientes, evidenciando um maior efeito tônico inibitório pelo NO. Estes dados sugerem que a microgravidade simulada ou repouso prolongados, levam a inibição aumentada do PVN mediada por um aumento de NO.

Os ratos suspensos pela cauda por um período prolongado exibiram algumas das mesmas mudanças que ocorrem nos seres humanos depois da exposição à microgravidade ou ao repouso prolongado, como: atrofia muscular e taquicardia de repouso (HASSER e MOFFITT, 2001; MOREY-HOLTON e GLOBUS, 2002). Estudos prévios indicam que a atividade de aferentes dos barorreceptores, em resposta a alterações na pressão arterial estão inalteradas em ratos HU. No entanto, o aumento da atividade nervosa simpática eferente está prejudicada nesses animais, que apresentam uma grande redução na resposta barorreflexa

após o HU. Embora a informação aferente permaneça intacta, os estudos sugerem que ocorram mudanças no processamento de informações eferentes no SNC (MOFFITT et al., 1999, FOLEY et al., 2005). Nesse sentido, os ratos suspensos por um período prolongado, quando foram retirados da suspensão e retornam à posição normal apresentaram um maior aumento da pressão arterial média e da atividade simpática do nervo renal após a inibição da NOS no PVN em comparação com o grupo controle, portanto, nossos dados estão de acordo com estudos anteriores.

Vários estudos têm mostrado que o PVN é um núcleo do cérebro altamente integrador de várias funções, e está principalmente envolvido na função cardiovascular. Há um crescente número de evidências na literatura que sugerem que o bloqueio da enzima óxido nítrico sintase (NOS) no PVN produz um aumento na pressão arterial e uma simpatoexcitação (BREDT DS et al., 1990; KRUKOFF e KHALILI, 1997; LI et al., 2002; PATEL e ZHANG, 1996; VINCENT e KIMURA, 1992; ZHANG e PATEL, 1998). Uma interação entre NO e GABA parece estar envolvido na inibição tônica da atividade simpática basal (COOTE, 2004) e evidências da literatura sugerem um efeito NO mediado pelo GABA no PVN sobre a atividade simpática renal (ZHANG e PATEL, 1998).

O NO parece colaborar para os efeitos do treinamento físico em promover alterações na neurotransmissão pelo PVN e isso pode contribuir para o aumento da ativação parassimpática e diminuição da modulação simpática em condição fisiológica (MASTELARI et al., 2011). Da mesma forma, a inibição do NO dentro do PVN anulou a atividade simpática do nervo renal em ratos com insuficiência cardíaca (ZHANG et al., 2001) e o treinamento físico melhorou e alterou

mecanismos mediados pelo NO dentro do PVN, modificando a atividade nervosa simpática renal de ratos (ZHENG et al., 2005), e sugerindo uma modulação mediada pelo NO dentro do PVN após exercício em condições fisiopatológicas.

Em resumo, nossos dados mostram que 14 dias de suspensão pela cauda produziu um aumento do efeito tônico mediado pelo óxido nítrico no PVN na regulação cardiovascular e simpática. Estes efeitos podem ser importantes para restaurar o volume e as alterações cardiovasculares impostas pela ausência de gravidade.

6.3 Estudo III – Head-Down Tilt

Neste presente estudo, nos pudemos observar que a inibição da via neuronal do óxido nítrico no PVN utilizando um inibidor seletivo da iNOS (1400W) não promoveu nenhuma alteração cardiovascular ou autonômica diferente do controle em animais submetidos a manobra postural anti ortostática em um curto período de tempo. De maneira diferente, a inibição da via neuronal do óxido nítrico no PVN utilizando um inibidor seletivo (Nw-Propyl-L-Arginina) promoveu um aumento nos parâmetros cardiovasculares assim como nos componentes autonômicos, principalmente no componente LF relacionado ao sistema autonômico simpático, tanto da pressão arterial sistólica quanto do intervalo de pulso em animais acordados e submetidos ao a mudança postural anti ortostática.

O desenvolvimento de técnicas médicas que garantissem um melhor entendimento dos aspectos fisiológicos que ocorrem durante as mudanças posturais cresceu consistentemente nas últimas décadas e contribuiu imensamente para uma melhor compreensão de possíveis mecanismos que podem levar ao comprometimento desse sistema de adaptação. Alguns estudos mostraram que ao assumir a postura anti ortostática (Head Down Tilt, HDT), imediatamente ocorrem adaptações fisiológicas cardiovasculares como: um aumento do retorno venoso e do débito cardíaco e simultaneamente uma redução da frequência cardíaca como observado em humanos (BUTLER et al., 1990; GALANIS et al., 2012) assim como em modelos animais (RAFFAI et al., 2006).

Em nosso trabalho a análise da variabilidade da pressão arterial sistólica e da frequência cardíaca pode evidenciar que nos animais controle submetidos ao head down tilt houve um aumento da variância e do componente LF no parâmetro espectral relacionado à pressão arterial sistólica e aumentos também da variância e do componente LF tanto em valores absolutos quanto normalizados e queda do componente HF tanto de valores absolutos quanto normalizados no parâmetro espectral relacionado á frequência cardíaca. Ocorrendo assim, um aumento na pressão arterial média, embora a frequência cardíaca não tenha mostrado nenhuma alteração. Esses dados corroboram com as informações encontradas na literatura (BUTLER et al., 1990; RAFFAI et al., 2006; KALPANA et al., 2013;).

No estudo de Kalpana et al., (2013), foi evidenciada a queda da frequência cardíaca durante o head down tilt (HDT), sendo linearmente proporcional ao ângulo de inclinação adotado 30°, 60°, 80°. Em nosso estudo, utilizamos a inclinação de 75° no HDT que causou queda da frequência cardíaca através do aumento do componente parassimpático quando analisamos a variabilidade da frequência cardíaca. É possível que mudanças nos fatores hormonais possam contribuir também para essa diminuição. Alguns trabalhos mostraram que em um curto espaço de tempo ocorre uma diminuição na atividade plasmática da renina e de aldosterona durante o HDT (GHARIB et al., 1988; HUGHSON et al., 1995; KOSKA et al., 2003).

Apesar de ocorrer consideráveis mudanças no volume sanguíneo durante o HDT, estudos demonstraram que tanto o fluxo quanto a perfusão sanguínea cerebral permanece bem estabilizada durante severas mudanças posturais

(GELINAS et al., 2012), embora ocorra um aumento da pressão intracraniana logo após o início da mudança postural (TATEBAYASHI et al., 2003). Esses achados contribuem de forma relevante para o nosso estudo, assegurando que o fluxo e a perfusão do cérebro permanecem inalterados durante a posição antiortostática e não seriam a causa para as alterações ocorridas no núcleo paraventricular do hipotálamo.

Trabalhos na literatura têm evidenciado que regiões do sistema nervoso central como a RVLM respondem de forma diferenciada quando da inibição das vias do NO (CHAN et al., 2001). Assim como o NO derivado da iNOS diminui a resposta glutamatérgica na RVLM, a nNOS aumentaria essa neurotransmissão mediada pelo glutamato (MARTINS-PINGE et al., 2006). Além disso, trabalhos como de Stern et al., (2003) mostrou que neurônios pré-autonômicos do PVN que se projetam para a RVLM são modulados pelo NO. Nesse mesmo sentido, vários trabalhos tem mostrado as vias de produção do NO, pela iNOS e pela nNOS no PVN também podem alterar de forma distinta parâmetros cardiovasculares em situações fisiológicas (YAMAGUCHI et al., 2009; 2010) como em situações fisiopatológicas (ROSSI et al., 2010; SHARMA et al., 2011)

Em nosso estudo pudemos observar que o bloqueio da via indutiva do óxido nítrico durante o HDT não resultou em nenhuma alteração cardiovascular diferente do controle, enquanto que o bloqueio da via neuronal do óxido nítrico exacerbou o aumento na pressão arterial média e na frequência cardíaca desses animais submetidos à mudança postural. Além disso, foi observado um aumento da atividade simpática determinada pela análise espectral tanto da pressão arterial

quanto da frequência cardíaca e uma diminuição consistente do tônus parassimpático na frequência cardíaca.

Em um trabalho no qual foi utilizado um antisense para nNOS no PVN em ratos sham e com insuficiência cardíaca, foi evidenciado que em ambos ocorreu um aumento da pressão arterial por mais de 7 horas e também da frequência cardíaca, via ativação do sistema nervoso simpático. (WANG et al., 2005). Entretanto, a nNOS também pode exercer um efeito oposto em situações fisiopatológicas como na hipertensão, onde a interferência crônica da nNOS na geração de NO dentro do PVN potencializa o aumento da pressão arterial (ROSSI et al., 2010). Dessa maneira, uma regulação para baixo (down regulation) na expressão da nNOS no PVN parece desencadear um efeito de simpatoexcitação e uma regulação para cima (up regulation) parece exercer o efeito oposto, ou simpatoinibição. Esses dados encontrados, juntamente com os nossos resultados mostram uma importante participação tônica da via neuronal do óxido nítrico, assim como uma participação fásica na regulação cardiovascular pelo PVN, contribuindo para o controle cardiovascular e autonômico tanto em situações fisiológicas como patológicas.

Quando analisamos a sensibilidade do barorreflexo espontâneo, observamos que ocorre uma diminuição da efetividade do barorreflexo nos animais controle sem apresentarem nenhuma alteração quando ocorre a inibição das vias tanto neuronal quanto indutiva do óxido nítrico, assim como nenhuma alteração na sensibilidade do barorreflexo. Esses resultados sugerem que a mudança postural anti ortostática promove uma menor eficiência do barorreflexo, promovendo assim os ajustes

cardiovasculares necessários para a mudança postural, e que a participação das vias do óxido nítrico não parece estar envolvida nesse controle.

Em resumo, nossos dados mostraram que a inibição da via neuronal do óxido nítrico no PVN durante o HDT promove modificações cardiovasculares e autonômicas, enquanto que a inibição da via indutiva do NO não promoveu nenhuma alteração. Os resultados sugerem uma importante participação do NO da via neuronal no controle cardiovascular durante o HDT, e que sua participação parece envolver mecanismos específicos.

7. CONCLUSÃO GERAL

Nossos resultados nos permitem concluir que a via indutiva de produção do óxido nítrico no núcleo paraventricular do hipotálamo durante uma mudança postural em curto espaço de tempo (HUT) participa das alterações na pressão arterial e da frequência cardíaca. De forma contrária, durante a mudança postural anti ortostática (HDT), a via neuronal de produção do óxido nítrico no PVN possui uma participação mais relevante sobre as compensações cardiovasculares. Além disso, pudemos evidenciar funcionalmente que o NO no PVN durante a retomada da postura ortostática após um período crônico de exposição à microgravidade possui um aumentado tônus cardiovascular e de atividade simpática renal. Dessa forma, os estudos aqui apresentados são evidências do envolvimento deste mediador na região do PVN em alterações posturais agudas e crônicas e mostram que o mesmo pode modular o aumento na pressão arterial média e na atividade simpática nervosa renal. Assim, possíveis terapias farmacológicas visando o NO no PVN podem ser uma ferramenta para auxiliar nos processos fisiopatológicos relacionados ao ortostatismo.

REFERÊNCIAS

ALLEN AM. Inhibition of the hypothalamic paraventricular nucleus in spontaneously hypertensive rats dramatically reduces sympathetic vasomotor tone. **Hypertension**. 39: 275-280, 2002.

AMENDT K, CZCHURSKI J, DEMBOWSKY K, SELLER H. Bulspinal projections to the intermediolateral cell column: a neuroanatomical study. **Journal of Autonomic Nervous System**. 1:103-117, 1979.

BAINS JS, FERGUSON AV. Nitric oxide regulates NMDA-driven GABAergic inputs to type I neurones of the rat paraventricular nucleus. **The Journal of Physiology (Lond)**. 499: 733-746, 1997.

BAINS JS, FERGUSON AV. Reduced NMDA receptor sensitivity may underlie the resistance of subpopulations of PVN neurons to excitotoxicity. **Neuroreport**. 8: 2101-2105, 1997b.

BADOER E; MCKINLEY MJ, OLDFIELD BJ, MCALLEN RM. A comparison of hypotensive and non-hypotensive hemorrhage on Fos expression in spinally projecting neurons of the paraventricular nucleus and rostral ventrolateral medulla. **Brain Research**. 610(2):216-23, 1993.

BADOER E. Hypothalamic paraventricular nucleus and cardiovascular regulation. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, 28(1-2): 95-99, 2001.

BADOER E. Cardiovascular role of parvocellular neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. **News Physiol Sci** 11, 43-47, 2002.

BAHJAOU-BOUHADDI M.; CAPPELLE S.; HENRIET M-T.; GUMOULIN G.; WOLF J-P.; REGNARD J. Graded vascular autonomic control versus discontinuous cardiac control during gradual upright tilt. **Journal of Autonomic Nervous System**.79:149-155, 2000.

BEDETTE. D., SANTOS R.A.S., FONTES, M.A. Cardiovascular reactivity after blockade of angiotensin AT(1) receptors in the experimental model of tilting test in conscious rats. **Br. J. Pharmacol**. 153, 966-971, 2008.

BIANCARDI VC; SON SJ; SONNER PM; ZHENG H; PATEL KP; STERN JE. Contribution of central nervous system endothelial nitric oxide synthase to neurohumoral activation in heart failure rats. **Hypertension**. 58, 454-463, 2011.

BLAIR ML, PIEKUT D, WANT A, OLSCHOWKA JA. Role of the hypothalamic paraventricular nucleus in cardiovascular regulation. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**. 23: 161-165, 1996.

BREDT DS, HWANG PM, SNYDER SH. Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. **Nature** 347, 768–770, 1990.

BUCKEY JC, LANE LD, LEVINE BD. Orthostatic intolerance after spaceflight. **J Appl Physiol** 81: 7–18, 1996.

BUSNARDO, C., TAVARES, R.F., RESSTEL, L.B., ELIAS, L.L., CORREA, F.M. Paraventricular nucleus modulates autonomic and neuroendocrine responses to acute restraint in rats. **Auton. Neurosci.** 158, 51-57, 2010a.

BUSNARDO, C., CRESTANI, C.C., TAVARES, R.F., RESSTEL, L.B., CORREA, F.M. Cardiovascular responses to L-glutamate microinjection into the hypothalamic paraventricular nucleus are mediated by a local nitric oxide-guanylate cyclase mechanism. **Brain Res.** 1344, 87-95, 2010b.

BUTLER, GC; XING HC; HUGHSON RL. Cardiovascular response to 4 hours of 6 degrees head down tilt or of 30 degrees head-up tilt bed rest. **Aviat Space Environ Med** 61,240-246, 1990.

CHAN, SHH, WANG, LL, WANG, SH, CHAN, JYH. Differential cardiovascular responses to blockade of nNOS or iNOS in rostral ventrolateral medulla of the rat. **Br. J. Pharmacol.** 133, 606–614, 2001.

CHEN QH, TONEY GM. Responses to GABA-A receptor blockade in the hypothalamic PVN are attenuated by local AT1 receptor antagonism. **American Journal of Physiology – Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**. 285: R1231-R1239, 2003.

CHOBANIAN AV, LILLE RD, TERCYAK A, BLEVINS P. The metabolic and hemodynamic effects of prolonged bed rest in normal subjects. **Circulation** 49: 551–559, 1974.

COOTE J.H. Cardiovascular function of the paraventricular nucleus of the hypothalamus. **Biological Signals**. 4:142, 1995.

COOTE JH. A role for the paraventricular nucleus of the hypothalamus in the autonomic control of heart and kidney. **Exp Physiol** 90.2, 169–173. 2004.

CONVERTINO VA, DOERR DF, ECKBERG DL, FRITSCH JM, AND VERNIKOS-DANELIS J. Head-down bed rest impairs vagal baroreflexes responses and provokes orthostatic hypotension. **J Appl Physiol** 68: 1458–1464, 1990.

CUNNINGHAM ET, SAWCHENKO PE. Anatomical specificity of noradrenergic inputs to the paraventricular and supraoptic nuclei of the rat hypothalamus. **The Journal of Comparative Neurology**. 274: 60-76, 1988.

CUNNINGHAM ET, BOHN JR MC, SAWCHENKO PE. Organization of adrenergic inputs to the paraventricular and supraoptic nuclei of the rat. **The Journal of Comparative Neurology**. 292: 651-667, 1990.

DAMPNEY, R. A. L.; Functional Organization of Central Pathway Regulating the Cardiovascular System. **Physiological Reviews**. 1994.

DAMPNEY RAL, HORIUCHI J, TAGAWA T, FONTES MAP, POTTS PD, POLSON JW. Medullary and supramedullary mechanisms regulating sympathetic vasomotor tone. **Acta Physiologica Scandinavica**. 177: 209-218, 2003.

DE ABREU SB, LENHARD A, MEHANNA A, DE SOUZA HC, CORREA FM, HASSER EM, MARTINS-PINGE MC. Role of paraventricular nucleus in exercise training-induced autonomic modulation in conscious rats. **Autonomic Neuroscience**. 148(1-2):28-35,2009.

DE ANDRADE, O., AMARANTE, M.K., VERONEZ, N.C., CORRÊA, F.M.A., FONTES, M.A.P., MARTINS-PINGE, M.C. Involvement of the paraventricular nucleus (PVN) of hypothalamus in the cardiovascular alterations to head up tilt in conscious rats. **Neurosci. Res**. 73, 270-274, 2012.

DE ANDRADE, O., BORGHI, S.M., DE SOUZA, H.C., FONTES, M.A., MARTINS-PINGE, M.C. Paraventricular Nucleus of Hypothalamus participates in the sympathetic modulation and spontaneous fluctuation of baroreflex during head up tilt in unanesthetized rats. **Neurosc. Letters** 558, 1-7, 2014.

DICARLO SE, ZHENG H, COLLINS HL, RODENBAUGH DW, PATEL KP. Daily exercise normalizes the number of diaphorase (NOS) positive neurons in the hypothalamus of hypertensive rats. **Brain Res** 955, 153–160, 2002.

DIMICCO JA, SAMUELS BC, ZARETSKAIA MV, ZARETSKY D. The dorsomedial hypothalamus and the response to stress Part renaissance, part rerolution. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**. 71: 469-480, 2002.

FLORAS, J.S. Sympathetic nervous system activation in human heart failure. **J. Am. Coll. Cardiol**. 54, 375–385, 2009.

FOLEY CM, MUELLER PJ, HASSER EM, HEESCH CM. Hindlimb unloading and female gender attenuate baroreflex mediated sympathoexcitation. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol** 289, R1440–R1447, 2005.

FONTES, M.A.P., XAVIER, C.H., DE MENEZES, R.C.A., DIMICCO, J.A. The dorsomedial hypothalamus and the central pathways involved in the cardiovascular response to emotional stress. **Neuroscience** 184, 64–74, 2011.

FORTNEY SM, SCHNEIDER VS, and GREENLEAF JE. The physiology of bed rest. In: Environmental Physiology, edited by Fregly MJ and Blatteis CM. **New York: Oxford University Press** p. 889–939, 1996.

FRITSCH-YELLE JM, CHARLES JB, JONES MM. Spaceflight alters autonomic regulation of arterial pressure in humans. **J Appl Physiol** 77(4): 1776–1783, 1994.

GALANIS DS, NAKA KK, VEZIRAKI P, SIMOS YV, KALFAKAKOU V, EVANGELOU AM. Cardiovascular and Pulmonary Adaptations During Short Term 15° and 30° Head-Down Posture in Healthy Male Volunteers. **Hellenic Journal of Cardiology**. 54: 273-280, 2013.

GHARIB C, GAUQUELIN G, PEQUIGNOT JM, GEELEN G, BIZOLLON CA, GUELL A. Early hormonal effects of head-down tilt (-10 degrees) in humans. **Aviat Space Environ Med**. 59(7):624-9, 1988.

GUERTZENSTEIN PG, SILVER A. Fall in blood pressure from discrete regions of ventral surface of the medulla by glycine and lesions. **Journal of Physiology**. 489-503, 1974.

GUGGILAM, A., PATEL, K.P., HAQUE, M., EBENEZER, P.J., KAPUSTA, D.R., FRANCIS, J. Cytokine blockade attenuates sympathoexcitation in heart failure: cross-talk between nNOS, AT-1R and cytokines in the hypothalamic paraventricular nucleus. **Eur. J. Heart Fail**. 10, 625-34, 2008.

GUYENET, P.G. The sympathetic control of blood pressure. **Nat. Rev. Neurosci**. 7, 335-46, 2006.

HASHIGUCHI, H., YE, S.H., ROSS-CISNEROS, F., ALEXANDER, N. Central nitric oxide donors attenuate cardiovascular and central norepinephrine responses to stress. **Am. J. Physiol**. 272, R1447–R1453, 1997.

HASSER EM, MOFFITT JA. Regulation of sympathetic nervous system function after cardiovascular deconditioning. **Ann NY Acad Sci** 940: 454–468, 2001.

HIROOKA, Y., POLSON, J.W., DAMPNEY, R.A. Pressor and sympathoexcitatory effects of nitric oxide in the rostral ventrolateral medulla. **J. Hypertens**. 14, 1317-1324, 1996.

HORN, T., SMITH, P.M., MCLAUGHLIN, B.E., BAUCE, L., MARKS, G.S., PITTMAN, Q.J., FERGUSON, A.V. Nitric oxide actions in paraventricular nucleus:

cardiovascular and neurochemical implications. **Am. J. Physiol.** 266, 306–313, 1994.

HUGHSON RL, MAILLET A, GAUQUELIN G, ARBEILLE P, YAMAMOTO Y, GHARIB C. Investigation of hormonal effects during 10-h head-down tilt on heart rate and blood pressure variability. **J Appl Physiol.** 78(2):583-96, 1995.

JANSEN ASP; NGUYEN XV; KARPITSKIY V; METTENLEITER TC; LOEWY AD. Central command neurons of the sympathetic nervous system: basis of the fight-or-flight response. **Science.** 270: 644-646, 1995.

KALPANA M, MALINI D, ANSARI S, JALEELI KA. Cardiovascular autonomic responses to passive head down tilt in males. **Indian Journal of Fundamental and Applied Life Sciences.** 3 (1) 95-98, 2013.

KANNAN H, NIIJIMA A, YAMASHITA H. Effects of stimulation of the hypothalamic paraventricular nucleus on blood pressure and renal sympathetic nerve activity. **Brain Research Bulletin.** 20(6): 779-783, 1988.

KENNEY MJ, WEISS ML, HAYWOOD JR. The paraventricular nucleus: an important component of the central neurocircuitry regulating sympathetic nerve outflow. **Acta Physiologica Scandinavica.** 177: 7-15, 2003.

KOSKA J, KSINANTOVÁ L, KVETNANSKÝ R, MARKO M, HAMAR D, VIGAS M, HATALA R. Effect of head-down bed rest on the neuroendocrine response to orthostatic stress in physically fit men. **Physiol Res.** 52(3):333-339, 2003.

KRUKOFF TL, KHALILI P. Stress-induced activation of nitric oxide-producing neurons in the rat brain. **J Comp Neurol.** 27;377(4):509-19, 1997.

KRUKOFF TL. Central actions of nitric oxide in regulation of autonomic functions. **Brain Res Rev** 30: 52–65, 1999.

LI Z, FERGUSON AV. Electrophysiological properties of paraventricular magnocellular neurons in the rat brain slices: modulation of IA by angiotensin II. **Neuroscience.** 71: 133-145, 1996.

LI YF; MAYHAN WG; PATEL KP. NMDA-mediated increase in renal sympathetic nerve discharge within the PVN: role of nitric oxide. **The American Journal of Physiology - Heart and Circulation Physiology.** 281: 2328-2336, 2001.

LI YF, ROY SK, CHANNON KM, ZUCKER IH, PATEL KP. Effect of in vivo gene transfer of nNOS in the PVN on renal nerve discharge in rats. **Am J Physiol: Heart Circ Physiol** 282, H594–H601, 2002.

LI YF, PATEL KP. Paraventricular nucleus of the hypothalamus and elevated sympathetic activity in heart failure: the altered inhibitory mechanisms. **Acta Physiologica Scandinavica**. 177: 17-26, 2003.

LI YF, MAYHAN WG, PATEL KP. Role of the paraventricular nucleus in renal excretory responses to acute volume expansion: role of nitric oxide. **Am J Physiol Heart Circ Physiol** 285(4):H1738-46, 2003.

MAGGI CA, MELI A. Suitability of urethane anesthesia for physiopharmacological investigations. Part 3: Other systems and conclusions. **Experientia**. 42(5):531-537, 1986.

MARTEL E, CHAMPEROUX P, LACOLLEY P. Central hypervolemia in the conscious rat: a model of cardiovascular deconditioning. **J Appl Physiol** 80: 1390-1396, 1996.

MARTIN DS, SEGURA T, HAYWOOD JR. Cardiovascular responses to bicuculline in the rat paraventricular nucleus. **Hypertension**. 18: 48-55, 1991.

MARTIN DS, HAYWOOD JR. Sympathetic nervous system activation by glutamate injections into the paraventricular nucleus. **Brain Research**. 577: 261-267, 1992.

MARTINS-PINGE MC, BARALDI-PASSY I, LOPES OU. Excitatory effects of nitric oxide within the rostral ventrolateral medulla of freely moving rats. **Hypertension** 30(3 Pt 2):704-7. 1997.

MARTINS-PINGE MC, BECKER LK, GARCIA MR, ZOCCAL DB, NETO RV, BASSO LS, DE SOUZA HC, LOPES OU. Attenuated pressor responses to amino acids in the rostral ventrolateral medulla after swimming training in conscious rats. **Autonomic Neuroscience**. 122(1-2):21-8, 2005.

MARTINS-PINGE MC, GARCIA MR, ZOCCAL DB, CRESTANI CC, PINGE-FILHO P. Differential influence of iNOS and nNOS inhibitors on rostral ventrolateral medullary mediated cardiovascular control in conscious rats. **Autonomic Neuroscience**. 131(1-2):65-69, 2007.

MARTINS-PINGE, M.C., MUELLER, P.J., FOLEY, C.M., HEESCH, C.M., HASSER, E.M. Regulation of arterial pressure by the paraventricular nucleus in conscious rats: interactions among glutamate, GABA, and nitric oxide. **Front. Physiol.** 3, 490, 2013.

MARTEL E, CHAMPEROUX P, LACOLLEY P. Central hypervolemia in the conscious rat: a model of cardiovascular deconditioning. **J Appl Physiol** 80: 1390-1396, 1996.

MASTELARI, R.B., DE SOUZA, H.C., LENHARD, A., DE AGUIAR CORRÊA, F.M., MARTINS-PINGE, M.C. Nitric oxide inhibition in paraventricular nucleus on

cardiovascular and autonomic modulation after exercise training in unanesthetized rats, **Brain Res.** 23, 68-76, 2011.

MIYAWAKI T, MINSON J, ARNOLDA L, CHALMERS J. Role of excitatory amino acid receptors in cardiorespiratory coupling in ventrolateral medulla. **American Journal of Physiology – Regulatory, Integrative and Comparative Physiology.** 271: R1221-R1230, 1996.

MOFFITT JA, SCHADT JC, AND HASSER EM. Altered central nervous system processing of baroreceptor input following hindlimb unloading in rats. **Am J Physiol Heart Circ Physiol** 276: H2272–H2279, 1999.

MOREY-HOLTON ER, GLOBUS RK. Hindlimb unloading rodent model: technical aspects. **J Appl Physiol** 92: 1367–1377, 2002.

MORIMOTO, S., SASAKI, S., MIKI, S., KAWA, T., NAKAMURA, K., ITOH, H., NAKATA, T., TAKEDA, K., NAKAGAWA, M., FUSHIKI, S. Nitric oxide is an excitatory modulator in the rostral ventrolateral medulla in rats. **Am. J. Hyperten.** 13, 1125-1134, 2000.

MUELLER PJ, CUNNINGHAM JT, PATEL KP, HASSER EM. Proposed role of the paraventricular nucleus in cardiovascular deconditioning. **Acta Physiologica Scandinavica.** 177(1):27-35, 2003.

MUELLER, P.J., FOLEY, C.M., HASSER, E.M. Hindlimb unloading alters nitric oxide and autonomic control of resting pressure in conscious rats. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.** 289, R140-R147, 2005.

MUELLER PJ, SULLIVAN MJ, GRINDSTAFF RR, CUNNINGHAM JT, HASSER EM. Regulation of plasma vasopressin and rennin activity in conscious hindlimb-unloaded rats. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol** 291, R46–R52, 2006.

MUELLER, P.J., MISCHEL, N.A., SCISLO, T.J. Differential activation of adrenal, renal, and lumbar sympathetic nerves following stimulation of the rostral ventrolateral medulla of the rat. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.** 300, R1230–R1240, 2011.

OVERTON JM, WOODMAN CR, TIPTON CM. Effect of hindlimb suspension on VO₂ max and regional blood flow responses to exercise. **J Appl Physiol** 66(2): 653–659, 1989.

OVERTON, JM, TIPTON CM. Effect of hindlimb suspension on cardiovascular responses to sympathomimetics and lower body negative pressure. **J App Physiol** 68: 355–362, 1990.

PARKER-JONES P. CHRISTOU DD; JORDAN J; SEALS DR. Baroreflex buffering is reduced with age in healthy men. **Circulation.**107:1770-1774, 2003.

PATEL KP, ZHANG K. Neurohumoral activation in heart failure: role of paraventricular nucleus. **Clin Exp Pharmacol Physiol** 23, 722–726, 1996.

PATEL, K.P., LI, Y-F., HIROOKA, Y. Role of nitric oxide in central sympathetic outflow. **Exp. Biol. Med.** 226, 814–824, 2001.

PAWELCZYK JA, ZUCKERMAN JH, BLOMQUIST CG, AND LEVINE BD. Regulation of muscle sympathetic nerve activity after bed rest deconditioning. **Am J Physiol Heart Circ Physiol** 280: H2230–H2239, 2001.

PAXINOS G.; WATSON C. **The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates**. 4a ed. Academic Press. New York, 1998.

PFISTER J; SPENGLER C; GROUZMANN E; RAIZADA MK; FELIX, D; IMBODEN H. Intracellular staining of angiotensin receptors in the PVN and SON of the rat. **Brain Research**. 754: 307-310, 1997.

PYNER S, COOTE JH. Identification of branching paraventricular neurons of the hypothalamus that project to the rostroventrolateral medulla and spinal cord. **Neuroscience** 100, 549–556, 2000.

RAFFAI G, MÉSZÁROS M, KOLLAI M, MONOS E, DÉZSI L. Experimental orthostasis elicits sustained hypertension, which can be prevented by sympathetic blockade in the rat. **Journal Cardiovascular Pharmacology**. 45(4):354-61, 2005.

RAFFAI G, KOCSIS L, MÉSZÁROS M, MONOS E, DÉZSI L. Inverse-orthostasis may induce elevation of blood pressure due to sympathetic activation. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**. 47(2):287-94, 2006.

ROSS CA, RUGGIERO DA, JOH TH, PARK DH, REIS DJ. Rostral ventrolateral medulla: selective projections to the thoracic autonomic cell column from the region containing C1 adrenaline neurons. **The Journal of Comparative Neurology**. 288: 168-185, 1984.

ROSSI NF, MALISZEWSKA-SCISLO M, CHEN H, BLACK SM, SHARMA S, RAVIKOV R, AUGUSTYNIK RA. Neuronal nitric oxide synthase within paraventricular nucleus: blood pressure and baroreflex in two-kidney, one-clip hypertensive rats. **Exp Physiol**. 95(8):845-57, 2010.

ROWELL, L.B. Human cardiovascular control. **New York**: Oxford Univ. Press, 1993.

SHAFTON AD, RYAN A, BADOER E. Neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus send collaterals to the spinal cord and to the rostral ventrolateral medulla in the rat. **Brain Res** 801, 239–243, 1998.

SHARMA NM, ZHENG H, MEHTA PP, LI YF, PATEL KP. Decreased nNOS in the PVN leads to increased sympathoexcitation in chronic heart failure: role for CAPON and Ang II. **Cardiovasc Res.** 92(2):348-57, 2011.

SHELLOCK FG, SWAN HJC, RUBIN SA. Early central venous pressure changes in the rat during two different levels of head-down suspension. **Aviat Space Environ Med** 56: 791–795, 1985.

STERN, J.E., LI, Y., ZHANG, W. Nitric oxide: a local signaling molecule controlling the activity of pre-autonomic neurones in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. **Acta Physiol Scand.** 177, 37–42, 2003.

STOTZ-POTTER, E.H., WILLIS, L.R., DIMICCO, J.A. Muscimol Acts in Dorsomedial but Not Paraventricular Hypothalamic Nucleus to Suppress Cardiovascular Effects of Stress. **The Journal of Neuroscience** 16, 1173–1179, 1996.

STRACK AM, SAWYER WB, PLATT KB, LOEWY AD. CNS cell groups regulating the sympathetic outflow to adrenal gland as revealed by transneuronal cell body labeling with pseudorabies virus. **Brain Research.** 491(2):274-96, 1989.

SWANSON LW, MCKELLAR S. The distribution of oxytocin- and neurophysin-stained fibers in the spinal cord of the rat and monkey. **The Journal of Comparative Neurology.** 188: 87-106, 1979.

SWANSON, L.W; SAWCHENKO, P. E. Paraventricular nucleus: a site for the integration of neuroendocrine and autonomic mechanisms. **Neuroendocrinology** 31: 410-417, 1980.

SWANSON LW, SAWCHENKO PE. Hypothalamic integration: organization of the paraventricular and supraoptic nuclei. **Annual Review of Neuroscience.** 6: 269-324, 1983.

TABRIZIAN, K., NAJAFI, S., BELARAN, M., HOSSEINI-SHARIFABAD, A., AZAMI, K., HOSSEINI, A., SOODI, A., KAZEMI, A., KEBRIAEEZADEH, A., SHARIFZADEH, M. Effects of Selective iNOS Inhibitor on Spatial Memory in Recovered and Non-recovered Ketamine Induced-anesthesia in Wistar Rats. **Iranian Journal of Pharmacology Research** 9, 313-320, 2010.

TAYLOR RB & WEAVER LC. Spinal stimulation to locate preganglionic neurons controlling the kidney, spleen or intestine. **American Journal of Physiology – Heart and Circulatory Physiology.** 263: H1026-H1033, 1992.

Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology. Heart rate variability: standards of measurement, physiological interpretation, and clinical use. **Circulation** 93, 1043-1065, 1996.

TATEBAYASHI K, ASAI Y, MAEDA T, SHIRAISHI Y, MIYOSHI M, KAWAI Y. Effects of head-down tilt on the intracranial pressure in conscious rabbits. **Brain Res.** 977(1):55-61, 2003.

TEZINI, CG., DIAS, DP., SOUZA, HC. Aerobic physical training has little effect on cardiovascular autonomic control in aging rats subjected to early menopause. **Experimental Gerontology.** v. 48, p. 147-153, 2013.

VAZIRI, N.D., DING, Y., SANGHA, D.S., PURDY, R.E. Upregulation of NOS by simulated microgravity, potential cause of orthostatic intolerance. **J. Appl. Physiol.** 89, 338–344, 2000.

VERHEYDEN, B. Cardiovascular control in space and on earth: the challenge of gravity. **Acta Biomedica Lovaniensia**, Leuven University Press 397,166 f. 2007.

VINCENT SR, KIMURA H. Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain. **Neuroscience** 46, 755–784, 1992.

WANG Y, LIU XF, CORNISH KG, ZUCKER IH, PATEL KP. Effects of nNOS antisense in the paraventricular nucleus on blood pressure and heart rate in rats with heart failure. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.** 288(1):H205-13, 2005.

YAMAGUCHI, N., OKADA, S., USUI, D., YOKOTANI, K. Nitric oxide synthase isozymes in spinally projecting PVN neurons are involved in CRF-induced sympathetic activation. **Auton. Neurosci.** 148, 83-89, 2009.

YAMAGUCHI, N., OGAWA, S., OKADA, S. Cyclooxygenase and nitric oxide synthase in the presympathetic neurons in the paraventricular hypothalamic nucleus are involved in restraint stress-induced sympathetic activation in rats. **Neuroscience** 170, 773-781, 2010.

YANG Z, COOTE JH. Influence of the hypothalamic paraventricular nucleus on cardiovascular neurones in the rostral ventrolateral medulla of the rat. **J Physiol** 513, 521–530, 1998.

ZHANG K, PATEL KP. Effect of nitric oxide within paraventricular nucleus on renal sympathetic nerve discharge: role of GABA. **American Journal of Physiology – Regulatory, Integrative and Comparative Physiology.** 275: R728-R734, 1998.

ZHANG ZH, FRANCIS J, WEISS RM, FELDER RB. The renin-angiotensin-aldosterone system excites hypothalamic paraventricular nucleus neurons in heart failure. **American Journal of Physiology – Heart and Circulatory Physiology.** 283: H423-H433, 2002.

YAO, S.T., ANTUNES, V.R., PATON, J.F.R., MURPHY, D. Osmotic regulation of neuronal nitric oxide synthase expression in the rat amygdala: Functional role for

nitric oxide in adaptive responses? **Journal of Neuroscience Research** 85, 410-422, 2007.

ZANZINGER J. Role of nitric oxide in the neural control of cardiovascular function. **Cardiovasc Res** 15;43(3):639-49. 1999.

ZHANG, K., MAYHAN, W.G., PATEL, K.P. Nitric oxide within the paraventricular nucleus mediates changes in renal sympathetic nerve activity. **Am. J. Physiol.** 273, 864–872, 1997.

ZHANG K, PATEL KP. Effect of nitric oxide with the paraventricular nucleus on renal sympathetic nerve discharge: role of GABA. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol** 44 275, R728–R734, 1998.

ZHANG K, LI Y-F, PATEL KP. Blunted nitric oxide mediated inhibition of renal nerve discharge within PVN of rats with heart failure. **Am J Physiol Heart Circ Physiol** 281, H995–H1004, 2001.

ZHANG, K., LI, Y.F., PATEL. K.P. Reduced endogenous GABAmediated inhibition in the PVN on renal nerve discharge in rats with heart failure. **Am. J. Physiol.** 282, R864–R872, 2002.

ZHENG H, LI YF, CORNISH KG, ZUCKER IH, PATEL KP. Exercise training improves endogenous nitric oxide mechanisms within the paraventricular nucleus in rats with heart failure. **Am J Physiol Heart Circ Physiol** 288: H2332-H2341, 2005.

ANEXOS

9.1 Artigo I - Differential source of nitric oxide in the paraventricular nucleus (PVN) contributes to dual effects in cardiovascular and sympathetic modulations during head-up tilt in unanesthetized rats.

9.2 Artigo II - Functional evidence for nitric oxide involvement in the cardiovascular and autonomic modulation by the PVN in conscious hindlimb unloaded rats.

NITRIC OXIDE FROM iNOS AND nNOS IN THE PARAVENTRICULAR NUCLEUS (PVN) DIFFERENTLY AFFECT CARDIOVASCULAR AND AUTONOMIC MODULATION DURING HEAD-UP TILT IN UNANESTHETIZED RATS

Ozahyr de Andrade; Marli Cardoso Martins-Pinge

Department of Physiological Sciences, State University of Londrina, Londrina, PR, Brazil.

Correspondence should be addressed to:

Marli C. Martins-Pinge, PhD
Departamento de Ciências Fisiológicas
Centro de Ciências Biológicas
Universidade Estadual de Londrina
Rodovia Celso Garcia Cid, Km 380
Campus Universitário, CEP 86055-900
Londrina, PR, Brazil.
Fax - 55-43-3371.4407
Phone - 55-43-3371.5927
E-mail - martinspinge@uel.br

Abstract

Evidences have shown that the paraventricular nucleus (PVN) of the hypothalamus is involved in cardiovascular reflex responses related to blood volume, and nitric oxide (NO) is an important modulator of cardiovascular and autonomic function in the PVN. So, we aim to evaluate the cardiovascular and autonomic modulation by NO in PVN during a head-up tilt (HUT) protocol. Adult male Wistar rats, instrumented with guide cannulas to the PVN and femoral artery and vein catheters were submitted to mean arterial pressure (MAP) and heart rate (HR) recordings in conscious state. After baseline parameters the rats were pretreated with iNOS and nNOS inhibitors and submitted to HUT. We performed bilateral PVN microinjection of saline or Nw-Propyl-L-arginine or 1400W prior to the head-up tilt, respectively. The iNOS inhibition promotes attenuation in the variation of MAP and HR during HUT, but nNOS did not. Previous microinjection of 1400w in the PVN promoted decreases in total variance ($166,42 \pm 7,4$ to $124,16 \pm 2,7 \text{ms}^2$) and increase in high-frequency oscillations (HF; $47 \pm 3,2$ to $69,5 \pm 6,4 \text{nu}$) of pulse interval (PI). Bilateral microinjection of Nw-Propyl-L-Arginine did not change the sympathetic increases during postural challenge, but increased high frequency oscillations of PI in absolute units (HF; $4,6 \pm 0,8$ to $18,4 \pm 3,3$) and normalized units (HF; $47 \pm 3,2$ to $66,4 \pm 3,2 \text{nu}$) during HUT. The spectral analysis of systolic arterial pressure did not present differences between groups. Our data suggest that sympathetic drive to cardiovascular and autonomic adjustments due to HUT are modulated by NO differentially from iNOS and nNOS source in the PVN.

Keywords: Arterial pressure; Blood Volume; Heart Rate Variability; NO-synthase; Orthostatic Stress; Sympathetic activity.

Abbreviations: Paraventricular nucleus of the hypothalamus (PVN), head-up tilt (HUT), mean arterial pressure (MAP), heart rate (HR), heart rate variability (HRV), systolic arterial pressure (SAP), pulse interval (PI), low-frequency (LF), high-frequency (HF), normalized units (nu)

1. Introduction

The response to rapid changes in arterial pressure and central blood volume is achieved through baroreflex, quimioflex and cardiopulmonary reflex and converge in the central nervous system (CNS) (Dampney, 1994). Cardiovascular adjustments moment-to-moment during physiological and environmental challenges are required, and the central neural circuits related to the information processing are classically understood. It is well known the medullary brain areas involved with arterial pressure control as the nucleus of the solitary tract (NTS), dorsal motor nucleus of the vagus nerve (DMNV), caudal ventrolateral medulla (CVLM) and rostral ventrolateral medulla (RVLM) (Dampney, 1994 and Guyenet, 2006). Another brain area such as the Hypothalamus has been suggested as another important component in cardiovascular modulation (McDowall et al., 2006), where the paraventricular nucleus of the hypothalamus (PVN) seems to play a fundamental role (Coote, 2005; Martins-Pinge, 2013 and Pyner, 2009).

The PVN is an important brain nucleus considered a neuroendocrine, behavioral and autonomic integrative center (Badoer, 2001; Sawchenko and Swanson, 1983), and a cardiac arm of the volume reflex (Badoer, 2001; Coote, 1995 and Guyenet, 2006). The activity of autonomic neurons in PVN seems to be regulated by variation of blood volume and plasma osmolality (Badoer, 2001). A previous study from our laboratory showed the involvement of the PVN in cardiovascular alterations during an orthostatic challenge, using a head-up tilt model (HUT) in rats (De Andrade et al., 2012). We also demonstrate that during HUT the PVN is activated, increasing sympathetic modulation of blood pressure and heart rate (De Andrade et al., 2014).

Several studies of literature have highlighted the role of nitric oxide in the paraventricular nucleus of the hypothalamus and its relation in the cardiovascular system, in vivo and in vitro studies (Bains and Ferguson, 1994; Horn et al., 1994; Martins-Pinge et al., 2013 and Stern et al., 2003), as well as, its involvement in the control of sympathetic outflow (Zhang et al., 1997; Zhang and Patel, 1998). Evidences have suggested that nitric oxide is an inhibitory neurotransmitter in the PVN (Bains and Ferguson, 1997), and nitrergic signaling alterations in this nucleus may contribute in pathological states as cardiovascular deconditioning (Mueller et al., 2003). In addition, orthostatic intolerance is suggested to be influenced by endothelial nitric oxide synthase alterations, even as, exposure to microgravity or bed rest leading to NO reductions in systemic arteries and increased levels in brain regions (Mueller et al., 2005 and Vaziri et al., 2000), therefore contributing to altered adjustments when resumption orthostatic position.

The spectral analysis is a non-invasive rising methodological approach to investigate autonomic modulation in physiological or pathophysiological conditions. Our analysis was based on more comprehensive characterizations where the low-frequency band (LF) reflects combined influences of both sympathetic and parasympathetic tone, and high-frequency (HF) band is mainly dependent on the parasympathetic tone component (Rubini et al., 1993 and Task Force, 1996).

The purpose of the present study was to evaluate the role of the NO pathways in cardiovascular adjustments by PVN during head-up tilt (HUT) in conscious rats, a methodology already used by our laboratory (De Andrade et al., 2012, 2014) for inducing orthostatic stress. We hypothesized that upright posture requires a sympathetic autonomic

modulation influenced by NO in the PVN. To test this hypothesis, we examined mean arterial pressure (MAP), heart rate (HR) responses, to both inducible or neuronal nitric oxide synthase inhibition. Spectral analysis of systolic arterial pressure and heart rate variability were evaluated at baseline and during HUT conditions.

2. Results

2.1. Histological confirmation

All animals presented in this study had confirmation of the bilateral paraventricular nucleus (PVN) microinjection sites with 100 nl of dye Evans Blue microinjected at the conclusion of the experiments (Fig. 1).

2.2. Cardiovascular and spectral parameters during HUT

In the table 1 are the baseline values of MAP and HR of each group. In the vehicle group, the cardiovascular effects observed during HUT are characterized by an increase in MAP and HR during postural change and it was statistically significant ($p < 0.05$). And during HUT we observed an increase in LF band and a decrease in HF band of PI, and also, an increase in LF component of SAP ($p < 0.05$). Those effects are presented in the figures 3 and 4.

2.3. Treatment with nNOS inhibitor

There was no significant difference observed between saline compared with Nw-Propyl-L-Arginine in the PVN on changes in MAP and HR (Fig. 2). The HUT did not induce any difference in SAP parameters between groups, and spectral analysis during HUT after nNOS inhibition we observed in the PI an increase in the LF oscillation in absolute units ($p < 0.05$), and an increase in HF band in absolute units ($p < 0.05$) and in normalized units ($p < 0.05$) when compared to saline group. (Figs 3 and 4).

2.4. Treatment with iNOS inhibitor

After iNOS inhibition with 1400W microinjected inside the PVN during HUT we observed attenuation on changes in MAP and HR compared to saline group. The components of PI showed during HUT a decrease in total variance ($p < 0.05$), a decrease in LF in absolute units ($p < 0.05$) and in normalized units ($p < 0.05$), and an increase in HF oscillations ($p < 0.05$) only in normalized units when compared to control group. The HUT did not induce any difference in SAP parameters between groups (Figs. 5 and 6).

2.5. Baroreflex gain

The analysis of spontaneous baroreflex showed that in the saline treated group we did not observe differences between baseline and tilt, in baroreflex effectivity as in baroreflex gain. The treatment with Nw-propyl and 1400W increased baroreflex effectivity but not baroreflex gain during baseline. However, during tilt, only the 1400W group was altered when compared with baseline. (Fig. 5).

3. Discussion

The data of the present study show that nNOS inhibition did not produce any difference in cardiovascular parameters compared with saline group during head-up tilt, while iNOS inhibition produces a significant attenuation in MAP and HR during postural challenge, in unanesthetized rats. Therefore, suggesting an involvement for PVN iNOS pathway in the phasic modulation of the autonomic activity to cardiovascular system. The cardiovascular effect of the PVN in arterial pressure during orthostatism was shown by our laboratory (De Andrade et al., 2012), in which cobalt chloride, a synaptic blocker was microinjected into the PVN and affected MAP during HUT. However, the neurotransmitters related to these compensations remains unclear.

Accordingly, studies by Pyner (2009), the PVN has different neurochemical substrates to produce an appropriate differential sympathetic output and the inhibitory input originate from PVN is dependent upon nitric oxide, with in turn, potentiates GABAergic synaptic inputs in the PVN. And the literature suggests a concept that NO produced from nNOS has inhibitory effects in the PVN (Martins-Pinge et al., 2013; Patel et al., 2001 and Stern et al., 2003). And several investigators have shown the inhibitory role of NO in MAP and renal sympathetic nerve activity (Hashiguchi et al., 1997; Li et al., 2001 and Zhang et al., 1997). However, recent evidences have suggested an excitatory effect mediated by a local NO-guanylate cyclase system in the PVN (Busnardo et al., 2010). Also, excitatory and inhibitory effects of NO have been demonstrated in other cardiovascular areas (Hirooka et al, 1996; Martins-Pinge et al., 1997 and Patel et al., 2001). Those divergences have been discussed to be due to differences in concentrations of the drugs used, species utilized or conscious state

of the animal (Morimoto et al., 2000), or due to different NOS pathway activated (Martins-Pinge et al., 2007). The PVN activation during HUT could result in differential control of sympathetic outflow, as evidenced in RVLM who is capable of producing varying patterns of sympathetic activation in rats (Mueller et al., 2011).

Localizations of neuronal populations that possess neuronal nitric oxide synthase (nNOS) were achieved by histochemical staining using NADPH-diaforase and immunohistochemistry (Bredt et al. 1990 and Dawson et al., 1991). Moreover, an increased nNOS by an adovirus in the PVN generated a high level of NOS and that expressed nNOS is functional in inhibiting renal sympathetic nerve activity by the PVN (Li et al., 2002). The data of the present study indicate that the sympathoexcitatory effect imposed by upright posture adoption is not affected by nNOS pathway inhibition, once the cardiovascular and autonomic parameter were not different from the control group.

Although the literature suggested iNOS levels inside the central nervous system are low and iNOS may be induced inside astrocytes or microglial cells following events such as inflammation, viral infection or trauma (Bredt et al., 1990 and Calabrese et al., 2006). Our study has evidenced, bilateral microinjections of iNOS inhibitor into the PVN producing a significant decreased in the MAP and HR, suggesting an iNOS involvement in cardiovascular compensations during head-up tilt as well sympathetic drive diminished as represented by Variance, LF absolute and normalized units and ratio LF/HF component of spectral parameters, indicating an autonomic modulation by iNOS pathway. And these results are in accordance with recent findings in the literature that showed the PVN iNOS neurons projecting to the intermediolateral cell column, affecting the sympathetic activity

(Yamaguchi et al., 2009, 2010 and Guggilam et al., 2008). However, during a postural change the arterial pressure presents an increase and the microinjection of iNOS inhibitor did not present any effect when analyze the spectral parameters of systolic pressure. To explain this no effect of iNOS microinjection into the PVN in spectral parameter of arterial pressure, we must consider a previous study suggesting that during orthostatism an increased level in plasma vasopressin occurs minutes later generating a vasoactive hormone response (Geelen et al., 2002).

The spontaneous baroreflex has been used to verify the baroreflex gain and effectivity through simple techniques in which small and spontaneous fluctuations of arterial pressure generate changes in R-R interval (Schwartz et al., 2013). In a recent work from our lab we provided data that demonstrate that PVN can modulate tonically the baroreflex, but under orthostatic challenges its effectivity is not required (De Andrade et al., 2014). In the present study, we provided evidence that NO is also involved in baroreflex gain during tilt, although when one of NOS (nNOS or iNOS) is inhibited we did not observe any detrimental in baroreflex gain. It is possible that one of the sources of NO in the PVN can keep the role in baroreflex.

In conclusion, our findings provide that iNOS inhibition attenuates arterial pressure increases during HUT, but nNOS did not interfere. In addition, spectral analysis demonstrates that iNOS inhibition produces an inhibitory action in the autonomic modulation of heart rate during HUT and nNOS did not produce any effect. We also observed that iNOS in the PVN is involved in the baroreflex gain during tilt producing a decrease in the baroreflex effectiveness index, but any difference was found in baroreflex sensitivity index. Further

studies are necessary to understand this complex system and understand the NO interactions with other neurotransmitters in the PVN in the control of cardiovascular and autonomic responses during postural challenges.

4. Materials and methods

4.1. Animal care. For this study, we utilized conscious, freely moving, adult male Wistar rats supplied by the central animal house of the State University of Londrina in Brazil. The animals were housed individually in Perspex cages in a room with a 12:12-hour light/dark cycle. Food and water were freely available, except during the experiments. The ethics committee for animal experiments of the State University of Londrina, Brazil, approved all experimental procedures involved in this study (CEEA Protocol 17/2010). Procedures were conducted in conformity with the Brazilian Society of Neuroscience and Behavior guidelines for the care and use of laboratory animals, and conformed to the National Institutes of Health (NIH) Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH Publication 80–23, revised in 1996). All efforts were made to minimize animal suffering and the number of animals used.

4.2. Surgical proceedings. Initially, the rats were anesthetized with sodium pentobarbital (50 mg kg⁻¹, ip) and placed prone in a stereotaxic apparatus (David Kopf Instruments) with the incisor bar 5 mm below the interaural line. The animals were implanted with 2 guide-cannulas directed to the PVN (1.8 mm posterior to bregma, 0.5 mm lateral to midline and 7.6 mm below the surface). The methodology for guide cannula implantation technique was based on a previous work (De Abreu et al., 2009). At the end of the surgery, all animals

received a prophylactic dose of veterinary antibiotic. After this the rats were allowed 3 to 5 days for recuperation from the surgery. Twenty-four hours before the experiments, under sodium pentobarbital (50 mg kg^{-1} , ip) anesthesia, a polyethylene catheter was inserted into the abdominal aorta through the femoral artery. Another catheter was inserted into the femoral vein and both catheters were externalized dorsally to record arterial pressure (AP) and heart rate (HR) and for drug administration, respectively.

4.3. Measurement of cardiovascular parameters. 24 hours after catheterization, the animals were kept in their cages and basal recordings were obtained for at least 30 minutes before starting the protocol. The mean arterial blood pressure (MAP) and heart rate (HR), were recorded by a MLT0380 blood pressure transducer connected to a Powerlab system 4/20 T (ADInstruments). The BP and HR were recorded while the animals were awake and moving freely.

4.4. Pharmacological treatment. After baseline recordings in separated groups of animals we performed with 100 nL bilateral microinjections in the PVN of the different pharmacological treatments: physiological saline as a vehicle or Nw-Propyl-L-arginine (4 nmol), a nNOS inhibitor; or 1400W (2 nmol), an iNOS inhibitor. For the microinjections, a standard 30-33G stainless steel injector cannula was connected to a Hamilton syringe (7101) and positioned into the guide cannula. The injector cannula was 1 mm longer than the guide cannula. Only one administration was performed in each PVN. At the end of the experiment, Evans blue dye (2%) was microinjected (100 nl) into each experimental site of the brain for histological verification. The drug concentrations were based on following literature work: nw-Propyl-L-arginine (Busnardo et al., 2010b); DEA-NONOate (Yao et al., 2007); 1400W (Tabrizian

et al., 2010). All the drugs used for this study: Nw-Propyl-L arginine, DEA-NONOate, 1400W, sodium pentobarbital, were obtained from Sigma Chemical Co. Only before infusion, all drugs were dissolved in physiological saline.

4.5. Experimental protocol. After treatment with drugs in the different groups, the animals were induced to orthostatic challenge (head-up tilt, HUT), according to Bedette et al., (2008). The animals were stimulated to enter in a cylindrical compartment of approximately 30 cm, the restraining tube, with continuous registration of cardiovascular parameters for approximately 10 minutes. The HUT was conducted by raising the head side of the tilt board from horizontal position to 75 degrees head-up position for 15 min. After this period, the animals returned to a horizontal position (in 1 second) and remained for another period of 15 minutes, until the cardiovascular parameters to stabilize (recovery period). After completing the experimental protocol, animals were sacrificed with an overdose of anesthetic.

4.6. Histology. After euthanasia of the rats, the brain was removed and fixed in 10 % formaldehyde. For histological identification of the injection sites, the brain stem was cut coronally into 40 μ m thick sections and stained with 1% neutral red. The histological sections were examined microscopically and compared to the rat brain atlas (Paxinos and Watson, 1998). Only the brains with the confirmation of PVN localization were included in the present study.

4.7. Heart rate and systolic arterial pressure variability. 30 minutes of baseline and during restraint and HUT, arterial pressure (AP) and heart rate (HR) were recorded and processed by customized computer software (CardioSeries v2.4 <http://www.danielpenteado.com>) which applies an algorithm to detect cycle-to-cycle inflection points in the pulsatile AP signal, thus

determining beat-by-beat values of systolic and diastolic pressures. Beat-by-beat pulse interval (PI) series from the pulsatile AP signal were also generated by measuring the length of time between adjacent systolic waves. From the recording period, the time series of PI and systolic AP (SAP) were divided into contiguous segments of 300 beats, overlapped by half. After calculating mean value and variance of each segment, they were submitted to a model-based autoregressive spectral analysis as described elsewhere (Malliani et al., 1991; Rubini et al., 1993 and Task Force, 1996).

4.8. Baroreflex gain. The baroreflex sensitivity (BRS) was measured in the time domain by means of the sequence method. Using the computer program CardioSeries v2.4 (<http://www.danielpenteado.com>), time series of beat-to-beat values of PI and SAP were used for analysis of BRS. The time series were analyzed for sequences of four or more beats in which progressive increases in SAP were accompanied by progressive increases in PI, or progressive reductions in SAP were accompanied by progressive reductions of the PI. To detect changes in SAP and PI was used thresholds of 0 mmHg and 0 ms, respectively. After detecting SAP ramp (sequence of four or more beats in which progressive increases or decreases in SAP were followed or not, by increases or reductions in the PI), the computer program sought by changes in PI without any interval, i.e., delay of zero beats. A sequence baroreflex was only used when the correlation coefficient (r) between SAP and PI was greater than or equal to 0.8. The BRS was determined from the average slope of the linear regression between the SAP and PI of each baroreflex sequence found.

4.9. Statistical analysis. Statistical analysis was performed using the statistical program (GraphPad, San Diego, CA). The data were subjected to one-way repeated-measures ANOVA, followed by comparison for individual differences using Bonferroni test. Baseline and HUT from the same group were compared using paired t-test, with $p < 0.05$ was considered to indicate statistical significance. All data are presented as mean \pm SE.

Acknowledgments:

We would like to thank CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) for a PhD fellowship of de Andrade O, and CNPq for Martins-Pinge MC fellowship.

References

- Badoer E. Hypothalamic paraventricular nucleus and cardiovascular regulation. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 28: 95-99, 2001.
- Bains JS, Ferguson AV. Angiotensin II neurotransmitter actions in paraventricular nucleus are potentiated by a nitric oxide synthase inhibitor. *Regul Pept* 50: 53-59, 1994.
- Bains JS, Ferguson AV. Nitric oxide regulates NMDA-driven GABAergic inputs to type I neurons of the rat paraventricular nucleus. *J Physiol* 499: 733-746, 1997.
- Bedette D, Santos RAS, Fontes MA. Cardiovascular reactivity after blockade of angiotensin AT(1) receptors in the experimental model of tilting test in conscious rats. *Br J Pharmacol* 153: 966-971, 2008.
- Bredt DS, Hwang PM, and Snyder SH. Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature* 347: 768-770, 1990.
- Bredt DS. Endogenous nitric oxide synthesis: biological functions and pathophysiology. *Free Radic. Res.* 31: 577-596, 1999.
- Busnardo C, Crestani CC, Tavares RF, Resstel LB, Correa FM. Cardiovascular responses to L-glutamate microinjection into the hypothalamic paraventricular nucleus are mediated by a local nitric oxide-guanylate cyclase mechanism. *Brain Res* 1344: 87-95, 2010.
- Calabrese V, Butterfield DA, Scapagnini G, Stella AM, Maines MD. Redox regulation of heat shock protein expression by signaling involving nitric oxide and carbon monoxide: relevance to brain aging, neurodegenerative disorders, and longevity. *Antioxid. Redox Signal* 8: 444-477, 2006.
- Coote JH. Cardiovascular function of the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Biol Signals* 4: 142-149, 1995.
- Coote JH. A role the paraventricular nucleus of the hypothalamus in the autonomic control of the heart and kidney. *Exp Physiol* 90: 169-173, 2005.
- Dampney RA. Functional organization of central pathways regulating the cardiovascular system. *Physiol Rev* 74: 323-364, 1994.
- Dawson TM, Bredt DS, Fotuhi M, Hwang PM, and Snyder SH. Nitric oxide synthase and neuronal NADPH diaphorase are identical in brain and peripheral tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 7797-7801, 1991.
- De Abreu SB, Lenhard A, Mehanna A, De Souza HC, Correa FM, Hasser EM, Martins-Pinge MC. Role of paraventricular nucleus in exercise training induced autonomic modulation in conscious rats. *Autonomic Neuroscience* 148: 28-35, 2009.

De Andrade O, Amarante MK, Veronez NC, Corrêa FMA, Fontes MAP, Martins-Pinge MC. Involvement of the paraventricular nucleus (PVN) of hypothalamus in the cardiovascular alterations to head up tilt in conscious rats. *Neurosci Res* 73: 270-274, 2012.

De Andrade O, Borghi SM, de Souza HC, Fontes MA, Martins-Pinge MC. Paraventricular Nucleus of Hypothalamus participates in the sympathetic modulation and spontaneous fluctuation of baroreflex during head up tilt in unanesthetized rats. *Neurosc Letters* 558: 1-7, 2014.

Geelen G, Laitinen T, Hartikainen J, Länsimies E, Bergström K, Niskanen L. Gender influence on vasoactive hormones at rest and during a 70 degrees head-up tilt in healthy humans. *J Appl Physiol* 92:1401-1408, 2002.

Guggilam A, Patel KP, Haque M, Ebenezer PJ, Kapusta DR, Francis J. Cytokine blockade attenuates sympathoexcitation in heart failure: cross-talk between nNOS, AT-1R and cytokines in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Eur J Heart Fail* 10: 625-34, 2008.

Guyenet PG. The sympathetic control of blood pressure. *Nat Rev Neurosci* 7: 335-46, 2006.

Hashiguchi H, Ye SH, Ross-Cisneros F, Alexander N. Central nitric oxide donors attenuate cardiovascular and central norepinephrine responses to stress. *Am J Physiol* 272: R1447–R1453, 1997.

Hirooka Y, Polson JW, Dampney RA. Pressor and sympathoexcitatory effects of nitric oxide in the rostral ventrolateral medulla. *J Hypertens* 14: 1317-1324, 1996.

Horn T, Smith PM, McLaughlin BE, Bauce L, Marks GS, Pittman QJ, Ferguson AV. Nitric oxide actions in paraventricular nucleus: cardiovascular and neurochemical implications. *Am J Physiol* 266: 306–313, 1994.

Li YF, Mayhan WG, Patel KP. NMDA-mediated increase in renal sympathetic nerve discharge within the PVN: role of nitric oxide. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 281: H2328–H2336, 2001.

Li YF, Roy SK, Channon KM, Zucker IH, Patel K. Effect of in vivo gene transfer of nNOS in the PVN on renal nerve discharge in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 282: H594–H601, 2002.

McDowall LM, Horiuchi J, Killinger S, Dampney RA. Modulation of the baroreceptor reflex by the dorsomedial hypothalamic nucleus and perifornical area. *Am. J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 290: R1020–R1026, 2006.

Malliani A, Pagani M, Lombardi F, Cerutti S. Cardiovascular neural regulation explored in the frequency domain. *Circulation* 84: 482-492, 1991.

Martins-Pinge MC, Baraldi-Passy I, Lopes OU. Excitatory effects of nitric oxide within the rostral ventrolateral medulla of freely moving rats. *Hypertension* 30: 704–707, 1997.

- Martins-Pinge MC, Garcia MR, Zoccal DB, Crestani CC, Pinge-Filho P. Differential influence of iNOS and nNOS inhibitors on rostral ventrolateral medullary mediated cardiovascular control in conscious rats. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical* 131: 65-69, 2007.
- Martins-Pinge MC, Mueller PJ, Foley CM, Heesch CM, Hasser EM. Regulation of arterial pressure by the paraventricular nucleus in conscious rats: interactions among glutamate, GABA, and nitric oxide. *Front Physiol* 3, 490, 2013.
- Morimoto S, Sasaki S, Miki S, Kawa T, Nakamura K, Itoh H, Nakata T, Takeda K, Nakagawa M, Fushiki S. Nitric oxide is an excitatory modulator in the rostral ventrolateral medulla in rats. *Am J Hyperten* 13: 1125-1134, 2000.
- Mueller PJ, Cunningham JT, Patel KP, Hasser EM. Proposed role of the paraventricular nucleus in cardiovascular deconditioning. *Acta Physiologica Scandinavica* 177: 27-35, 2003.
- Mueller PJ, Foley CM, Hasser EM. Hindlimb unloading alters nitric oxide and autonomic control of resting pressure in conscious rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 289: R140-R147, 2005.
- Mueller PJ, Mischel NA, Scislo TJ. Differential activation of adrenal, renal, and lumbar sympathetic nerves following stimulation of the rostral ventrolateral medulla of the rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 300: R1230–R1240, 2011.
- Patel KP, Li Y-F, Hirooka Y. Role of nitric oxide in central sympathetic outflow. *Exp Biol Med* 226: 814–824, 2001.
- Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, fourth ed. Academic Press, New York, 1998.
- Pyner S. Neurochemistry of the paraventricular nucleus of the hypothalamus: implications for cardiovascular regulation. *J Chem Neuroanat* 38: 197–208, 2009.
- Rubini R, Porta A, Baselli G, Cerutti S, Paro M. Power spectrum analysis of cardiovascular variability monitored by telemetry in conscious unrestrained rats. *Journal of Autonomic Nervous System* 45: 181-190, 1993.
- Sawchenko PE, Swanson LW. The organization of forebrain afferents to the paraventricular and supraoptic nuclei of the rat. *J Comp Neurol* 218: 121-144, 1983.
- Stern JE, Li Y, Zhang W. Nitric oxide: a local signaling molecule controlling the activity of pre-autonomic neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Acta Physiol Scand* 177: 37–42, 2003.

Schwartz CE, Medow MS, Messer Z, Stewart JM. Spontaneous fluctuation indices of the cardiovagal baroreflex accurately measure the baroreflex sensitivity at the operating point during upright tilt. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 304: R1107-13, 2013.

Tabrizian K, Najafi S, Belaran M, Hosseini-Sharifabad A, Azami K, Hosseini A, Soodi A, Kazemi A, Kebriaeezadeh A, Sharifzadeh M. Effects of Selective iNOS Inhibitor on Spatial Memory in Recovered and Non-recovered Ketamine Induced-anesthesia in Wistar Rats. *Iranian Journal of Pharmacology Research* 9: 313-320, 2010.

Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology. Heart rate variability: standards of measurement, physiological interpretation, and clinical use. *Circulation* 93: 1043-1065, 1996.

Vaziri ND, Ding Y, Sangha DS, Purdy RE. Upregulation of NOS by simulated microgravity, potential cause of orthostatic intolerance. *J Appl Physiol* 89: 338-344, 2000.

Yamaguchi N, Okada S, Usui D, Yokotani K. Nitric oxide synthase isozymes in spinally projecting PVN neurons are involved in CRF-induced sympathetic activation. *Auton Neurosci* 148: 83-89, 2009.

Yamaguchi N, Ogawa S, Okada S. Cyclooxygenase and nitric oxide synthase in the presympathetic neurons in the paraventricular hypothalamic nucleus are involved in restraint stress-induced sympathetic activation in rats. *Neuroscience* 170: 773-781, 2010.

Yao ST, Antunes VR, Paton JFR, Murphy D. Osmotic regulation of neuronal nitric oxide synthase expression in the rat amygdala: Functional role for nitric oxide in adaptive responses? *Journal of Neuroscience Research* 85: 410-422, 2007.

Zhang K, Mayhan WG, Patel KP. Nitric oxide within the paraventricular nucleus mediates changes in renal sympathetic nerve activity. *Am J Physiol* 273: 864-872, 1997.

Zhang K, Patel KP. Effect of nitric oxide within the paraventricular nucleus on renal sympathetic nerve discharge: role of GABA. *Am J Physiol* 275: R728-R734, 1998.

Figure legends

Figure 1. (A) Representative photomicrograph of bilateral microinjection sites from the region of the paraventricular nucleus (PVN). (B) Schematic representation of injection sites in serial sections from the rostral (1.4 mm) to the caudal (2.12 mm) extent of the region of the paraventricular nucleus (PVN). Distance posterior to bregma is shown for each section



according to the atlas of Paxinos and Watson (1998). () Microinjections inside PVN. Abbreviations: 3V, third ventricle; AH, anterior hypothalamic nucleus.

Figure 2. Effect of microinjection of saline (n = 7) or 1400W (2 nmol, n = 6) or Nw-Propyl (4 nmol, n = 6) inside PVN on changes in (MAP) and heart rate (HR) during HUT (last minute of restraint less peak response of HUT). The results are expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM). A significant difference was observed between saline compared with 1400W in the PVN for MAP and HR responses (*p < 0.05).

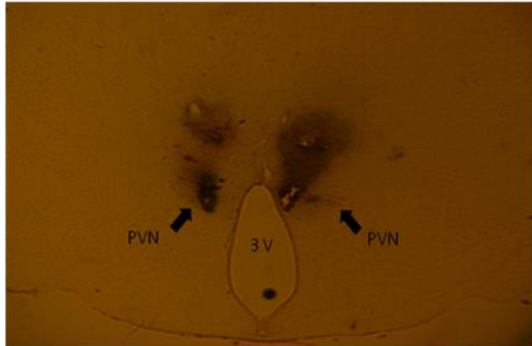
Figure 3. Spectral parameters of systolic arterial pressure (SAP) calculated from time series using autoregressive spectral analysis at baseline or during head up tilt (HUT), after PVN microinjections of Saline (vehicle), or Nw-Propyl (4 nmol, n = 6) or 1400W (2 nmol, n = 6). (A) Total variance; (B) Low-frequency power (LF) in absolute values. Values are MEAN \pm SEM. (*) P<0.05 compared to Baseline.

Figure 4. Spectral parameters of pulse interval (PI) calculated from time series using autoregressive spectral analysis at baseline or during head up tilt (HUT), after PVN microinjections of Saline (vehicle), or Nw-Propyl (4 nmol, n = 6) or 1400W (2 nmol, n = 6). (A) Total variance; (B) ratio LF and HF (C) Low-frequency power (LF) in absolute units; (D) High-frequency (HF) power in absolute units; (E) Low-frequency power (LF) in normalized units; (F) High-frequency (HF) power in normalized units. Values are MEAN \pm SEM. (*) P<0.05 compared to Baseline and (#) P<0.05 compared with HUT.

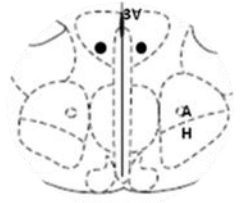
Figure 5. Effect of PVN treatment with saline, DEA-nonoate, Nw-Propyl-L-Arginine and 1400W at baseline and head-up tilt (HUT) in spontaneous fluctuations of baroreceptor reflex. Graph bars present baroreflex effectiveness index (BEI), baroreflex all gain. * $p < 0.05$ compared with baseline; # $P < 0,05$ compared to vehicle.

FIGURE 1

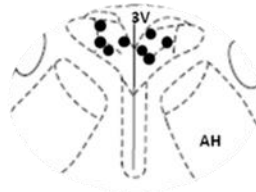
A)



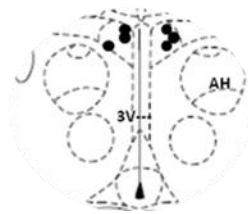
B)



1,4



1,8



2,12

TABLE 1

	Vehicle	Nw-Propyl-L-Arginine	1400w
	(N = 7)	(N = 6)	(N = 6)
BASELINE			
MAP mmHg	114 ± 2	119 ± 5	114 ± 2
HR bpm	349 ± 8	345 ± 9	353 ± 6

Table 1. Mean arterial pressure (MAP) and heart rate (HR) means in baseline (before PVN microinjection). Values are expressed as the mean ± SEM.

FIGURE 2

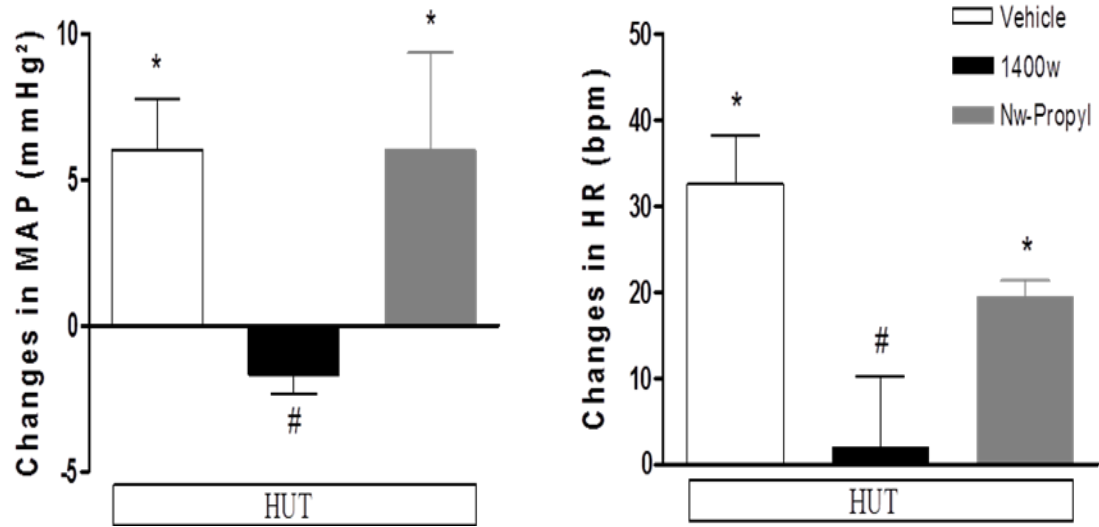
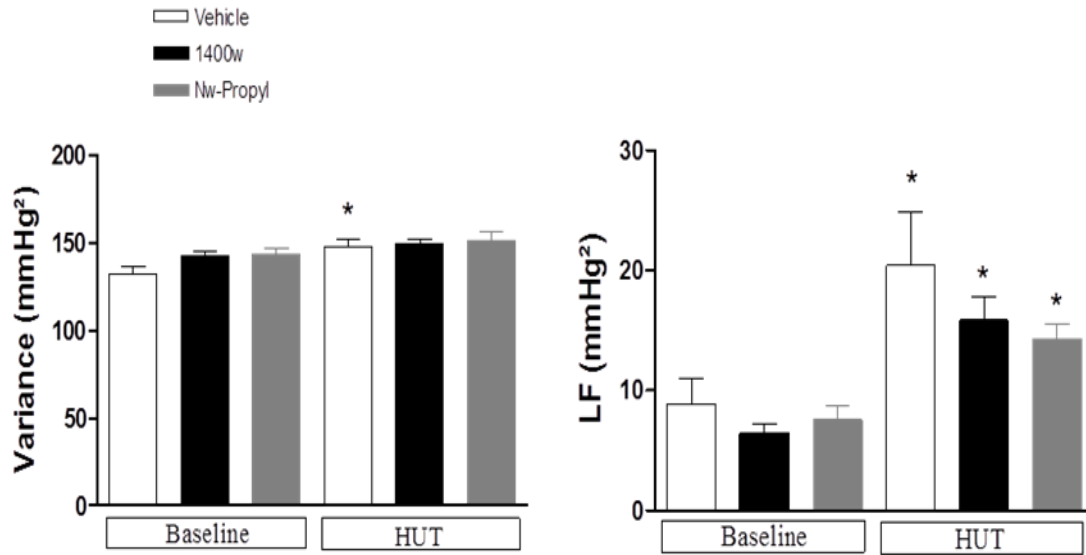


FIGURE 3

SYSTOLIC ARTERIAL PRESSURE



PULSE INTERVAL

FIGURE 4

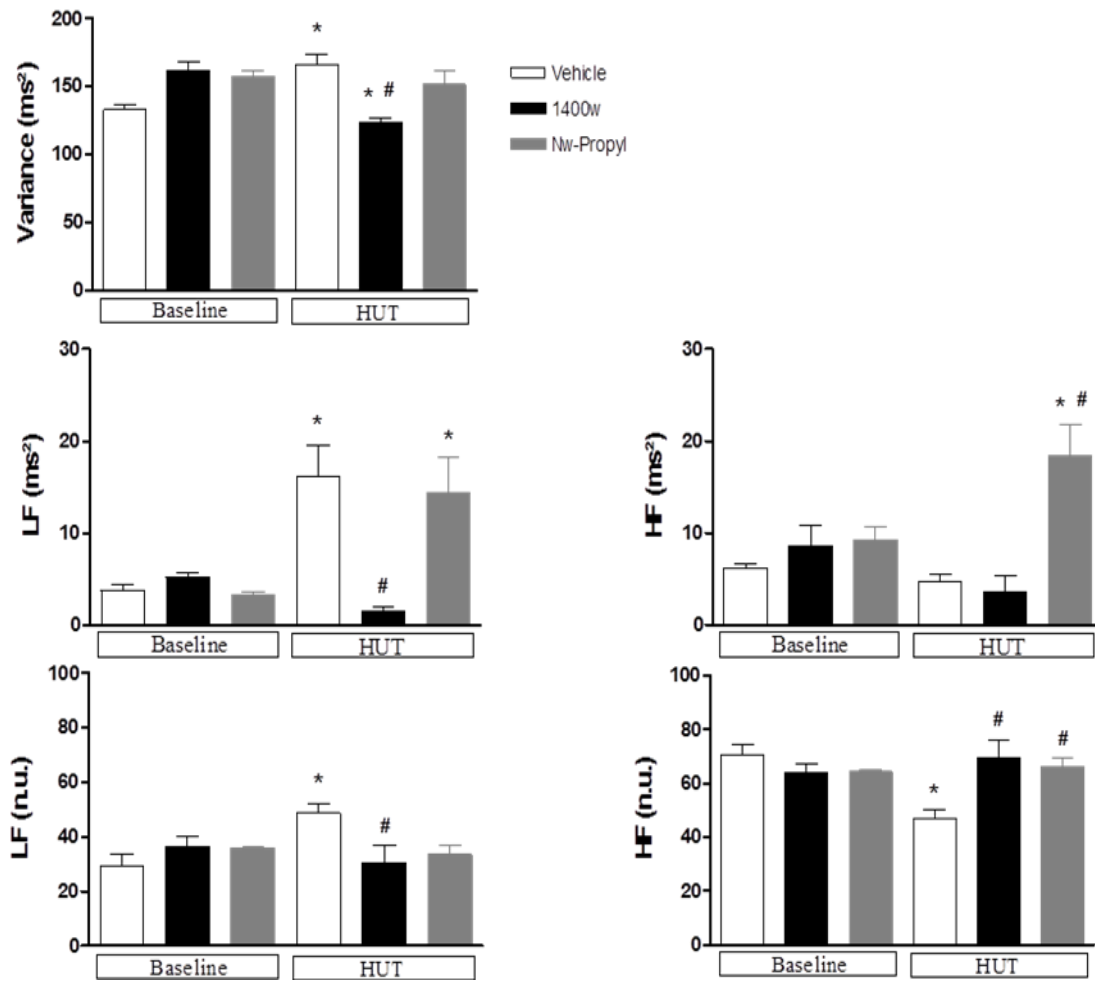
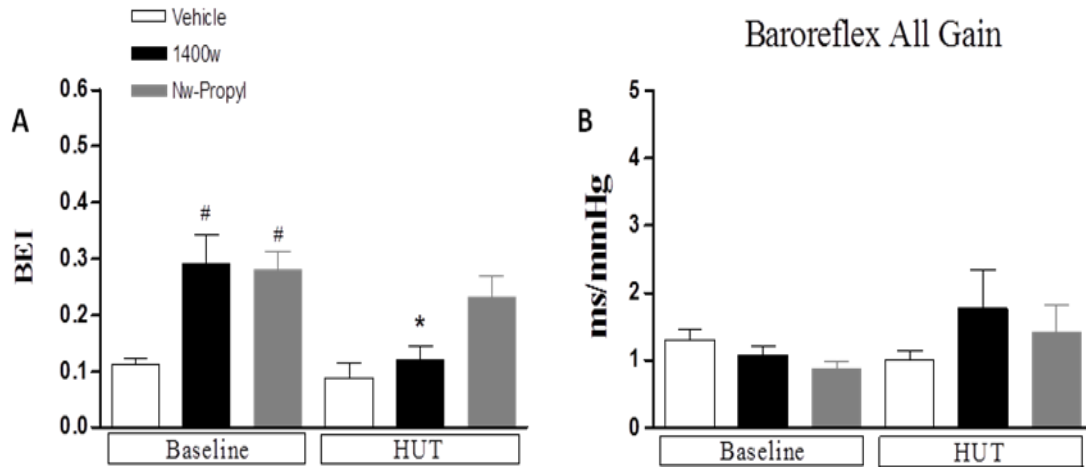


FIGURE 5



**FUNCTIONAL EVIDENCE FOR NITRIC OXIDE INVOLVEMENT IN THE
CARDIOVASCULAR AND AUTONOMIC MODULATION BY THE PVN IN
CONSCIOUS HINDLIMB UNLOADED RATS**

Ozahyr de Andrade¹, Sarah A. Friskey², Marli C. Martins-Pinge¹, Eileen M Hasser²

¹Department of Physiological Sciences – State University of Londrina, Parana, Brazil;

²Dalton Cardiovascular Research Center - University of Missouri, Columbia, MO, USA.

Correspondence:

Eileen M. Hasser, Ph.D.
Dalton Cardiovascular Research Center
134 Research Park Drive
University of Missouri
Columbia, MO 65211-3300
Office (537) 882-6125
FAX (537) 884-4232
HasserE@missouri.edu

Abstract

The Paraventricular Nucleus of the Hypothalamus (PVN) has been emerged as an important integrative nucleus of the forebrain controlling the neuroendocrine and autonomic modulation. Prolonged exposure to microgravity or maintenance of long periods of bed rest has presented changes in the expression of nitric oxide synthase (NOS) and protein concentration in the PVN. The Hindlimb Unloading (HU) model mimics all these changes that occur without gravity. Therefore, we hypothesized that the NO in the PVN of conscious rats has a functional role in cardiovascular and autonomic function when animal return to normal gravity. Rats underwent 14 days HU or cage control (CC). Guide cannulas to the PVN were implanted on Day 9. Artery and vein catheters and renal nerve electrodes were implanted on Day 13 to record mean arterial pressure (MAP), heart rate (HR) and renal sympathetic nerve activity (RSNA). Baseline MAP was similar but resting HR was increased in conscious HU compared to cage control (CC: 119 ± 6 vs. HU: 122 ± 5 mmHg) and (CC: 370 ± 5 vs. HU: 410 ± 6 bpm) respectively. Bilateral microinjections of LNMMA (2mM/100nL) was performed in the PVN and the inhibition of NOS produced greater increases in MAP (CC: 13 ± 1 vs. HU: 20 ± 2 mmHg) and RSNA (CC: 155 ± 34 vs. HU: $309 \pm 49\%$ Baseline) in HU compared to control. Changes in HR to L-NMMA were similar between groups. The differential effect of LNMMA indicate that tonic NO function in the PVN is enhanced after HU in conscious rats and it may be part of the adjustment required for microgravity environment.

Key words: arterial pressure, heart rate, microgravity, renal sympathetic nerve activity, cardiovascular deconditioning.

Introduction

After the discovery of the nitric oxide (NO) signaling molecule in cardiovascular and central nervous system, several experimental evidences have been suggesting its involvement in brain areas related to autonomic and cardiovascular modulation in different physiological conditions and pathological states (3, 20, 18, 24, 45, 12, 35, 25). Medullary structures are well described in neural control of circulation but other areas as well as the paraventricular nucleus of the hypothalamus (PVN) can indirectly or directly influence the sympathetic activity making connections with the rostral ventrolateral medulla (RVLM), known as the dominant brain region for tonic regulation of arterial blood pressure and connections with sympathetic vasomotor neurons, respectively (39, 44, 37, 35, 29, 22). The PVN is considered a neuroendocrine, behavioural and autonomic integrative nucleus (38, 39) and the autonomic efferent neurons are regulated by influence of blood volume, blood pressure and osmolality (1, 7, 16).

Physiological changes and adaptations including a central shift in body fluids, followed by a reduction in total blood and plasma volume and muscle atrophy are well known after prolonged exposure to microgravity or bed rest in humans (5, 15, 4). The return to 1G environment or to normal activity, individuals display resting tachycardia, decrease exercise capacity, and increased incidence of orthostatic intolerance (38, 32, 33, 23). The mechanism that accounts for these changes are still unresolved, although cardiac atrophy, altered vascular reactivity, hypovolemia and altered baroreflex control of sympathetic nerve activity has been suggested (8, 14, 36). Alterations within the central nervous system have been postulated to be involved and the PVN is a major source of forebrain input to the sympathetic nervous system (6, 7, 1, 2). The hindlimb unloaded (HU) rat exhibit several

changes observed in humans exposed to microgravity or bed rest: resting tachycardia, reduced exercise capability and orthostatic intolerance. Recently study has shown that alterations in peripheral and central NO system may contribute in cardiovascular regulation importantly (29, 30).

The purpose of the present study was to evaluate the cardiovascular and autonomic alterations after blockade of nitric oxide in the PVN in conscious rats previously submitted to hindlimb unloading protocol. We hypothesized that the NO within the PVN has a functional role in cardiovascular and autonomic system when animal return to normal gravity. To test this hypothesis, we examined mean arterial pressure (MAP), heart rate (HR) and renal sympathetic nerve activity (RSNA) responses to a generalized inhibition of NO synthase with L-NMMA in the PVN in control and hindlimb unloaded conscious rats.

Methods

All procedures were performed according to the guidelines stated in the National Institutes of Health *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. All protocols were reviewed and approved by the University of Missouri-Columbia Animal Care and Use Committee. Twelve male Sprague-Dawley rats (220-250g, Harlan Sprague Dawley, Indianapolis, IN) were used in this study. Food (Formulab Diet, 0.28% sodium; Purina, St. Louis, MO) and water were available ad libitum to both groups of animals.

Hindlimb Unloading. Rats were randomly assigned to HU or cage control (CC) groups. All rats were anesthetized with isoflurane to implant the suspension apparatus and apply a small lightweight thoracic cast (10g; Specialist plaster bandages; Johnson & Johnson). The suspension apparatus consists of two stainless wires (0.029-mm diameter; Small Parts) passed

through the 5th and 7th sacral intervertebral space and formed into a circle (4.5-cm diameter) with a small grommet (0.5-cm diameter). A 10 days period was allowed for the animal to recover before the HU animals were acclimated to HU. The acclimation consists in hindlimb suspension (30-35°) was adequate to eliminate weight bearing by the hindlimbs. After the acclimation period, HU animals were suspended for 14 days. CC animals were maintained in individual cages for a similar time period.

Surgical Procedures. Surgeries were performed 5 and 1 day before the experiment (day 9 and 13 of HU periods). Surgery was performed under isoflurane anesthesia using sterile technique. The animals were placed prone in a stereotaxic apparatus (David Kopf Instruments) with the incisor bar 5 mm below the interaural line and two guide-cannula were implanted directed to the PVN (1.8 mm posterior to bregma, 0.5 mm lateral to midline and 7.6 mm below the surface). The guide-cannula implantation technique was an adaptation based on a previous work (24, 9). On the 13th day surgery was performed under isoflurane anesthesia using sterile technique. Arterial and venous catheters (PE-10 fused to PE-50) were implanted in the abdominal aorta through the femoral artery and vein. Catheters were filled with heparinized saline (10 U/ml), closed with an airtight plug, and exteriorized in the dorsal cervical region. A left renal nerve was exposed by a retroperitoneal approach, dissected free of connective tissue and placed on a recording electrode. The electrode consisted of two silver, Teflon-insulated wires (Medwire; 0.0005-in. diameter) passed through Silastic tubing (0.025-in. diameter). The Teflon-insulation was removed from the electrode tips, which were fashioned into hooks and placed in contact with the isolated renal nerve. The nerve and electrode were covered with a polyvinylsiloxane gel (Super Dent light; Darby Dental Lab Supply) that was allowed to harden before closure. A ground wire was implanted in the

surrounding muscle. The electrode and ground wire were exteriorized with the catheters in the dorsal cervical region after recovery from anesthesia the animals were returned to their cages or in suspension apparatus for 24 h before any experimental manipulations.

Experimental procedure. To mimic conditions of returning to a 1G environment or to an upright posture, we performed all experiments with the rats removed from suspension apparatus and in a horizontal position. Animals were placed in an experimental cage filled with bedding from their home cage. The experimental cage was located in a quiet isolated room. For recording arterial blood pressure, the arterial catheter was attached to a pressure transducer. Mean arterial pressure (MAP) was derived electronically using a low-pass filter. HR was determined from the arterial pressure pulse by using a PowerLab ratemeter function (ADI Instruments). RSNA was amplified 1,000 times using a band-pass filter (30 Hz-3 kHz). Multiunit nerve activity was monitored with an oscilloscope (Tektronix) and an audio monitor (Grass M8). Nerve activity was rectified and integrated using a root-mean-square convert with a time constant of 28 ms. The signal was then electronically averaged, and this mean signal was used as a relative measure of RSNA. Background noise in the sympathetic nerve recording was determined after the rats were euthanized. All experiments were performed within a Faraday cage to decrease electrical noise. All data were recorded using a computer-based data acquisition system (PowerLab; ADI Instruments).

The experiments began with a stabilization period of ~30 min during which baseline hemodynamic parameters were recorded. At the end of this period bilateral microinjections in the PVN with artificial Cerebro Spinal Fluid (aCSF) (100nl) or a nonspecific of all NO synthases inhibitor *N**g*-monomethyl-L-arginine (L-NMMA) (2mM, 100nl). At the end of the experiments, the rats were overdosed with a euthanized solution through the venous catheter

(Beuthanasia, 0.2 ml). The soleus and plantaris muscles and adrenal glands were removed and weighted.

Histology. In addition to functional identification of PVN injection sites with L-NMMA in every animal, we marked injection sites in the PVN with 2% Evans blue dye (100 nl) bilaterally in all animals used in these studies. The brains were removed and placed in 10% phosphate-buffers formalin containing sucrose. After a minimum 2 days the brain was sectioned into 40- μ m coronal slices. Slices were then mounted on microscope slides and the center of dye spot was observed with a microscope.

Drugs. The L-NMMA was obtained from Sigma Chemical (St. Louis, MO) and was dissolved in aCSF. L-NMMA and the aCSF were pH adjusted to 7.3 – 7.5 before microinjection.

Data Analysis. All data are presented as mean \pm SE. Hindlimb body weights, muscle and adrenal gland weights were analyzed using Student's *t*-test for independent groups. Body weights were examined using two-way analysis of variance (ANOVA) with the group (control vs. HU) and time (*days 1* and *14*) as factors. We also used Student's two-tailed unpaired *t*-test to compare the response (change) between CC and HU groups after aCSF or L-NMMA treatment. $P \leq 0.05$ was considered to indicate statistical significance.

Results

All animal presented in this study had a confirmation of bilateral paraventricular nucleus (PVN) sites with 100 nl of dye Evans Blue microinjected at the conclusion of all experiments (figure 1).

Effects of hindlimb unloading. Table 1 contains data from rats in this study and includes body weights and absolute wet weights control animals and hindlimb unloaded

animals that were hindlimb unloaded for 14 days. Body weight did not differ significantly between groups in the pre-experimental period; however, post-experimental period control animals gained weight, was a significant change in body weight in HU rats over the 14-day period of unloading (control, 315 ± 5 vs. HU, 282 ± 7 g). HU rats exhibited signs of hindlimb soleus and plantaris muscle atrophy as evidenced by significantly lower absolute wet weight (control, 115 ± 7 vs. HU, 55 ± 2 mg) and (control, 307 ± 14 vs. HU, 248 ± 3 mg) respectively. Significant atrophy in the soleus and plantaris muscles confirms the effectiveness of the hindlimb unloading intervention in producing a deconditioned state. The adrenal gland did not differ between CC and HU groups. Baseline MAP values for animals in conscious state were similar in control and HU rats but HR was significantly increased after 14 days unloaded (control, 370 ± 5 vs. HU, 410 ± 6 bpm) presented in (Table 1).

Tracings of fig 2 shows pulsatile arterial pressure (PAP), mean arterial pressure (MAP), heart rate (HR) and short (2 min) example recordings of raw and integrated renal sympathetic nerve activity and changes on these parameters in response to NO inhibition in the PVN after bilateral microinjection of L-NMMA in Cage Control and Hindlimb Unloading rats. We can observe discrete change response in Cage Control animal after bilateral microinjection to NOS inhibitor in the PVN. And an evidenced increase in PAP, MAP, HR and RSNA of HU conscious rat after L-NMMA microinjection.

In the tracings of fig 3 we can also observe changes in MAP, HR and RSNA on these parameters. Bilateral microinjection of aCSF into the PVN of CC (n=5) and HU (n=7) did not produce any difference while bilateral microinjection of L-NMMA produced greater increases in MAP (CC: 13 ± 1 vs. HU: 20 ± 2 mmHg) and RSNA (CC: 155 ± 34 vs. HU: $309 \pm 49\%$ Baseline) in HU compared to control. Changes in HR to L-NMMA were similar between groups.

Discussion

The major findings in this study were that responses to NOS inhibition in the PVN are increased after 14 days of hindlimb unloading in rats. These responses are attenuated in control conditions. The NO effect within the PVN is increased by simulating microgravity or bed rest leading to tonic cardiovascular and autonomic alterations. HU rats presented increased MAP and RSNA after bilateral L-NMMA NOS inhibition into the PVN in conscious animals. This data suggest that simulated microgravity or bed rest leads to augmented PVN inhibition mediated by NO.

Hindlimb unloaded rats exhibited some of the same changes that occur in humans after microgravity or bed rest as muscle atrophy and resting tachycardia (17, 28). Previous studies indicate that baroreceptor afferent activity in response to changes in arterial pressure is unaltered in HU rats. However, increases in efferent sympathetic nerve activity for a given decrease in afferent input are blunted after HU, suggesting changes in CNS processing of afferent information (27, 13). Other studies shown that nitric oxide synthase protein expression from neuronal pathway (nNOS) was higher in the PVN of hindlimb unloaded (42, 29) indicating a contribution to sympathoinhibition following volume expansion during cardiovascular deconditioning (28), and reductions in peripheral NO-mediated dilation in HU conscious rats (30, 31) induced consequences in controlling resting arterial blood pressure.

Several studies have shown that the PVN is a highly integrated brain region with multiple functions and mainly involved in cardiovascular function. The exercise training seems to promote alterations in the PVN and this may contribute to increased parasympathetic and decreased sympathetic modulations in physiological condition and the

NO possibly collaborate (26). In the same way, the NO-mediated inhibition of RSNA within the PVN was blunted in rats with heart failure (46), and exercise training improves the altered NO mechanism within the PVN and restores NO-mediated changes in the renal sympathetic nerve activity of rats (48), suggesting a NO-mediated modulation within the PVN after exercise in physiological and pathophysiological condition. An interaction between NO and GABA appears to be involved in tonic inhibition of basal sympathetic outflow (7) and recent evidences suggesting an sympathoinhibitory effect of NO in the PVN mediated by GABA (46).

Previous data from our laboratory suggest that the PVN participates in the central pathways related to cardiovascular compensations during postural changes, having more preeminent participation of the PVN in arterial pressure alterations than in heart rate (10) as well as its involvement in arterial baroreflex gain after simulated head-up posture (11). There is a growing body of evidence in the literature that suggests that blockade of nitric oxide synthase (NOS) in the PVN produces an increase in arterial pressure and sympathoexcitation (3, 43, 34, 19, 47, 21). In this regard, the HU rats when return to normal position presented an increased MAP and RSNA response after NOS inhibition compared with the control group, therefore our data are in agreement with previous studies.

In summary, our data showed that 14 days of hindlimb unloading induced an increased tonic effect by nitric oxide in the PVN on cardiovascular and sympathetic regulation. These effects may be important to restore volume and cardiovascular changes imposed by weightlessness.

Acknowledgments

This work was supported by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPQ) from Brazil (to O. Andrade) and National Heart, Lung, and Blood Institute from USA Grant HL-55306 (to E. M. Hasser).

References

1. **Badoer E.** Hypothalamic paraventricular nucleus and cardiovascular regulation. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 28(1-2):95-9. 2001.
2. **Badoer E.** Cardiovascular role of parvocellular neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *News Physiol Sci* 11, 43–47, 2002.
3. **Bredt DS, Hwang PM, Snyder SH.** Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature* 347, 768–770, 1990.
4. **Buckey JC, Lane LD, Levine BD.** Orthostatic intolerance after spaceflight. *J Appl Physiol* 81: 7–18, 1996.
5. **Chobanian AV, Lille RD, Tercyak A, Blevins P.** The metabolic and hemodynamic effects of prolonged bed rest in normal subjects. *Circulation* 49: 551–559, 1974.
6. **Coote JH.** Cardiovascular function of the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Biol Signals* 4(3):142-9, 1995.
7. **Coote JH.** A role for the paraventricular nucleus of the hypothalamus in the autonomic control of heart and kidney. *Exp Physiol* 90.2, 169–173. 2004.
8. **Convertino VA, Doerr DF, Eckberg DL, Fritsch JM, and Vernikos- Danellis J.** Head-down bed rest impairs vagal baroreflexes responses and provokes orthostatic hypotension. *J Appl Physiol* 68: 1458–1464, 1990.
9. **De Abreu SB, Lenhard A, Mehanna A, de Souza HC, Correa FM, Hasser EM, Martins-Pinge MC.** Role of paraventricular nucleus in exercise training- 250 induced autonomic modulation in conscious rats. *Auton Neurosci Basic Clin* 251 148, 28–35, 2009.
10. **De Andrade O, Amarante MK, da Cunha NV, de Aguiar Corrêa FM, Fontes MA, Martins-Pinge MC.** Involvement of the paraventricular nucleus (PVN) of hypothalamus in the cardiovascular alterations to head up tilt in conscious rats. *Neurosci Res* 2012 72(3):270-4, 2012.
11. **De Andrade O, Fontes MA, Martins-Pinge MC.** Paraventricular Nucleus of Hypothalamus participates in the sympathetic modulation and spontaneous fluctuation of baroreflex during head up tilt in unanesthetized rats. *Neuros Letters* (October 28, 2013). doi: 10.1016/j.neulet.2013.09.039.
12. **DiCarlo SE, Zheng H, Collins HL, Rodenbaugh DW, Patel KP.** Daily exercise normalizes the number of diaphorase (NOS) positive neurons in the hypothalamus of hypertensive rats. *Brain Res* 955, 153–160, 2002.

13. **Foley CM, Mueller PJ, Hasser EM, Heesch CM.** Hindlimb unloading and female gender attenuate baroreflex mediated sympathoexcitation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 289, R1440–R1447, 2005.
14. **Fortney SM, Schneider VS, and Greenleaf JE.** The physiology of bed rest. In: *Environmental Physiology*, edited by Fregly MJ and Blatteis CM. New York: Oxford University Press p. 889–939, 1996.
15. **Fritsch-Yelle JM, Charles JB, Jones MM.** Spaceflight alters autonomic regulation of arterial pressure in humans. *J Appl Physiol* 77(4): 1776–1783, 1994.
16. **Guyenet PG.** The sympathetic control of blood pressure. *Nat Rev Neurosci* 7(5):335-46, 2006.
17. **Hasser EM, Moffitt JA.** Regulation of sympathetic nervous system function after cardiovascular deconditioning. *Ann NY Acad Sci* 940: 454–468, 2001.
18. **Hirooka Y, Polson JW, Dampney RA.** Pressor and sympathoexcitatory effects of nitric oxide in the rostral ventrolateral medulla. *J Hypertens* 14(11):1317-24 1996.
19. **Krukoff TL, Khalili P.** Stress-induced activation of nitric oxide-producing neurons in the rat brain. *J Comp Neurol* 27;377(4):509-19, 1997.
20. **Krukoff TL.** Central actions of nitric oxide in regulation of autonomic functions. *Brain Res Rev* 30: 52–65, 1999.
21. **Li YF, Roy SK, Channon KM, Zucker IH, Patel KP.** Effect of in vivo gene transfer of nNOS in the PVN on renal nerve discharge in rats. *Am J Physiol: Heart Circ Physiol* 282, H594–H601, 2002.
22. **Li Y-F, Patel KP.** Paraventricular nucleus of the hypothalamus and elevated sympathetic activity in heart failure: the altered inhibitory mechanisms. *Acta Physiol Scand* 177, 17–26, 2003.
23. **Martel E, Champeroux P, Lacolley P.** Central hypervolemia in the conscious rat: a model of cardiovascular deconditioning. *J Appl Physiol* 80: 1390– 1396, 1996.
24. **Martins-Pinge MC, Baraldi-Passy I, Lopes OU.** Excitatory effects of nitric oxide within the rostral ventrolateral medulla of freely moving rats. *Hypertension* 30(3 Pt 2):704-7. 1997.
25. **Martins-Pinge MC, Mueller PJ, Foley CM, Heesch CM, Hasser EM.** Regulation of arterial pressure by the paraventricular nucleus in conscious rats: interactions among glutamate, GABA, and nitric oxide. *Front Physiol* 3 490, 2012.

26. **Mastelari RB, de Souza HC, Lenhard A, de Aguiar Corrêa FM, Martins-Pinge MC.** Nitric oxide inhibition in paraventricular nucleus on cardiovascular and autonomic modulation after exercise training in unanesthetized rats. *Brain Res* 23;1375:68-76, 2011.
27. **Moffitt JA, Schadt JC, and Hasser EM.** Altered central nervous system processing of baroreceptor input following hindlimb unloading in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 276: H2272–H2279, 1999.
28. **Morey-Holton ER, Globus RK.** Hindlimb unloading rodent model: technical aspects. *J Appl Physiol* 92: 1367–1377, 2002.
29. **Mueller PJ, Cunningham JT, Patel KP, Hasser EM.** Proposed role of the paraventricular nucleus in cardiovascular deconditioning. *Acta Physiol Scand* 177: 27–35, 2003.
30. **Mueller PJ, Foley CM, Hasser EM.** Hindlimb unloading alters nitric oxide and autonomic control of resting arterial pressure in conscious rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 289, R140–R147, 2005.
31. **Mueller PJ, Sullivan MJ, Grindstaff RR, Cunningham JT, Hasser EM.** Regulation of plasma vasopressin and rennin activity in conscious hindlimb-unloaded rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 291, R46–R52, 2006.
32. **Overton JM, Woodman CR, Tipton CM.** Effect of hindlimb suspension on VO₂ max and regional blood flow responses to exercise. *J Appl Physiol* 66(2): 653–659, 1989.
33. **Overton, J. M., and C. M. Tipton.** Effect of hindlimb suspension on cardiovascular responses to sympathomimetics and lower body negative pressure. *J App Physiol* 68: 355–362, 1990.
34. **Patel KP, Zhang K.** Neurohumoral activation in heart failure: role of paraventricular nucleus. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 23, 722–726, 1996.
35. **Patel KP, Li Y-F, Hirooka Y.** Role of nitric oxide in central sympathetic outflow. *Exp Biol Med* 226, 814–824, 2001.
36. **Pawelczyk JA, Zuckerman JH, Blomqvist CG, and Levine BD.** Regulation of muscle sympathetic nerve activity after bed rest deconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280: H2230–H2239, 2001.
37. **Pyner S, Coote JH.** Identification of branching paraventricular neurons of the hypothalamus that project to the rostroventrolateral medulla and spinal cord. *Neuroscience* 100, 549–556, 2000.
38. **Shellock FG, Swan HJC, Rubin SA.** Early central venous pressure changes in the rat during two different levels of head-down suspension. *Aviat Space Environ Med* 56: 791–795, 1985.

-
39. **Shafton AD, Ryan A, Badoer E.** Neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus send collaterals to the spinal cord and to the rostral ventrolateral medulla in the rat. *Brain Res* 801, 239–243, 1998.
40. **Swanson LW, Sawchenko PE.** Paraventricular nucleus: a site for the integration of neuroendocrine and autonomic mechanisms. *Neuroendocrinology* 31(6):410-7. 1980.
41. **Swanson LW, Sawchenko PE.** Hypothalamic integration: organization of the paraventricular and supraoptic nuclei. *Annu Rev Neurosci* 6, 269–324, 1983.
42. **Vaziri ND, Ding Y, Sangha DS, and Purdy RE.** Upregulation of NOS by simulated microgravity, potential cause of orthostatic intolerance. *J Appl Physiol* 89: 338–344, 2000.
43. **Vincent SR, Kimura H.** Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain. *Neuroscience* 46, 755–784, 1992.
44. **Yang Z, Coote JH.** Influence of the hypothalamic paraventricular nucleus on cardiovascular neurones in the rostral ventrolateral medulla of the rat. *J Physiol* 513, 521–530, 1998.
45. **Zanzinger J.** Role of nitric oxide in the neural control of cardiovascular function. *Cardiovasc Res* 15;43(3):639-49. 1999.
46. **Zhang K, Li Y-F, Patel KP.** Blunted nitric oxide mediated inhibition of renal nerve discharge within PVN of rats with heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 281, H995–H1004, 2001.
47. **Zhang K, Patel KP.** Effect of nitric oxide with the paraventricular nucleus on renal sympathetic nerve discharge: role of GABA. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 44 275, R728–R734, 1998.
48. **Zheng H, Li YF, Cornish KG, Zucker IH, Patel KP.** Exercise training improves endogenous nitric oxide mechanisms within the paraventricular nucleus in rats with heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288: H2332-H2341, 2005.

Figures legends

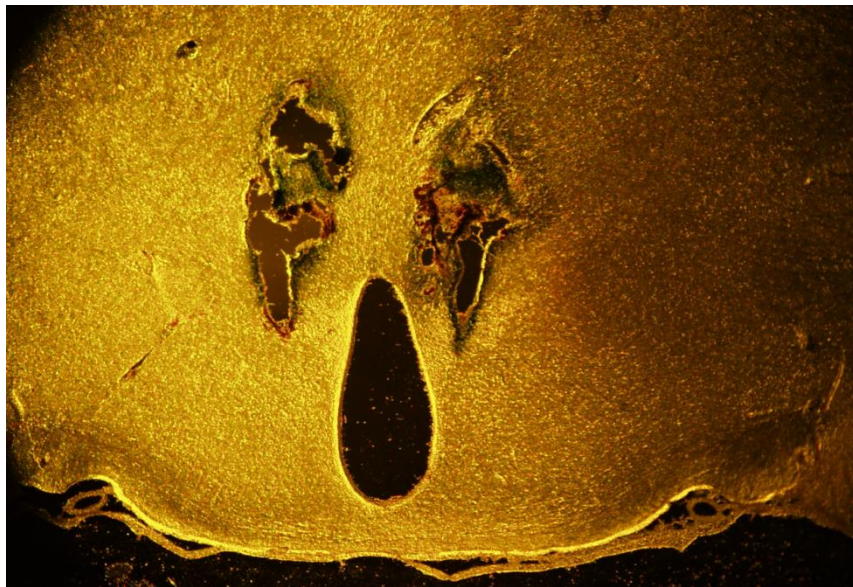
Figure 1. Representative photomicrograph of bilateral microinjection sites within of the paraventricular nucleus (PVN) of an individual rat. 100 nl of dye Evans Blue was injected at the conclusion of all experiments.

Table 1. Body, muscles, adrenal gland weight, resting MAP and HR. Values are means \pm SE. Body weight (BW) was measured before suspension on day 1 (D1) and after removal from suspension, which typically was on day 14 (D14). Muscle and adrenal gland weights were measured on D14. * $P \leq 0.05$.

Figure 2. Typical tracings of pulsatile arterial pressure (PAP), mean arterial pressure (MAP), heart rate (HR) and short (2 min) example recordings of raw and integrated renal sympathetic nerve activity from an original experimental group of one original record from the experimental group. L-NMMA Cage Control and Hindlimb Unloaded group. The arrows indicate the moment of PVN microinjection. A and C – a single Cage Control rat, B and D – a single Hindlimb Unloaded rat before and after bilateral L-NMMA microinjection into the PVN.

Figure 3. Effects of bilateral blockade in the region of PVN with L-NMMA on MAP, HR and RSNA in separate groups of conscious rats. Bilateral microinjection of L-NMMA significantly increased MAP (CC: 13 ± 1 vs. HU: 20 ± 2 mmHg) and RSNA (CC: 155 ± 34 vs. HU: $309 \pm 49\%$ Baseline) in cage control (CC n=5) and Hindlimb Unloaded (HU n=7). HR was similar between groups. (* $P \leq 0.05$).

Figure 1



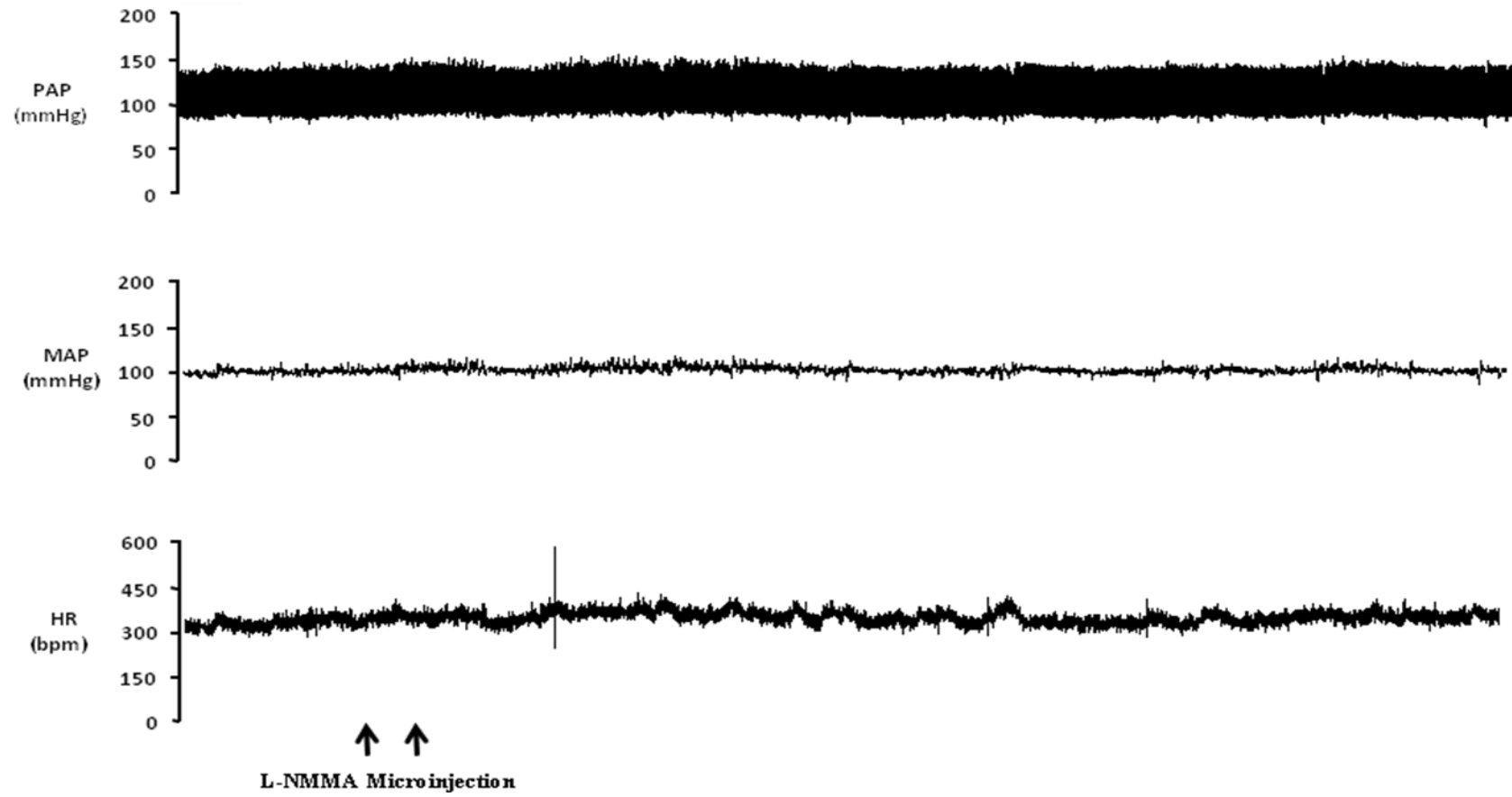
0.5 mm

	n	Body Wt, g		Soleus Wt, mg	Soleus Wt/ body	Plantaris Wt, mg	Plantaris Wt/ body	Adrenal, mg	Resting MAP, mmHg	Resting HR, bpm
		Day 1	Days 14							
Control	5	261 ± 10	315 ± 5	115 ± 7	0.36 ± 0.01	307 ± 14	0.95±0.01	30±4	119±6	370±5
Hindlimb Unloaded	7	253±10	282 ± 7 *	55 ± 2 *	0.20 ± 0.02*	248 ± 3*	0.65±0.01*	30±3	122±5	410±6*

Table 1

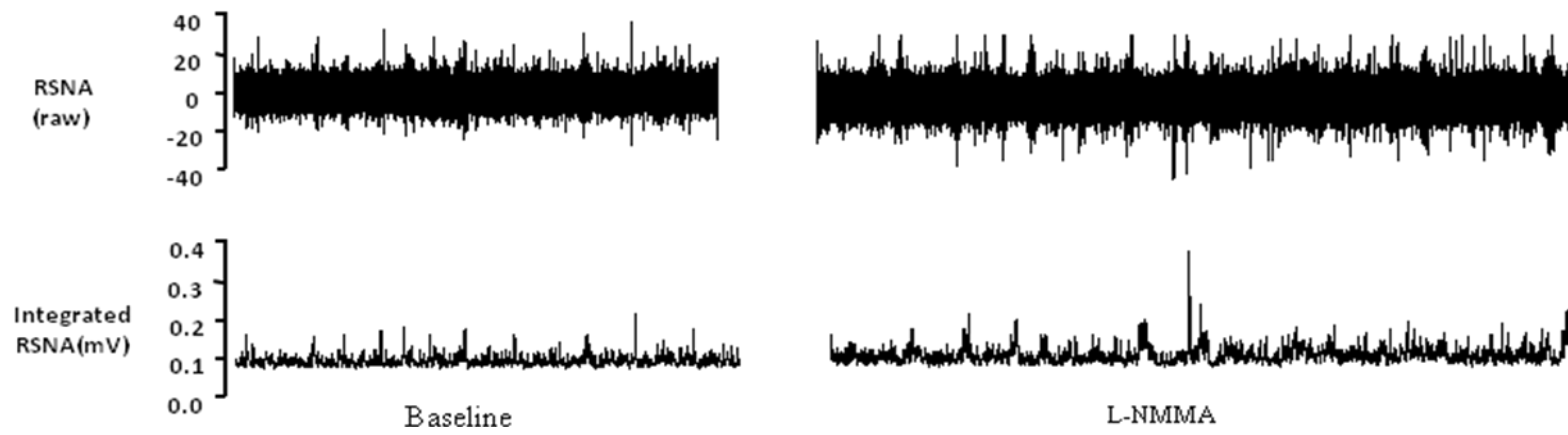
Figure2

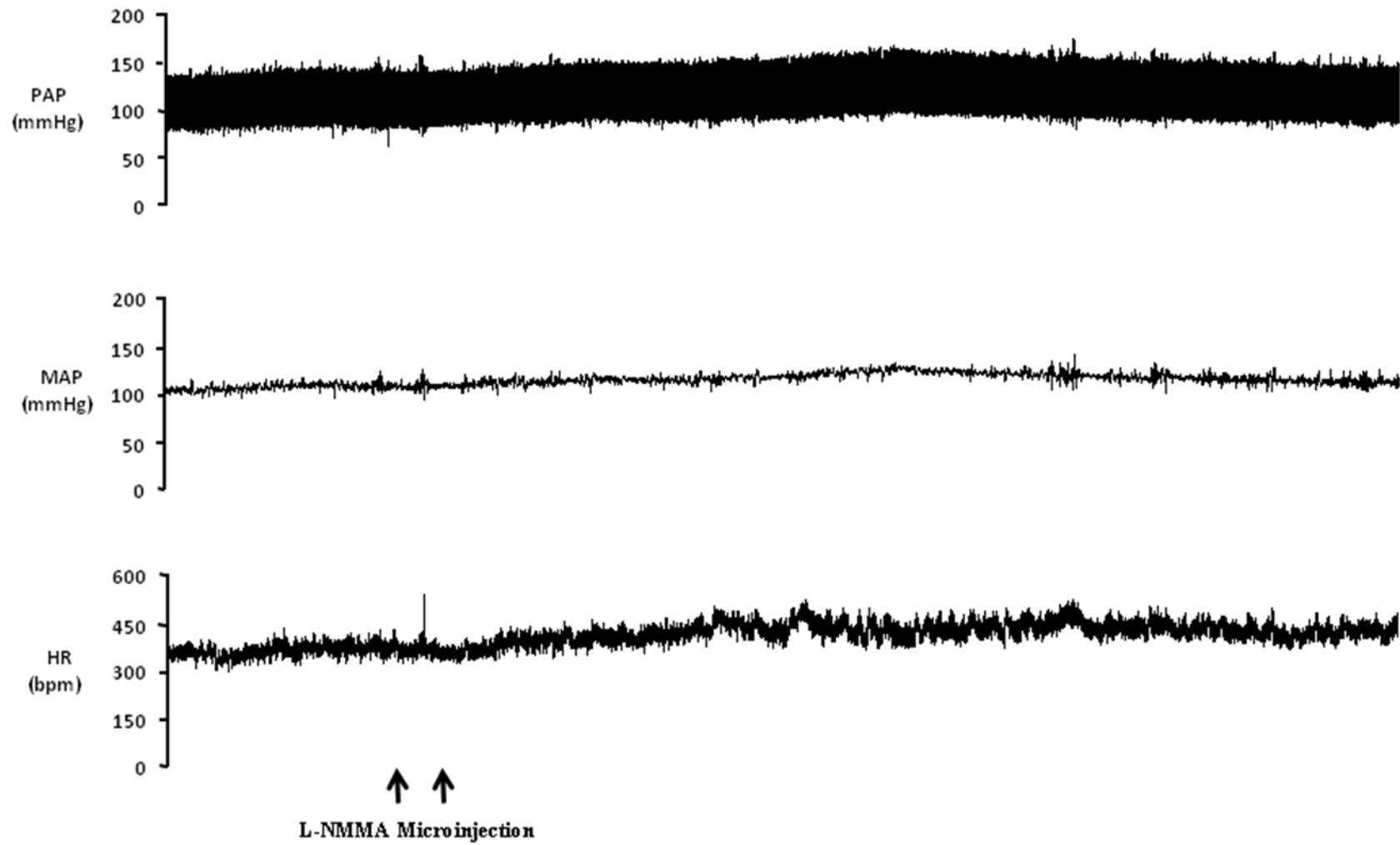
A)



Figure

C)



B)

Figure

D)

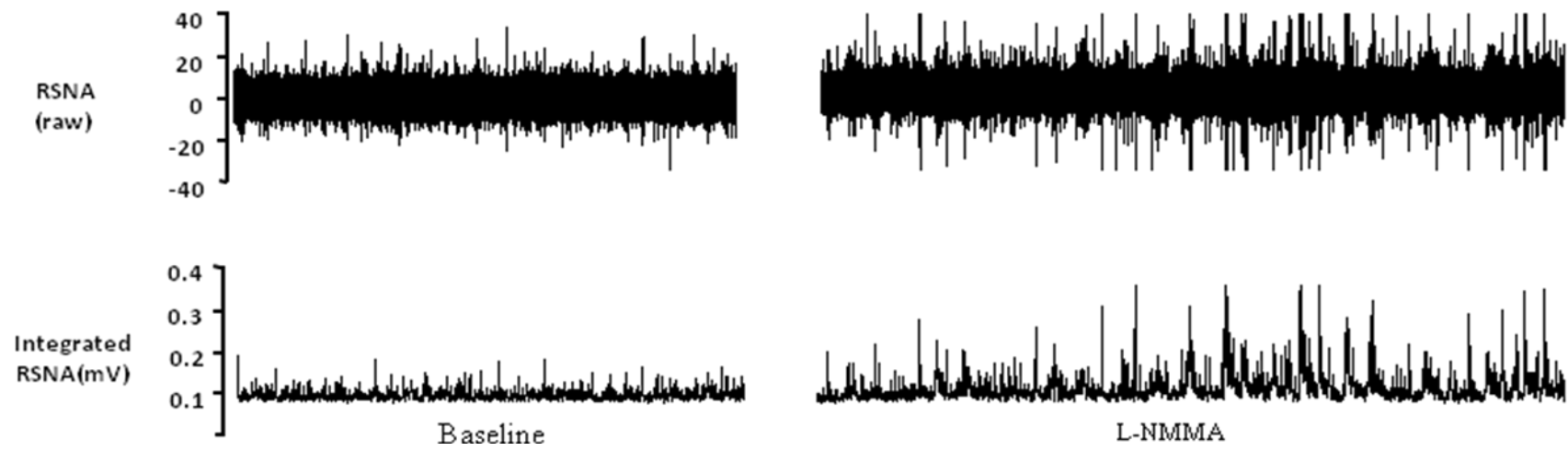


Figure 3

