Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Departamento de Farmacologia

**Os receptores TRPV₁ do córtex pré-frontal medial ventral modulam a
atividade do barorreflexo cardíaco em ratos**

Aluno: Davi Campos La Gatta

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Resstel Barbosa Moraes

Ribeirão Preto

2013

Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Departamento de Farmacologia

**Os receptores TRPV₁ do córtex pré-frontal medial ventral modulam a
atividade do barorreflexo cardíaco em ratos**

Davi Campos La Gatta

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre, pelo programa de Pós-graduação em Ciências, Área de concentração: Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Resstel Barbosa Moraes

Ribeirão Preto

2013

AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca Central do Campus Administrativo de
Ribeirão Preto/USP

Lagatta, Davi Campos.

Os receptores TRPV₁ do córtex pré-frontal medial modulam a atividade do barorreflexo cardíaco em ratos. Ribeirão Preto, 2013.

57p

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP.

Área de concentração: Farmacologia

Orientador: Resstel, Leonardo Barbosa Moraes

1. Córtex pré-frontal medial ventral. 2. Receptores TRPV₁. 3. Atividade barorreflexa.

Data da Defesa: 21/06/2013

Banca Examinadora

Prof. Dr. Leonardo Resstel Barbosa Moraes_____

Julgamento:_____ Assinatura:_____

Profª. Drª. Rita de Cássia Aleixo Tostes Passaglia_____

Julgamento:_____ Assinatura:_____

Prof. Dr. Carlos César Crestani_____

Julgamento:_____ Assinatura:_____

Dedico,

Aos meus pais, que sempre foram meu orgulho e inspiração.

Agradecimentos...

Gostaria de agradecer, primeiramente aos meus pais que mesmo nos momentos mais difíceis nunca deixaram de me apoiar. Obrigado pelos ensinamentos e pela paciência sem igual que tiveram comigo.

Ao Professor Dr. Leonardo Resstel Barbosa Moraes pela orientação neste trabalho e por ter me aceito como seu aluno desde a nossa primeira conversa, ainda em 2010. A você Léo, o meu muito obrigado pela confiança.

Aos professores da banca examinadora: Dr^a. Rita Tostes e Dr. Carlos César Crestani por terem aceito gentilmente fazer parte da apresentação desta dissertação.

Aos companheiros do laboratório: Leandro, Alessandra, Sara, Daniela, Daniel e Teophanes. Dentre estes amigos tão queridos, agradeço especialmente ao Nilson por ter me ensinado toda a parte prática necessária à realização deste trabalho e pela parceria fundamental nos experimentos; à Josie e Gabi; como filho único agradeço pelas duas irmãs que ganhei durante esse tempo, obrigado pelos conselhos e conversas nos momentos em que eu mais precisei. E também aos nossos eternos IC's: Lucas, Ricardo, Cibele, Anna Bárbara e às mais novas Alessandra e Ana Carolina.

Aos nossos queridos técnicos, Laura e Orlando, pelo suporte técnico, pelos puxões de orelha que foram muito úteis no meu aprendizado e também pelo bom humor de sempre.

Aos amigos do laboratório do Prof. Dr. Fernando Morgan: Cris, Fernando, América, Eduardo, Aline, Milena, Bruna, Silvana, Ivanilda, Idália, Simone obrigado pelo prazer da amizade de vocês.

Aos amigos do laboratório do Prof. Dr. Francisco Guimarães: Manu, Andreza, Sabrina, Carla e especialmente ao Fêfo que juntamente com a Dani e a Lorena

possibilitaram a minha primeira visita a Ribeirão Preto; e ao Plínio que levou o nome do professor Leonardo até Juiz de Fora.

Aos amigos do laboratório da Prof^a. Sâmia Joca: Cassiano, Vitor, Vini, Deidiane, Laura, Angélica, Ariandra, Amanda; obrigado pela agradável convivência.

Aos amigos dos outros laboratórios: Marcelo, Flávio (Maranhão), Kalil, Jimhy, Raphael (Panda), Dênis, Lucas Coelho, Cris Vilhena, Bruninho, Bruno, Murilo (Kid Mumu), Helô, Gislaine, Mateus, George, Nathanne, Camila Pereira, Tayllon, Gustavo, Paulo de Tarso, Rosana, Melina, Aílton; apesar do pouco tempo que os conheço tenho certeza que serão amigos de longa data.

Aos amigos de sempre: Érick, Túlio, Raquel, Lucas Pinheiro, Jaqueline, Thiago Maurício, Fabiana, Rafael, João Paulo, Léozão, Carol, Fábio, Ênio, Silas, Maria Luiza, Priscila, Frederico Simões, adoro todos vocês! E também, é claro, a dona Maria Eugênia (Dona Gena), mãe do grande parceiro Érick que vem nos visitar esporadicamente e não deixa de ser uma pessoa extremamente alegre e prestativa.

Com certeza conviver com todos vocês deixou o trabalho mais fácil. A todos muito obrigado.

Aos nossos funcionários da Secretaria do Departamento de Farmacologia e do Biotério Departamental, Soninha, Waldik, Fátima e Eliana pelo auxílio com os documentos e pelo cuidado com os animais.

Aos familiares que mesmo de longe sei que torceram por mim: Giovanni, Paula, André, Arthur, Fernanda, Adriana, Hélder, Vitor, Delaine, Raphael, aos meus tios Maria do Carmo, Luigi, Miguel, Valéria, Pedro e Filomena. Sempre foi um prazer viver perto de vocês e agora de longe sinto saudades!

Aos amigos e familiares que nos auxiliam em espírito. Tenho certeza da presença de vocês em minha vida, espero estar fazendo tudo certo.

E, claro, não poderia faltar, ao CNPq, CAPES, FAPESP e FAEPA pelo suporte financeiro.

ÍNDICE

RESUMO	10
ABSTRACT	11
1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVOS GERAIS	18
2.1 – Objetivo geral	18
2.2 – Objetivos específicos	18
3 MATERIAIS e MÉTODOS	18
3.1- Animais	18
3.2 - Técnica de implante de cânula guia no sistema nervoso central	19
3.3 - Canulação da artéria e veia femorais	20
3.4 - Registro da pressão arterial e frequência cardíaca	21
3.5 - Microinjeção de drogas no córtex pré-frontal medial ventral	21
3.6 - Estimulação barorreflexa	21
3.7-Determinação anatômica dos sítios de injeção das drogas	22
3.8 - Método de análise barorreflexa	22
3.9 - Análise Estatística	23
3.10 – Drogas utilizadas	24
4 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS	24
4.1- Efeitos da administração bilateral do antagonista dos receptores TRPV ₁ , capsazepina, no CPFMV sobre a atividade do barorreflexo em ratos não anestesiados	24
4.2- Efeitos da administração bilateral do antagonista de receptores TRPV ₁ , 6-iodonordiidrocapsaicina (6-ODO), no CPFMV sobre a atividade do barorreflexo em ratos não anestesiados	24
4.3- Efeitos da administração bilateral do agonista de receptores TRPV ₁ , capsaicina, no CPFMV sobre a atividade do barorreflexo em ratos não anestesiados	25
5 RESULTADOS	26
5.1– Efeitos da microinjeção do antagonista de receptores TRPV ₁ , capsazepina, no CPFMV sobre a atividade do barorreflexo	27

5.2– Efeitos da microinjeção do antagonista de receptores TRPV ₁ , 6-iodo, sobre a atividade do barorreflexo	30
5.3– Efeitos da microinjeção do agonista de receptores TRPV ₁ , capsaicina, sobre a atividade do barorreflexo	34
6 DISCUSSÃO	44
7 CONCLUSÕES	49
APÊNDICE	50
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53

RESUMO

O córtex pré-frontal medial (CPFM) é uma estrutura pertencente ao sistema límbico, sendo topograficamente dividido em córtex cíngulo 1, cíngulo 2, pré-límbico (PL), infra-límbico (IL) e dorsopenducular (DP). Sua porção ventral (CPFMv) corresponde ao PL, IL e DP. O PL e o IL são capazes de modular o arco reflexo baroceptor, permitindo ajustes cardiovasculares que ocorrem durante reações de defesa. Trabalhos mostram que a transmissão glutamatérgica do CPFMv é capaz de controlar a atividade barorreflexa através de receptores NMDA. Além disso a liberação de glutamato pode ser modulada por outros neurotransmissores, como os endocanabinóides, que além de ativarem receptores CB₁, também são agonistas de receptores TRPV₁, nos quais facilitam a liberação de glutamato em várias áreas do sistema nervoso central. Portanto, a hipótese deste trabalho é a de que os receptores TRPV₁ presentes no CPFM estariam participando da modulação do barorreflexo. Para testar esta hipótese foram utilizados ratos Wistar, pesando de 240 a 260 gramas. Esses animais foram submetidos a estereotaxia para implante de cânulas guia no CPFMv. Setenta e duas horas depois foi implantado um cateter de polietileno na artéria femoral dos animais, o qual foi conectado ao aparelho de aquisição para monitoração da frequência cardíaca e pressão arterial no dia do teste. Um segundo cateter foi implantado na veia femoral para infusão de drogas vasoativas. Foram usados dois antagonistas de receptores TRPV₁, a capsazepina e o 6-iodonordihidrocapsaicina (6-iodo), além do agonista desses receptores, a capsaicina. A microinjeção da capsazepina no CPFMv reduziu o ganho das curvas de regressão linear dos componentes bradicárdico e taquicárdico do barorreflexo. Os parâmetros da curva sigmoide também foram reduzidos. Posteriormente, a administração de 6-iodo também reduziu o ganho das curvas de regressão linear das respostas bradicárdica e taquicárdica, bem como os parâmetros das curvas de regressão não-linear. Esta droga também foi utilizada para verificar se os receptores TRPV₁ do PL e IL modulam diferentemente a resposta barorreflexa. Foi verificado que ambas as subáreas modulam a atividade barorreflexa da mesma maneira. A capsaicina, quando microinjetada bilateralmente no CPFMv aumentou o ganho das curvas de regressão linear relativas à bradicardia e taquicardia reflexas bem como aumentou os valores dos parâmetros da curva sigmoide. Além disso, o pré-bloqueio dos receptores TRPV₁ do CPFMv com uma dose inefetiva de 6-iodo aboliu o aumento da atividade barorreflexa induzida pela capsaicina. Em um outro grupo de animais foi feito o pré-tratamento do CPFMv com uma dose inefetiva de 6-iodo e cinco minutos depois administrou-se doses maiores de capsaicina. Observou-se um deslocamento da curva dose resposta da capsaicina para a direita, sem alteração do efeito máximo. A conclusão do presente trabalho é a de que os receptores TRPV₁ presentes no CPFMv modulam a resposta do arco reflexo baroceptor.

Palavras-chave: córtex pré-frontal medial ventral; receptores TRPV₁; atividade barorreflexa.

ABSTRACT

Medial prefrontal cortex (MPFC) is a limbic structure, being topographically divided in cingulate cortex 1, cingulate cortex 2, prelimbic (PL), infralimbic (IL) and dorsomedial (DP) cortices. The ventral portion of the MPFC (vMPFC) comprises the IL, PL and DP. The IL and PL regions are able to modulate cardiovascular responses associated with defensive reactions, such as the baroreceptor reflex arc. Some studies have shown that the vMPFC glutamatergic transmission modulates the baroreflex activity, through NMDA receptors. Moreover, the glutamatergic release is controlled by other neurotransmitters, such as the endocannabinoids which are agonists of the TRPV₁ receptors, besides its action on the CB₁ receptors. Furthermore, the TRPV₁ channels facilitate the glutamatergic transmission in several brain areas. Thus, the hypothesis of the present work is that the vMPFC TRPV₁ receptors are involved in the baroreflex modulation. In order to test this assumption, male Wistar rats weighing 240-260 g were used. These animals were submitted to the stereotaxic surgery to implant stainless steel guide cannulas into the vMPFC. Seventy-two hours later, the animals had a polyethylene catheter implanted into the femoral artery which was connected to the acquisition system to blood pressure and heart rate recording in the day-test. A second catheter was implanted into the femoral vein in order to infuse vasoactive drugs. Two TRPV₁ receptors antagonists, 6-iodonordihydrocapsaicin (6-iodo) and capsazepine, besides the TRPV₁ agonist, capsaicin, were used. Capsazepine microinjection into the vMPFC reduced the slope of the linear regression of the bradycardic and tachycardic components of the baroreflex. The sigmoid curve parameters were also reduced. Afterwards, the administration of 6-iodo also decreased the slope of the tachycardic and bradycardic responses, as well as the non-linear regression curve parameters. On the other hand, capsaicin bilaterally microinjected into the vMPFC increased the slope in both bradycardic and tachycardic reflex responses as well as the sigmoid curve parameters. Pre-treatment of the vMPFC TRPV₁ receptors with an ineffective dose of 6-iodo abolished the baroreflex activity increasing induced by capsaicin. In another group of animals, higher doses of capsaicin were administered into the vMPFC 5 minutes after the microinjection of an ineffective dose of 6-iodo. Thus, a dose-response curve right displacement was observed, with no alteration in the maximum effect level of capsaicin. Beyond that, PL and IL TRPV₁ receptors equally modulate baroreceptor reflex arc. In conclusion, the present work shows that vMPFC TRPV₁ receptors are involved in the baroreceptor reflex response.

Keywords: ventral medial prefrontal cortex; TRPV₁ receptors; baroreflex activity.

1 – INTRODUÇÃO

A manutenção de um nível de pressão sanguínea adequado é um processo vital que garante a homeostasia do organismo, propiciando a perfusão sanguínea necessária aos tecidos para suprir as suas necessidades metabólicas e respiratórias. Neste contexto, a pressão arterial (PA) é mantida através de variáveis como o débito cardíaco (DC), frequência cardíaca (FC) e a resistência vascular periférica (RVP), as quais são controladas pelo sistema nervoso autônomo (SNA), por mecanismos locais, hormonais e neurais (Guyenet, 2006). O barorreflexo é um dos mecanismos neurais de ajuste em curto prazo da PA através da modulação de variáveis como a FC (Huang et al., 2010).

O barorreflexo foi primeiramente observado em 1866, quando Bohemian Johann Nepomuk Czermak, comprimindo a margem superior do músculo esternocleidomastóide, observou uma queda da frequência cardíaca. Ele deduziu, erroneamente, que fora a ação mecânica sobre o vago a responsável pelo fenômeno (Haibara, 2000). Na época surgiram vários outros conceitos equivocados sobre o assunto que perduraram durante muito tempo. Somente em 1927, Hering demonstrou de forma convincente que o efeito observado não se devia à manipulação do nervo vago, mas sim à estimulação mecânica das artérias carótidas, que resultavam nas respostas hipotensoras e bradicárdicas (Haibara, 2000). Elie Fadeevich Cyon e Carl Ludwig descreveram posteriormente o barorreflexo aórtico (Haibara, 2000). Hoje se sabe que o reflexo barorreceptor é um dos componentes do controle “momento a momento” da PA, participando na modulação da FC, do DC e da RVP (Fazan, 2002).

Os barorreceptores são terminações nervosas encontradas no seio carotídeo (SC) e no arco aórtico (AA) (Papademetriou et al., 2011). Estes receptores são capazes de responder ao estiramento arterial, pois possuem canais iônicos sensíveis a estímulos mecânicos, conhecidos como “degenerin/epithelial Na⁺ channels” (DEG/ENaC). Estes canais são permeáveis a íons, permitindo o influxo de sódio e cálcio nas terminações nervosas, causando a despolarização da membrana (Drummond et al., 2001, Papademetriou et al., 2011).

Quando a PA é elevada, acontece um aumento na distensão da parede dos vasos do SC e AA, o que promove ativação dos canais DEG/ENaC e a geração de potenciais de ação. Os impulsos nervosos são então conduzidos pelos nervos sinusal e depressor aórtico até uma região bulbar denominada núcleo do trato solitário (NTS) (Papademetriou et al., 2011). Este, por sua vez, estimula os núcleos ambíguo e dorsal do vago. Nestes locais existem corpos celulares de neurônios pré-ganglionares parassimpáticos. O NTS também inerva neurônios GABAérgicos do bulbo ventrolateral caudal (CVLM). A estimulação desta área induz a liberação de ácido gama-aminobutírico (GABA), um neurotransmissor inibitório, no bulbo ventrolateral rostral (RVLM), o qual envia projeções para neurônios pré-ganglionares simpáticos (Averill and Diz, 2000). Consequentemente ocorre a redução da atividade simpática e aumento do tônus vagal sobre o coração e vasos sanguíneos, reduzindo a FC, o retorno venoso e aumentando a capacitância venosa, contribuindo para a diminuição dos valores de PA (Michelini and Morris, 1999).

Em situação oposta, quando a PA é reduzida, os mecanorreceptores arteriais diminuem a frequência de disparo de potenciais de ação ao NTS. Consequentemente, menor será o estímulo dos neurônios pré-ganglionares parassimpáticos dos núcleos ambíguo e dorsal do vago, assim como a liberação de GABA no RVLM. Nesta situação há aumento do tônus simpático, e diminuição da atividade parassimpática. O resultado será o aumento da FC e da RVP, elevando os níveis de PA (Albaghdadi, 2007).

Em roedores o córtex pré-frontal (CPF) tem sido apontado como um dos centros de regulação do sistema cardiovascular (Verberne and Owens, 1998, Resstel and Correa, 2006b). O CPF pode ser dividido em córtex pré-frontal lateral (CPFL) e córtex pré-frontal medial (CPFM). O CPFM é subdividido em córtex pré-límbico (PL), infra-límbico (IL), córtex cíngulo (CC) e dorso-penducular (DP) (Leonard, 1969, Groenewegen, 1988). O PL, IL e DP, em conjunto, formam a porção ventral do córtex pré-frontal medial (vCPFM) (Neafsey, 1990).

Está descrito que o IL possui extensas projeções para centros neurais envolvidos com o controle autonômico, como o NTS, hipotálamo e amígdala (Iwata et al., 1986, Fisk and Wyss, 2000, Gabbott et al., 2003). Tais áreas poderiam servir de substrato neuroanatômico para as respostas

cardiovasculares geradas no vCPFM (Owens et al., 1999, Resstel et al., 2006). Owens e colaboradores, em experimentos com estimulação elétrica do vCPFM de ratos, demonstraram um aumento da expressão de proteína c-fos, um marcador de atividade neuronal, no NTS. Além disso, a inibição do NTS atenuou as respostas depressoras resultantes da estimulação elétrica do vCPFM (Owens et al., 1999, Owens and Verberne, 2000), sugerindo, portanto, que o vCPFM possui projeções para áreas bulbares que estão relacionadas com o controle cardiovascular (Owens et al., 1999).

Verberne e colaboradores, realizando lesão química do CPFM de ratos não anestesiados observaram uma redução na atividade do barorreflexo (Verberne et al., 1987). Mais recentemente, Resstel e colaboradores descreveram que a inibição local da neurotransmissão do vCPFM afeta o componente parassimpático do barorreflexo em ratos não anestesiados (Resstel et al., 2004). Esses resultados mostram o envolvimento do vCPFM na modulação da atividade barorreflexa.

Diversos neurotransmissores presentes no vCPFM estão envolvidos na modulação das funções cardiovasculares, dentre eles a noradrenalina (NA), a acetilcolina (ACh) e o L-glutamato (L-glu). A microinjeção de ACh no vCPFM, desencadeia respostas depressoras em ratos não anestesiados e anestesiados (Crippa et al., 1999). Por outro lado, a microinjeção de NA provoca aumentos da pressão arterial em ratos não anestesiados, tendo um efeito contrário em ratos anestesiados (Fernandes et al., 2003). Apesar desses dois neurotransmissores terem influência sobre a atividade cardiovascular de ratos, seu envolvimento com a modulação da atividade do baroreflexo no vCPFM não foi evidenciada (Resstel et al., 2005)

O L-glu é o principal neurotransmissor excitatório do SNC, estando envolvido na modulação de funções cardiovasculares, incluindo a atividade do barorreflexo (Gigg et al., 1994, Resstel and Correa, 2006c). Vários estudos demonstram que a injeção de L-glu no vCPFM de ratos anestesiados resulta em uma redução da PA sem alteração da frequência cardíaca (Verberne, 1996, Fisk and Wyss, 1997, Owens and Verberne, 2001). Porém, na ausência de anestesia, a microinjeção de L-glu no vCPFM de ratos resultou em respostas pressoras e taquicárdicas (Resstel and Correa, 2005). Essas respostas cardiovasculares provocadas pelo L-glu em animais não anestesiados eram

inibidas pela administração prévia de um antagonista seletivo para receptores glutamatérgicos NMDA no vCPFM (Resstel and Correa, 2006a). Esses resultados mostram que o sistema glutamatérgico presente no vCPFM é capaz de influenciar a atividade do sistema cardiovascular em particular através de receptores NMDA.

Com base nos achados descritos acima, foi investigado se o sistema glutamatérgico presente no vCPFM, em particular os receptores NMDA, poderia estar envolvido com a influência dessa estrutura cortical com a atividade do barorreflexo. Assim, foram realizados experimentos onde os receptores NMDA no vCPFM foram antagonizados em ratos submetidos ao estímulo do barorreflexo. Os resultados obtidos mostraram que receptores NMDA presentes no vCPFM apresenta um papel facilitatório sobre o componente bradicárdico do barorreflexo (Resstel et al., 2006).

A neurotransmissão glutamatérgica pode ser modulada por outros neurotransmissores, como os endocanabinóides, via receptores CB₁ (Hampson et al., 1998). Foi demonstrado em estudos de eletrofisiologia que o bloqueio de receptores CB₁ no vCPFM aumenta a liberação de L-glu, enquanto a ativação destes receptores reduz a sua liberação (Auclair et al., 2000). Este efeito se encontra ausente em camundongos nocaute para receptores CB₁ (Gerdeman et al., 2002), apontando o papel neuromodulatório do sistema endocanabinóide sobre a liberação sináptica de L-glu, em particular no vCPFM.

Com base nestas informações, trabalhos do nosso laboratório mostram a participação do sistema endocanabinóide presente no CPFMv na modulação do barorreflexo. A administração de AM251, um antagonista de receptores CB₁, nesta área aumentou o ganho da atividade barorreflexa, enquanto o aumento de endocanabinóides na fenda sináptica promovidos pela microinjeção de AM404 e URB597 (um inibidor do transportador de endocanabinóides e um inibidor da enzima responsável pelo seu metabolismo, respectivamente) teve efeito oposto (Ferreira-Junior et al., 2011).

Os dois principais agonistas endógenos para o receptor CB₁ são a anandamida (AEA) e o 2-araquidonoilglicerol (2-AG), que são derivados de ácidos graxos, sintetizados a partir da fosfatidiletanolamina (Piomelli, 2003). Interessantemente, estes dois agonistas são capazes de produzir efeitos farmacológicos no SNC de camundongos nocaute para receptor CB₁, indicando

a possibilidade desses agonistas ativarem outras classes de receptores (Breivogel et al., 2001, Offertaler et al., 2003).

O receptor não canabinóide melhor estabelecido para ação da AEA é o receptor vanilóide de potencial transitório tipo 1, TRPV₁ (*transient receptor potential vanilloid type 1*) (De Petrocellis and Di Marzo, 2009). Este é um receptor ionotrópico não seletivo para cátions pertencendo a uma grande família de proteínas de seis domínios transmembrana (Zygmunt et al., 1999, Owsianik et al., 2006). Sua ativação se dá por calor nocivo (temperatura maior que 42 ° C); pH baixo (valores menores do que 6); além da ação direta do agonista capsaicina, uma substância encontrada naturalmente na pimenta (De Petrocellis and Di Marzo, 2009).

Os receptores CB₁ e TRPV₁ são co-expressos em várias partes do SNC (Vaughan et al., 2000). O primeiro reduz a atividade neuronal em nível pré-sináptico, pois é capaz de ativar um proteína G inibitória (G_i), a qual reduz a formação de AMP_c intracelular pela inibição da enzima adenilato ciclase (Howlett and Fleming, 1984). Enquanto isso, o segundo favorece a despolarização de neurônios pós-sinápticos na substância cinzenta periaquedutal (Vaughan et al., 2000, Cristino et al., 2006, Xing and Li, 2007), bem como a liberação de glutamato no estriado (Musella et al., 2009), mostrando a existência de uma função oposta entre esses receptores, apesar de serem ativados pelas mesmas substâncias endógenas.

Inicialmente não foi demonstrada a presença do receptor TRPV₁ no SNC, sendo que seu sítio primário seriam as fibras C aferentes, que são neurônios nociceptivos (Porszasz and Jancso, 1959). Embora a maior parte da atenção tenha sido dada aos neurônios sensoriais, atualmente é bem descrito que a capsaicina atua em várias regiões do SNC (Marinelli et al., 2002). Foi demonstrado, através de estudos eletrofisiológicos, que a capsaicina aumenta a taxa de disparo neuronal pela liberação de glutamato no hipotálamo de ratos, além de facilitar o potencial pós-sináptico excitatório (PPSE) na substância negra (Sasamura et al., 1998, Marinelli et al., 2003), sugerindo que os receptores TRPV₁ são capazes de participar de processos neuromodulatórios em sinapses do SNC.

Em 2005, Tóth e colaboradores, avaliaram a distribuição de receptores TRPV₁ no encéfalo de ratos. Esses pesquisadores encontraram altos níveis de

receptores TRPV₁ principalmente no hipocampo e no córtex. Além disso, descreveram que os receptores TRPV₁ se encontram principalmente, mas não exclusivamente, na membrana pós-sináptica dos neurônios destas regiões (Toth et al., 2005).

Aguiar e colaboradores mostraram o envolvimento dos receptores TRPV₁ do vCPFM na modulação de comportamentos de ansiedade em roedores, uma vez que o bloqueio de tais receptores pela capsazepina induziu um comportamento do tipo ansiolítico em ratos submetidos ao labirinto em cruz elevado (Aguiar et al., 2009). Além disso, a aplicação de metanandamida, um agonista não seletivo de receptores CB₁ e TRPV₁ (Ralevic et al., 2000), em altas doses no vCPFM resultou em um comportamento do tipo ansiogênico em roedores, associado à ativação dos canais TRPV₁ (Rubino et al., 2008). Adicionalmente, foi demonstrada a participação destes receptores presentes nesta área em processos nociceptivos (de Novellis et al., 2011, Giordano et al., 2011). Entretanto, o seu papel na modulação cardiovascular nesta estrutura cortical ainda não foi evidenciado.

Considerando então, que o vCPFM é capaz de modular a atividade do barorreflexo (Resstel et al., 2004); que existem receptores NMDA no vCPFM (Gigg et al., 1994) os quais exercem influência sobre a atividade barorreflexa (Resstel and Correa, 2006c); que existe uma grande quantidade de receptores TRPV₁ em neurônios desta área, em nível pré e pós-sináptico (Toth et al., 2005) e que estes receptores possuem funções neuromodulatórias sobre a liberação de L-glu em outras partes do SNC (Sasamura et al., 1998, Marinelli et al., 2003), a hipótese deste trabalho é a de que os receptores TRPV₁ presentes no vCPFM estão envolvidos no controle da atividade do barorreflexo.

2 – OBJETIVOS

2.1 - Objetivo geral

Avaliar a participação dos receptores TRPV₁ presentes no córtex pré-frontal medial na modulação da atividade do barorreflexo.

2.2 - Objetivos específicos

2.2.1 – Avaliar a participação de receptores TRPV₁ do vCPFM na modulação da atividade do barorreflexo, através do antagonismo dos mesmos.

2.2.2 – Verificar se a ativação dos receptores TRPV₁ do vCPFM altera a atividade do barorreflexo.

2.2.3 – Verificar se receptores TRPV₁ presentes nas sub-áreas do vCPFM, PL e o IL, modulam diferentemente a atividade do barorreflexo.

3 – MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - Animais

Foram utilizados ratos Wistar, com peso corporal variando entre 230-270g. Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central do Campus da USP de Ribeirão Preto, mantidos em caixas coletivas, com livre acesso a água e comida, e submetidos a um ciclo claro-escuro de 12 horas (12h claro/ 12h escuro).

Todos os protocolos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (processo: 172/2011).

3.2 - Técnica de implante de cânula guia no sistema nervoso central

Os animais foram anestesiados com tribromoetanol (Aldrich Chemical Co. Inc.) na dose de 250 mg/kg por via intraperitoneal (i.p.). Após tricotomia da cabeça do rato, o animal foi imobilizado em um estereotáxico (Stoelting, EUA). A assepsia do campo cirúrgico foi feita previamente com álcool a 70%. Para redução do sangramento durante a cirurgia, foram injetados (via subcutânea) 0,3 ml de solução de lidocaína com vasoconstritor (3% de fenilefrina, Harvey Química Farmacêutica Ind. e Comércio Ltda, Catanduva, SP). A calota craniana foi exposta por meio de uma incisão na pele de aproximadamente 1,5 cm, afastando-se completamente o periósteo. A limpeza da região foi feita utilizando-se água oxigenada a 10% e solução salina.

As coordenadas estereotáxicas para implantação bilateral das cânulas no vCPFM foram coletadas do *The Rat Brain Atlas* de Paxinos e Watson (6ª edição), e ajustadas ao peso corporal do animal.

Córtex pré-frontal medial ventral

-Córtex pré-límbico:

Ântero-posterior: +3,4 mm em relação ao bregma;

Lateral: + 2,6 mm a partir da sutura média;

Vertical: -3,2 mm em relação à cúpula do crânio;

Inclinação: 24°

Incisivo = -3,2.

-Córtex infra-límbico:

Ântero-posterior: +3,4 mm em relação ao bregma;

Lateral: + 2,6 mm a partir da sutura média;

Vertical: -3,3 mm em relação à cúpula do crânio;

Inclinação: 24°

Incisivo = -3,2

Após a calota craniana estar exposta e limpa, dois orifícios foram feitos na região, com auxílio de broca odontológica, por onde foram introduzidas cânulas de aço inoxidável, confeccionadas a partir de agulhas hipodérmicas (0,6 x 25 mm BD PrecisionGlide). As cânulas foram fixadas ao osso do crânio com uma resina acrílica autopolimerizável (Simplex, DFL, Ind. Com., Rio de Janeiro, RJ), sendo que um parafuso previamente fixado ao osso do crânio foi utilizado para dar sustentação à resina. Para evitar a obstrução da cânula durante o período de recuperação do animal, foi introduzido na mesma um mandril de aço inoxidável de 0,3 mm de diâmetro. Como medida profilática, ao final da cirurgia, o animal recebeu 0,2 mL de um poli-antibiótico veterinário com estreptomicina e penicilina (Fontoura-Wyeth, São Paulo, Brasil) por via intramuscular, além do anti-inflamatório não-esteroidal flunixin meglumine (2,5 mg/kg, via subcutânea - Banamine, Schering Plough, Brazil).

3.3 - Canulação da artéria e veia femorais

Setenta e duas horas após a implantação das cânulas guias no SNC dos animais foram anestesiados com tribromoetanol (250 mg/kg, i.p.) e submetidos a posterior tricotomia da região abdominal. Com os animais

anestesiados, a artéria e a veia femoral foram dissecadas para que cateteres de polietileno pudessem ser introduzidos, respectivamente, até a artéria aorta abdominal inferior e veia cava.

Os cateteres foram confeccionados a partir de tubos de polietileno PE-10 (4-5 cm) soldados a segmentos de polietileno PE-50 (12-13 cm), previamente preenchidos por solução salina e anticoagulante (15 U/mL de heparina em solução salina), e obstruídos com pino de metal. Após implantação dos cateteres, os mesmos foram exteriorizados na região dorsal do animal e fixados à pele por sutura cirúrgica.

O cateter arterial foi utilizado para registro da pressão arterial e o cateter venoso para injeção de drogas. Os experimentos foram realizados pelo menos 24h após o procedimento cirúrgico para implantação dos cateteres, permitindo a recuperação dos animais. Como medida profilática, ao final da cirurgia os animais receberam o anti-inflamatório não-esteroidal flunixin meglumine (2,5 mg/kg, via subcutânea- Banamine, Schering Plough, Brazil). Durante o período pós-operatório até a realização dos experimentos, os animais foram mantidos em caixas individuais.

3.4 - Registro da pressão arterial e frequência cardíaca

Antes do início dos registros, 0,1 ml de solução salina com heparina (15 U/ml) foi injetada no interior dos cateteres para retirar uma possível obstrução. O cateter implantado na artéria femoral foi conectado a um transdutor de pressão (LabChart, EUA) por um segmento de polietileno PE-50. A pressão arterial pulsátil foi registrada usando um pré-amplificador (ML870, LabChart, EUA) e uma placa de aquisição de dados (PowerLab, AD Instruments, EUA) conectada a um computador. A pressão arterial média e a frequência cardíaca foram derivadas da pressão arterial pulsátil e processadas on-line.

3.5 - Microinjeção de drogas no córtex pré-frontal medial ventral

A capsazepina e a capsaicina foram dissolvidos em solução de dimetilsulfóxido (DMSO) 10% em salina (0,9% NaCl); o 6-iodo foi dissolvido em DMSO 100%. As agulhas injetoras (33 G, Small Parts, EUA) utilizadas para microinjeção das drogas, confeccionadas 1 mm maior que a cânula guia, foram conectadas a uma seringa de 2 μ L (Hamilton, EUA), através de um tubo de polietileno (PE-10). As drogas foram injetadas no volume de 200 nL.

3.6 - Estimulação barorreflexa

A estimulação barorreflexa foi feita pela infusão i.v. de fenilefrina (50 μ g/kg), que causou efeito pressor, ou de nitroprussiato de sódio (2,5 mg/0,05 mL), que causou efeito depressor, utilizando-se uma bomba de infusão (K.D. Scientific, EUA) (Resstel et al., 2004, Crestani et al., 2009). O cateter da veia femoral foi conectado através de um tubo de polietileno (PE-50) a uma seringa de 1 mL preenchida com a solução vasoativa. A seringa, por sua vez, foi montada na bomba de infusão, a qual foi programada para uma velocidade de infusão de 0,80 μ L/min/kg para a fenilefrina e 180 μ L/min/kg para o nitroprussiato de sódio. Desta forma, foi possível obter variações na pressão arterial média de ± 50 mmHg em um período de 40 a 50 segundos de infusão. A fenilefrina e o nitroprussiato de sódio foram dissolvidos em salina estéril a 0,9%.

3.7 - Determinação anatômica dos sítios de injeção das drogas

Ao final de cada experimento, os animais foram anestesiados com uretana na dose de 1,2 g/kg intraperitoneal. O corante azul de Evans a 1% foi injetado no mesmo local da microinjeção das drogas. A injeção do corante foi feita no mesmo volume e utilizando a mesma metodologia da microinjeção das drogas no córtex pré-frontal medial ventral. Após esse processo, tórax dos ratos foi aberto para exposição do coração. Para facilitar a perfusão cerebral, a aorta descendente foi bloqueada com uma pinça hemostática. Uma incisão foi feita na aurícula direita para o escoamento do sangue e do perfusado, que foi

injetado com o auxílio de uma agulha introduzida no ventrículo esquerdo. A perfusão foi realizada inicialmente com 20 mL de solução fisiológica de NaCl 0,9%, seguida por 20 mL de solução tamponada de formalina 10%. O cérebro foi retirado da caixa craniana e pós-fixado na respectiva solução de perfusão. Posteriormente, o cérebro foi seccionado com o auxílio de um criostato, sendo feitas várias secções na região do CPFM que foram coradas com vermelho neutro a 1% e analisadas utilizando-se Atlas de Paxinos e Watson (2007) como referência (Paxinos e Watson, 2007).

3.8 - Método de análise barorreflexa

Após a infusão dos agentes vasoativos os dados registrados (PAM e FC) foram analisados para a observação da atividade do barorreflexo. A análise foi feita relacionando os pontos da variação de PAM com a variação da FC reflexa correspondente. Utilizando os pontos obtidos da correlação na variação de PA e FC durante as infusões de fenilefrina ou de nitroprussiato de sódio (NPS) foram traçadas curvas sigmóides. A avaliação de cada curva sigmoide foi feita com base nos parâmetros mostrados na Figura 1.

Figura 1: Parâmetros da curva sigmoide do barorreflexo relacionando frequência cardíaca (FC) e pressão arterial média (PAM). P1 (bpm), platô mínimo da frequência cardíaca; P2(bpm), platô máximo da frequência cardíaca; ΔP (bpm), diferença entre P1 e P2; G, ganho (inclinação da curva); PA₅₀(mmHg), média da pressão arterial quando a frequência cardíaca variar 50%.

Para análise separada das respostas taquicárdicas e bradicárdicas, foi feita a correlação entre as alterações de PAM para 10, 20, 30 e 40 mmHg e os respectivos valores de FC. Esses valores foram plotados para criar curvas

de regressão linear antes, 10 minutos e 60 minutos depois da administração das drogas no CPFMV de cada animal. Posteriormente, as inclinações obtidas antes e após os tratamentos foram comparadas.

3.9 - Análise Estatística

Os dados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). As análises dos dados foram realizadas através do programa PRISM 5.0 (GraphPad, EUA). Os valores basais de PAM e FC foram comparados utilizando o teste *t* de Student pareado (antes do tratamento vs. após tratamento). Os parâmetros barorreflexos analisados antes, 10 minutos e 60 minutos depois da administração das drogas no vCPFM, foram comparados por meio de análise de variância (ANOVA) de uma via seguido de pós-teste de Dunnett's. Todos os testes foram realizados assumindo-se o nível de significância de $P < 0,05$.

Os valores da concentração-efetiva média (EC_{50}) e o efeito máximo provenientes das curvas dose-resposta e das curvas de deslocamento foram comparados utilizando-se o teste *t* de Student pareado (Capsaicina vs. Capsaicina + 6-ODO). Nestas curvas, os valores da dose de capsaicina, antes e após o tratamento com 6-ODO foram relacionados à resposta por meio da correlação de Pearson.

3.10 - Drogas utilizadas

- Capsazepina (TOCRIS, Ellisville, MO, USA).
- 6-iodonordiidrocapsaicina (TOCRIS, Ellisville, MO, USA).
- Capsaicina (TOCRIS, Ellisville, MO, USA).
- Fenilefrina (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA).
- Nitroprussiato de sódio (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA).
- Tribromoetanol (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA).
- Uretana (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA).
- Pentabiótico veterinário (Fort Dodge, Campinas, SP, Brasil).
- Flunixin meglumina (Schering-Plough, Rio de Janeiro, RJ, Brasil).
- Heparina sódica (Cristália, Itapira, SP, Brasil).
- Cloreto de sódio estéril 0,9% (Samtec, Ribeirão Preto, SP, Brasil).

4 – PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

4.1 - Efeitos da administração bilateral do antagonista dos receptores TRPV₁, capsazepina, no CPF_{Mv} sobre a atividade do barorreflexo em ratos não anestesiados.

A capsazepina (antagonista dos receptores TRPV₁) foi administrada nas doses de 1, 10 e 100 nmol/200 nL (Aguiar et al., 2009), bilateralmente no vCPF_M, com objetivo de avaliar a participação de receptores TRPV₁ presentes nessa área na modulação do barorreflexo.

4.2 - Efeitos da administração bilateral do antagonista de receptores TRPV₁, 6-iodonordiidrocapsaicina (6-iodo), no CPF_{Mv} sobre a atividade do barorreflexo em ratos não anestesiados.

O 6-iodo (antagonista seletivo dos receptores TRPV₁) foi administrado nas doses de 0,3; 3 e 30 nmol/200 nL (Aguiar, 2009) bilateralmente no vCPF_M com o objetivo de demonstrar e corroborar a participação de receptores TRPV₁ presentes nessa área na modulação do barorreflexo.

Além disso, uma mesma dose efetiva de 6-iodo foi administrada no PL e IL, com o intuito de se verificar se os receptores TRPV₁ presentes nas duas subáreas modulam diferentemente a atividade do barorreflexo.

4.3 - Efeitos da administração bilateral do agonista de receptores TRPV₁, capsaicina, no CPF_{Mv} sobre a atividade do barorreflexo em ratos não anestesiados.

A capsaicina (agonista dos receptores TRPV₁) foi administrada nas doses 0,01; 0,1 e 1 nmol/ 200 nL (Terzian et al., 2009) bilateralmente no vCPF_M, com o objetivo de avaliar se a ativação dos receptores TRPV₁, nessa área, altera a atividade do barorreflexo.

Posteriormente, foi administrado uma dose de capsaicina bilateralmente, no vCPF_M após a administração de 6-iodo, em dose inefetiva,

para confirmar se a alteração da atividade do barorreflexo causada pelo agonista envolve receptores TRPV₁.

Adicionalmente, foi feito o tratamento do CPFMv com capsaicina nas doses 3 e 10 nmol/200nL após o bloqueio dos receptores da área com 0,3 nmol/200nL de 6-ODO.

5 – RESULTADOS

A Figura 2 mostra a fotomicrografia de um corte coronal do encéfalo de ratos, com cânulas-guia implantadas no vCPFM. As representações diagramáticas correspondem a todos os animais utilizados neste estudo, evidenciando os sítios de microinjeção do veículo e das drogas-teste, além dos sítios de injeção em estruturas adjacentes ao vCPFM

Figura 2: Representações diagramáticas de todos os animais utilizados neste estudo com os sítios de microinjeção do veículo, capsazepina, capsaicina e 6-iodo no córtex pré-límbico (PL) e córtex infra-límbico (IL) (círculos pretos), como também de 6-iodo em estruturas adjacentes ao CPFMv (círculos cinzas), com base no atlas do cérebro de ratos de Paxinos e Watson (2007). Fotomicrografia de um corte coronal do encéfalo de rato com implante bilateral de cânulas guia no CPFMv.

5.1 – Efeitos da microinjeção do veículo, DMSO 10%, no CPFMV sobre a atividade do barorreflexo

A microinjeção do veículo DMSO 10% no CPFMV não alterou os valores basais da FC (antes= 376 ± 16 ; depois= 373 ± 15 bpm; $t=0,18$; $P>0,05$) ou da PA (antes= $103 \pm 2,56$; depois= $101 \pm 2,59$ mmHg; $t=0,49$; $P>0,05$). As respostas taquicárdica (antes= $-1,60 \pm 0,09$ e depois= $-1,61 \pm 0,09$; $F_{(2,14)}= 0,34$; $P>0,05$) e bradicárdica (antes= $-1,82 \pm 0,16$ e depois= $-1,72 \pm 0,13$; $F_{(2,14)}= 0,41$; $P>0,05$) não sofreram alteração (Figura 3). Os parâmetros da curva sigmoide também não foram afetados (Tabela 6).

Figura 3: (Superior) a e b - Curvas de regressão linear correlacionando as respostas de ΔPAM e ΔFC antes, 10 min e 60 min após a microinjeção bilateral de DMSO 10% ($n=5$) no CPFMV e 6-iodo 3 nmol/200nL ($n=5$) nas adjacências do CPFMV, respectivamente. Valores de correlação r^2 para as curvas de regressão bradicárdica e taquicárdica foram 0,87 e 0,94 para os dados gerados antes; 0,90 e 0,95 para os dados gerados após 10 min; 0,89 e 0,96 para os dados gerados 60 min após a microinjeção de DMSO 10% no CPFMV e 6-iodo 3 nmol/200nL nas adjacências do CPFMV, respectivamente.

(Inferior) a e b - Curvas sigmóides correlacionando pressão arterial média (ΔMAP) e frequência cardíaca (ΔFC) antes ($r^2 = 0,96$; 0,93), 10 min ($r^2 = 0,96$; 0,94) e 60 min ($r^2 = 0,95$; 0,91) após a microinjeção bilateral de DMSO 10% ($n=5$) e 6-iodo 3 nmol/200nL ($n=5$) nas adjacências do CPFMV, respectivamente. Os símbolos na curva sigmoide representa a PA_{50} .

5.2 – Efeitos da microinjeção do antagonista de receptores TRPV₁, capsazepina, no CPFMV sobre a atividade do barorreflexo

A capsazepina, microinjetada bilateralmente na dose de 1nmol/200nL (n=6) não causou alteração dos valores basais de PAM (antes= $101 \pm 2,81$; depois= $102 \pm 2,10$ mmHg; $t=0,43$; $P>0,05$) ou FC (antes= $367 \pm 4,2$; depois= $366 \pm 3,6$ bpm; $t= 0,44$; $P>0,05$). Além disso, não houve alteração significativa da inclinação das curvas de regressão linear, das respostas bradicárdicas (antes= $-1,66 \pm 0,23$ e depois= $-1,34 \pm 0,24$; $F_{(2,17)}= 0,82$; $P>0,05$) e taquicárdicas (antes= $-2,01 \pm 0,45$; depois= $-2,01 \pm 0,24$; $F_{(2,17)}= 0,57$; $P>0,05$) (Figura 3). Os valores dos parâmetros das curvas de regressão não linear, como ganho (G), platô inferior (P1), platô superior (P2) , variação entres os platôs (ΔP) , PA_{50} não foram alterados pela droga, nesta dose (Tabela 1).

Quando administrada na dose de 10 nmol/200nL (n=6) no CPFMV, a capsazepina não alterou os valores basais de PAM (antes= $102 \pm 2,6$; depois= $103 \pm 1,7$ mmHg; $t= 0,07$; $P>0,05$) ou FC (antes= 360 ± 10 ; depois= 358 ± 10 bpm; $t= 0,68$; $p>0,05$). A inclinação das curvas de regressão linear dos componentes bradicárdico (antes= $-2,32 \pm 0,08$; depois= $-1,20 \pm 0,19$; $F_{(2,17)}= 41,00$; $P<0,05$) e taquicárdico (antes= $-2,14 \pm 0,1$; depois= $-1,44 \pm 0,10$; $F_{(2,17)}= 41,86$; $P<0,05$) foi significativamente reduzida (Figura 4). Além disso, excetuando-se a PA_{50} , houve um aumento significativo dos valores dos parâmetros da curva sigmóide, tais como a inclinação (G), platô inferior (P1), platô superior (P2), bem como da variação entre estes platôs (ΔP) (Tabela 1).

A microinjeção de capsazepina na dose de 100 nmol/200nL (n=6) no CPFMV, novamente não alterou os valores basais de PAM (antes= $100 \pm 1,9$; depois= 101 ± 2 mmHg; $t=0,35$; $P>0,05$) ou FC (antes= 361 ± 3 ; depois= 362 ± 3 bpm; $t= 0,08$; $P>0,05$). A inclinação das curvas de regressão linear das respostas bradicárdicas (antes= $-2,26 \pm 0,17$; depois= $-1,53 \pm 0,16$; $F_{(2,17)}= 5,08$; $P<0,05$) e taquicárdicas (antes= $-2,24 \pm 0,16$; depois= $-1,57 \pm 0,22$; $F_{(2,17)}= 4,54$; $P<0,05$) também foi reduzida (Figura 4). Os valores dos parâmetros das curvas de regressão não-linear (G, P1, P2 e ΔP) também foram reduzidos (Tabela 1).

A inclinação das curvas de regressão linear após 60 minutos da microinjeção de capsazepina nas doses de 10 nmol/200nL (resposta taquicárdica: antes= $-2,14 \pm 0,10$; 60 minutos= $-2,16 \pm 0,12$; resposta bradicárdica: antes= $-2,32 \pm 0,08$; 60 min= $-2,30 \pm 0,11$; $F_{(2,17)} = 41,86$; $P > 0,05$) e 100 nmol/200nL (resposta taquicárdica: antes= $-2,24 \pm 0,16$; 60 minutos= $-2,36 \pm 0,10$; resposta bradicárdica: antes= $-2,26 \pm 0,17$; 60 min= $-2,12 \pm 0,13$; $F_{(2,17)} = 4,54$; $P > 0,05$) (Figura 4), bem como os parâmetros da curva sigmoide (Tabela 1), voltaram aos valores normais.

Figura 4: (Superior) a, b e c - Curvas de regressão linear correlacionando as respostas de ΔPAM e ΔFC antes, 10 min e 60 min após a microinjeção bilateral de capsazepina no CPFMV. Valores de correlação r^2 para as curvas de regressão bradicárdica foram 0.70, 0.97 e 0.89 para os dados gerados antes; 0.59, 0.64 e 0.80 para os dados gerados após 10 min e 0.77, 0.95 e 0.92 para os dados gerados 60 min após a microinjeção de capsazepina 1, 10 ou 100 nmol no CPFMV. . Valores de correlação r^2 para as curvas de regressão taquicárdica foram 0.58, 0.90, 0.96 para os dados gerados antes, 0.85, 0.91 e 0.71 para os dados gerados após 10 min e 0.73, 0.93 e 0.96 para os dados gerados 60 min após a microinjeção de capsazepina no CPFMV. **(Inferior) a, b e c** - Curvas sigmóides correlacionando pressão arterial média (ΔMAP) e frequência cardíaca (ΔFC) antes ($r^2 = 0.91$; 0.97; 0.96), 10 min ($r^2 = 0.93$; 0.92; 0.91) e 60 min ($r^2 = 0.87$; 0.96; 0.97) após a microinjeção bilateral de capsazepina 1 nmol ($n = 6$), 10 nmol ($n = 6$) ou 100 pmol ($n = 6$) no CPFMV. Os símbolos nas curvas sigomoides representam a PA_{50} .

5.3 – Efeitos da microinjeção do antagonista de receptores TRPV₁, 6- IODO, sobre a atividade do barorreflexo

A administração de 0,3 nmol/200nL de 6- IODO (n=6) no CPFMV não modificou os níveis basais de PAM (antes= $101 \pm 6,7$; depois= $103 \pm 3,9$ mmHg; $t = 0,52$; $P > 0,05$) ou FC (antes= 381 ± 9 ; depois= 381 ± 10 bpm; $t = 0,02$; $P > 0,05$). A inclinação das curvas de regressão linear correspondentes às respostas bradicárdicas (antes= $-1,58 \pm 0,16$; depois= $-1,68 \pm 0,13$; $F_{(2,17)} = 0,28$; $P > 0,05$) e taquicárdicas reflexas (antes= $-1,74 \pm 0,13$; depois= $-1,53 \pm 0,12$; $F_{(2,17)} = 1,59$; $P > 0,05$) não foram alteradas (Figura 5). Além disso, nenhum dos parâmetros da curva sigmoide (G, P1, P2, ΔP , PA₅₀) foi afetado pela droga, nesta dose, sendo considerada inefetiva (Tabela 2).

A dose intermediária de 6- IODO (3 nmol/200nL, n=6) também não alterou os valores basais de PAM (antes= $101 \pm 2,9$; depois= $104 \pm 2,1$; $t = 0,74$ $P > 0,05$) e FC (antes= 378 ± 11 ; depois= 379 ± 10 bpm; $t = 0,08$; $P > 0,05$). A inclinação das curvas de regressão linear dos componentes bradicárdico (antes= $-1,87 \pm 0,11$; depois= $-1,16 \pm 0,12$; $F_{(2,17)} = 14,96$; $P < 0,05$) e taquicárdico (antes= $-1,97 \pm 0,11$; depois= $-1,45 \pm 0,082$; $F_{(2,17)} = 8,96$; $P < 0,05$) do barorreflexo foram reduzidas (Figura 5). A maioria dos parâmetros da curva de regressão não linear (G, P1, P2, ΔP) também foram reduzidos (Tabela 2).

A microinjeção de 6- IODO na dose de 30 nmol/200nL (n=7) no CPFMV, não foi capaz de alterar os valores basais de PAM (antes= $104 \pm 2,4$; depois= $104 \pm 1,6$ mmHg; $t = 0,30$; $P > 0,05$) ou FC (antes= 372 ± 6 ; depois= 373 ± 15 bpm; $t = 0,26$; $P > 0,05$). A inclinação das curvas de regressão linear referentes à bradicardia reflexa (antes= $-2,66 \pm 0,14$; depois= $-1,43 \pm 0,13$; $F_{(2,20)} = 15,06$; $P < 0,05$) e taquicardia reflexa (antes= $-2,17 \pm 0,13$; depois= $-1,49 \pm 0,12$; $F_{(2,20)} = 12,13$; $P < 0,05$) foram significativamente reduzidas (Figura 5). Os parâmetros da curva sigmoide, exceto a PA₅₀, também foram reduzidos (Tabela 2).

A inclinação das curvas de regressão linear após 60 minutos da microinjeção de 6- IODO nas doses de 3 nmol/200nL (resposta taquicárdica: antes= $-1,97 \pm 0,11$; 60 minutos= $-1,93 \pm 0,10$; resposta bradicárdica: antes= $-1,87 \pm 0,11$; 60 min= $-1,90 \pm 0,09$; $F_{(2,17)} = 14,96$; $P > 0,05$) e 30 nmol/200nL (resposta taquicárdica: antes= $-2,24 \pm 0,16$; 60 minutos= $-2,19 \pm 0,09$; resposta

bradicárdica: antes= $-2,26 \pm 0,17$; 60 min= $-2,23 \pm 0,17$; $F_{(2,17)}= 12,13$; $P>0,05$) (Figura 4), bem como os parâmetros da curva sigmoide (Tabela 5), retornaram aos valores normais.

A dose de 3 nmol de 6-iodo foi utilizada para verificar se os receptores TRPV1 presentes no PL e IL modulam diferentemente a atividade do barorreflexo. Com o intuito de se evitar o efeito da difusão da droga entre as duas subáreas, o 6-iodo foi injetado na porção mais dorsal do PL ou na porção mais ventral do IL. A microinjeção de 6-iodo no PL (n=6) reduziu a inclinação das curvas de regressão linear dos componentes bradicárdio (antes= $-2,00 \pm 0,14$; depois= $-1,38 \pm 0,10$; $F_{(2,17)}= 8,88$; $P<0,05$) e taquicárdico (antes= $-2,02 \pm 0,17$; depois= $-1,31 \pm 0,13$; $F_{(2,17)}= 7,54$; $P<0,05$) do barorreflexo. A microinjeção de 6-iodo no IL (n=6) também reduziu a inclinação das curvas de regressão linear das respostas bradicárdicas (antes= $-1,87 \pm 0,11$; depois= $-1,16 \pm 0,12$; $F_{(2,17)}= 14,96$; $P<0,05$) e taquicárdicas (antes= $-1,97 \pm 0,11$; depois= $-1,45 \pm 0,08$; $F_{(2,17)}= 8,96$; $P<0,05$) do barorreflexo (Figura 6). Os valores de G, P1, P2 e ΔP , fornecidos pela curva sigmoide também foram reduzidos (Tabela 3).

A administração de 6-iodo na dose de 3 nmol/200nL nas adjacências do CPFMV também não foi capaz de alterar os valores basais de FC (antes= 367 ± 15 ; depois= 367 ± 13 bpm; $t=0,02$; $P>0,05$) ou PA (antes= $101 \pm 3,57$; depois= $102 \pm 2,21$ mmHg; $t=0,49$; $P>0,05$). A taquicardia (antes= $-1,70 \pm 0,22$ e depois= $-1,65 \pm 0,21$; $F_{(2,14)}= 0,02$; $P>0,05$) e a bradicardia reflexas (antes= $-1,60 \pm 0,24$ e depois= $-1,61 \pm 0,20$; $F_{(2,14)}= 0,22$; $P>0,05$) não foram alteradas (Figura 3). Os parâmetros da curva de regressão linear também não sofreram alteração (Tabela 6).

Figura 5: (Superior) a, b e c - Curvas de regressão linear correlacionando as respostas de Δ PAM e Δ FC antes, 10 min e 60 min após a microinjeção bilateral de 6-iodo no CPFMv. Valores de correlação r^2 para as curvas de regressão bradicárdica foram 0.80, 0.93 e 0.93 para os dados gerados antes; 0.89, 0.82 e 0.82 para os dados gerados após 10 min e 0.83, 0.95 e 0.87 para os dados gerados 60 min após a microinjeção de 6-iodo 0,3, 3 ou 30 nmol no CPFMv. . Valores de correlação r^2 para as curvas de regressão taquicárdica foram 0.89, 0.93, 0.93 para os dados gerados antes, 0.87, 0.82 e 0.82 para os dados gerados após 10 min e 0.94, 0.94 e 0.87 para os dados gerados 60 min após a microinjeção de 6-iodo no CPFMv. **(Inferior) a, b e c** - Curvas sigmóides correlacionando pressão arterial média (Δ MAP) e frequência cardíaca (Δ FC) antes ($r^2 = 0.94; 0.92; 0.95$), 10 min ($r^2 = 0.96; 0.96; 0.95$) e 60 min ($r^2 = 0.91; 0.96; 0.93$) após a microinjeção bilateral de 6-iodo 0,3 nmol ($n = 6$), 3 nmol ($n = 6$) ou 30 pmol ($n = 7$) no CPFMv. Os símbolos nas curvas sigmóides representam a PA_{50} .

Figura 6 : (Superior) a e b - Curvas de regressão linear correlacionando as respostas de ΔPAM e ΔFC antes, 10 min e 60 min após a microinjeção bilateral de 6-IODO no PL ou IL, respectivamente. Valores de correlação r^2 para as curvas de regressão bradicárdica foram 0.91 e 0.93 para os dados gerados antes; 0.89 e 0.82 para os dados gerados após 10 min; 0.93 e 0.95 para os dados gerados 60 min após a microinjeção de 6-IODO 3 no PL ou IL, respectivamente.

(Inferior) a e b - Curvas sigmóides correlacionando pressão arterial média (ΔMAP) e frequência cardíaca (ΔFC) antes ($r^2 = 0.95$; 0.92), 10 min ($r^2 = 0.96$; 0.96) e 60 min ($r^2 = 0.96$; 0.98) após a microinjeção bilateral de 6-IODO 3 nmol no PL ($n = 6$) ou no IL ($n=6$), respectivamente. Os símbolos das curvas representam a PA_{50} .

5.4 – Efeitos da microinjeção do agonista de receptores TRPV₁, capsaicina, sobre a atividade do barorreflexo.

A capsaicina quando microinjetada bilateralmente no CPFMV na dose de 0,01 nmol/200nL (n=6) não alterou os valores basais de PAM (antes= $101 \pm 2,05$; depois= $103 \pm 1,69$ mmHg; $t=0,69$; $P>0,05$) e FC (antes= 368 ± 12 ; depois= 364 ± 10 bpm; $t= 0,24$; $P>0,05$). Além disso, não houve alteração significativa da inclinação das curvas de regressão linear das respostas bradicárdicas (antes= $-1,49 \pm 0,14$ e depois= $-1,63 \pm 0,15$; $F_{(2,17)}= 0,24$; $P>0,05$) e taquicárdicas (antes= $-1,65 \pm 0,06$ e depois= $-1,39 \pm 0,14$; $F_{(2,17)}= 2,48$; $P>0,05$) (Figura 7). Os parâmetros da curva sigmoide (P1, P2, G, ΔP , PA₅₀) também não foram alterados pela droga administrada nesta dose (Tabela 4).

A microinjeção de 0,1 nmol/200nL de capsaicina (n=6) no CPFMV não alterou os valores basais de PAM (antes= $103 \pm 2,24$; depois= $105 \pm 1,52$ mmHg; $t=0,55$; $P>0,05$) e FC (antes= 368 ± 10 ; depois= 372 ± 10 bpm; $t= 0,29$; $P>0,05$). Porém, nesta dose, a capsaicina aumentou a inclinação das curvas de regressão linear da bradicardia (antes= $-1,58 \pm 0,15$ e depois= $-2,67 \pm 0,11$; $F_{(2,17)}= 16,22$; $P<0,001$) e taquicardia reflexas (antes= $-1,71 \pm 0,11$ e depois= $-2,84 \pm 0,23$; $F_{(2,17)}= 23,43$; $P<0,001$) (Figura 7). A maior parte dos parâmetros da curva sigmoide (P1, P2, ΔP), exceto o G e a PA₅₀ que não sofreram alteração, tiveram seus valores aumentados após a microinjeção de capsaicina nesta dose (Tabela 4).

Novamente, a capsaicina na dose de 1 nmol/200nL (n=5) não alterou os valores basais de PAM (antes= $102 \pm 3,30$; depois= $105 \pm 2,15$ mmHg; $t=0,66$; $P>0,05$) e FC (antes= 373 ± 15 ; depois= 374 ± 11 bpm; $t= 0,06$; $P>0,05$). Contudo, foi observado um aumento da inclinação das curvas de regressão linear das respostas bradicárdica (antes= $-1,62 \pm 0,17$ e depois= $-2,77 \pm 0,20$; $F_{(2,14)}= 14,99$; $P<0,001$) e taquicárdica (antes= $-1,64 \pm 0,13$ e depois= $-2,66 \pm 0,17$; $F_{(2,14)}= 17,99$; $P<0,001$) (Figura 7). Os parâmetros da curva sigmoide (P1, P2, G e ΔP) foram aumentados após a microinjeção de capsaicina na área, nesta dose (Tabela 4).

A inclinação das curvas de regressão linear após 60 minutos da microinjeção de capsaicina nas doses de 0,1 nmol/200nL (resposta taquicárdica: antes= $-1,71 \pm 0,11$; 60 minutos= $-1,77 \pm 0,10$; resposta

bradicárdica: antes= $-1,58 \pm 0,15$; 60 min= $-1,60 \pm 0,12$; $F_{(2,14)}= 16,22$; $P>0,05$) e 1 nmol/200nL (resposta taquicárdica: antes= $-1,64 \pm 0,13$; 60 minutos= $-1,64 \pm 0,11$; resposta bradicárdica: antes= $-1,62 \pm 0,17$; 60 min= $1,58 \pm 0,15$; $F_{(2,17)}= 14,99$; $P>0,05$) (Figura 7), bem como os parâmetros da curva sigmoide (Tabela 4), retornaram aos valores normais.

Em um outro grupo de animais (n=5) foi administrada a capsaicina na dose de 1 nmol/200nL bilateralmente no vCPFM após o pré-tratamento com uma dose inefetiva de 6-iodo (0,3 nmol/200nL), para confirmar que a alteração da atividade do barorreflexo causada pelo agonista se deve à ativação de receptores TRPV₁.

O pré-tratamento do CPFMv com 0,3 nmol/200nL de 6-iodo inibiu o aumento da atividade do barorreflexo estimulado pela capsaicina, como pode ser observado pela análise de regressão linear das respostas bradicárdicas (antes= $-1,72 \pm 0,18$ e depois= $-1,48 \pm 0,09$; $F_{(2,14)}= 0,77$; $P>0,05$) e taquicárdicas (antes= $-1,60 \pm 0,11$ e depois= $-1,46 \pm 0,07$; $F_{(2,14)}= 0,47$; $P>0,05$) (Figura 8). A pré-administração de 6-iodo no CPFMv também inibiu a alteração dos parâmetros da curva sigmoide pela capsaicina (Tabela 5).

Posteriormente, em um outro grupo de animais (n=6) foi realizado o pré-tratamento de CPFMv com 0,3 nmol/200nL de 6-iodo e 5 minutos depois procedeu-se a microinjeção de capsaicina na dose 3 nmol/200nL. Pode-se observar, através das curvas de regressão linear (Figura 8), um aumento da inclinação da resposta taquicárdica (antes= $-1,53 \pm 0,15$ e depois= $-1,99 \pm 0,10$; $F_{(2,17)}= 4,33$; $P<0,05$). A inclinação do componente bradicárdico aumentou, porém não houve diferença estatisticamente significativa (antes= $-1,54 \pm 0,15$ e depois= $-1,99 \pm 0,13$; $F_{(2,17)}= 3,53$; $P>0,05$). Observou-se um aumento dos valores dos parâmetros da curva sigmoide, exceto da PA₅₀, após a microinjeção de 6-iodo e capsaicina nestas doses (Tabela 5).

Adicionalmente, em um terceiro grupo de animais (n=5) o CPFMv foi pré-tratado com 0,3 nmol/200nL de 6-iodo e 5 minutos depois foi administrada a capsaicina na dose 10 nmol/200nL. Ocorreu um aumento da inclinação das curvas de regressão linear dos componentes bradicárdico (antes= $-1,95 \pm 0,11$ e depois= $-3,06 \pm 0,14$; $F_{(2,14)}= 30,50$; $P<0,05$) e taquicárdico (antes= $-1,72 \pm 0,27$ e depois= $-2,68 \pm 0,13$; $F_{(2,14)}= 8,28$; $P<0,05$) do barorreflexo (Figura 9). Excetuando-se a PA₅₀, todos os outros parâmetros da curva de regressão não-

linear foram aumentados após a microinjeção de 6-iodo e capsaicina na área, nestas doses (Tabela 5).

A inclinação das curvas de regressão linear 60 minutos após a injeção de 6-iodo e capsaicina nas doses 3 nmol/200nL (resposta taquicárdica: antes = $-1,53 \pm 0,14$; 60 minutos = $-1,52 \pm 0,13$, $F = 4,32$, $P > 0,05$; resposta bradicárdica: antes = $-1,54 \pm 0,15$; 60 min = $-1,55 \pm 0,13$; $F_{(2,17)} = 3,53$; $P > 0,05$) e 10 nmol/200nL (resposta taquicárdica: antes = $-1,72 \pm 0,27$; 60 min = $-1,74 \pm 0,14$; $F_{(2,14)} = 8,28$; $P > 0,05$; resposta bradicárdica: antes = $-1,95 \pm 0,11$; 60 min = $-1,87 \pm 0,11$; $F_{(2,14)} = 30,50$; $P > 0,05$), bem como os parâmetros cujo da curva sigmoide cujos valores foram alterados retornaram aos níveis basais (Figura 8 e Tabela 5).

A partir destes resultados, foram construídas curvas relacionando as doses de capsaicina microinjetadas antes (0,01; 0,1 e 1 nmol/200nL) e após (1, 3 e 10 nmol/200nL) o tratamento do CPFMv com 0,3 nmol/200nL de 6-iodo, com os parâmetros da curva sigmoide (G , $P1$, $P2$ e ΔP) e a inclinação das curvas de regressão linear das respostas bradicárdicas e taquicárdicas reflexas. A EC_{50} das curvas relacionadas ao G (antes = $-1,01 \pm 0,21$; após = $0,30 \pm 0,19$; $t = 4,56$; $P < 0,01$), $P1$ (antes = $-2,31 \pm 0,88$; após = $0,13 \pm 0,59$; $t = 2,31$; $P = 0,05$), $P2$ (antes = $-1,47 \pm 0,06$; após = $-0,01 \pm 0,60$; $t = 2,41$; $P < 0,05$), ΔP (antes = $-2,47 \pm 0,56$; após = $0,53 \pm 0,21$; $t = 4,99$; $P < 0,001$), bem como à inclinação das curvas bradicárdicas (antes = $-0,80 \pm 0,48$; após = $0,93 \pm 0,33$; $t = 2,95$; $P < 0,05$) e taquicárdicas (antes = $-2,23 \pm 1,08$; após = $0,52 \pm 0,30$; $t = 2,44$; $P < 0,05$) foram deslocadas para a direita (Figura 9). Além disso, a resposta máxima foi restaurada administrando-se doses maiores de capsaicina após o pré-tratamento do CPFMv com 6-iodo (Figura 9), como pode ser observado pelo pico das respostas referentes ao G (antes = $-2,14 \pm 0,07$, $R^2 = 0,86$, $Gl = 14$; após = $-2,22 \pm 0,07$, $R^2 = 0,91$, $Gl = 14$; $t = 0,98$; $P > 0,05$; $R^2 =$), $P1$ (antes = -103 ± 6 , $R^2 = 0,81$, $Gl = 17$; após = 109 ± 5 ; $t = 0,79$, $R^2 = 0,71$, $Gl = 17$; $P > 0,05$), $P2$ (antes = 101 ± 2 , $R^2 = 0,85$, $Gl = 17$; após = 110 ± 4 , $R^2 = 0,80$, $Gl = 17$; $t = 2,04$; $P > 0,05$), ΔP (antes = 213 ± 6 , $R^2 = 0,89$, $Gl = 17$; após = 110 ± 4 , $R^2 = 0,88$, $Gl = 17$; $t = 0,06$; $P > 0,05$), bradicardia (antes = $-2,70 \pm 0,07$, $R^2 = 0,78$, $Gl = 14$; após = $-2,82 \pm 0,08$, $R^2 = 0,93$, $Gl = 14$; $t = 0,62$; $P > 0,05$) e taquicardia reflexas (antes = $-2,84 \pm 0,05$, $R^2 = 0,95$, $Gl = 15$; após = $-2,71 \pm 0,09$, $R^2 = 0,90$, $Gl = 15$; $t = 1,28$; $P > 0,05$).

Figura 7: (Superior) a, b e c - Curvas de regressão linear correlacionando as respostas de Δ PAM e Δ FC antes, 10 min e 60 min após a microinjeção bilateral de capsaicina no CPFMV. Valores de correlação r^2 para as curvas de regressão bradicárdica foram 0.83, 0.83 e 0.84 para os dados gerados antes; 0.85, 0.96 e 0.91 para os dados gerados após 10 min e 0.85, 0.89 e 0.87 para os dados gerados 60 min após a microinjeção de capsaicina 0,01; 0,1 ou 1 nmol/200nL no CPFMV. . Valores de correlação r^2 para as curvas de regressão taquicárdica foram 0.97, 0.87, 0.90 para os dados gerados antes, 0.82, 0.87 e 0.93 para os dados gerados após 10 min e 0.97, 0.93 e 0.93 para os dados gerados 60 min após a microinjeção de capsaicina no CPFMV. **(Inferior) a, b e c** - Curvas sigmóides correlacionando pressão arterial média (Δ MAP) e frequência cardíaca (Δ FC) antes ($r^2 = 0.92$; 0.93; 0.93), 10 min ($r^2 = 0.92$; 0.89; 0.96) e 60 min ($r^2 = 0.95$; 0.96; 0.96) após a microinjeção bilateral de capsaicina 0,01 nmol ($n = 6$), 0,1 nmol ($n = 6$) ou 1 nmol ($n = 5$) no CPFMV. Os símbolos nas curvas sigmóides representam a PA_{50} .

Figura 8: (Superior) a, b e c - Curvas de regressão linear correlacionando as respostas de Δ PAM e Δ FC antes, 10 min e 60 min após a microinjeção bilateral de 6-IODO, previamente a administração de capsaicina no CPFMV. Valores de correlação r^2 para as curvas de regressão bradicárdica foram 0.84, 0.82 e 0.94 para os dados gerados antes; 0.84, 0.92 e 0.95 para os dados gerados após 10 min e 0.90, 0.86 e 0.95 para os dados gerados 60 min após a microinjeção de 6-IODO 0,3 nmol/200nL previamente a injeção de capsaicina 1; 3 ou 10 nmol/200nL no CPFMV. . Valores de correlação r^2 para as curvas de regressão taquicárdica foram 0.93, 0.83, 0.69 para os dados gerados antes, 0.96, 0.95 e 0.90 para os dados gerados após 10 min e 0.94, 0.85 e 0.90 para os dados gerados 60 min após a microinjeção de capsaicina no CPFMV. **(Inferior) a, b e c** - Curvas sigmóides correlacionando pressão arterial média (Δ MAP) e frequência cardíaca (Δ FC) antes ($r^2 = 0.95$; 0.94; 0.95), 10 min ($r^2 = 0.97$; 0.97; 0.95) e 60 min ($r^2 = 0.97$; 0.95; 0.97) após a microinjeção bilateral de 6-IODO 0,3 nmol/200nL, previamente a administração de capsaicina 1 nmol ($n = 5$), 3 nmol ($n = 6$) ou 10 nmol ($n = 5$) no CPFMV.

Figura 9: Correlação entre doses crescentes de capsaicina antes (0,01 nmol; 0,1 nmol e 1 nmol/200nL) e após (1, 3 e 10 nmol/200nL) o pré-tratamento do CPFMv com 6-IODO e as variações dos parâmetros barorreflexos na análise de regressão não-linear (G, P1, P2 e ΔP) e linear (bradicardia e taquicardia). Os valores de correlação r^2 das regressões foram: G ($r^2=0,86$; gl= 14); P1 ($r^2=0,81$; gl= 17); P2 ($r^2=0,85$; gl= 17); ΔP ($r^2=0,89$; gl= 17); Bradicardia ($r^2=0,78$; gl= 14); Taquicardia ($r^2=0,95$; gl= 14) para as curvas plotadas antes e G ($r^2=0,91$; gl= 14); P1 ($r^2=0,71$; gl= 17); P2 ($r^2=0,80$; gl= 17); ΔP ($r^2=0,88$; gl= 17); Bradicardia ($r^2=0,93$; gl= 14); Taquicardia ($r^2=0,90$; gl= 14) para as curvas plotadas após o pré-tratamento do CPFMv com 6-IODO.

6 – Discussão

A hipótese do presente trabalho é a de que os receptores TRPV₁ presentes no CPFMV participam da modulação barorreflexa cardíaca. Para testar esta hipótese foi primeiramente utilizada a capsazepina, um antagonista de receptores TRPV₁. Quando microinjetada bilateralmente no CPFMV, esta droga foi capaz de reduzir a inclinação das curvas de regressão linear nas doses de 10 e 100 nmol/200nL, tanto do componente taquicárdico quanto do componente bradicárdico do barorreflexo cardíaco, isto é, o antagonismo dos receptores TRPV₁ do CPFMV reduziu a magnitude da resposta barorreflexa, ou seja, ocorreu uma menor variação da FC dos animais frente às alterações de PA.

Além disso, a inclinação das curvas de regressão não linear (G) também foi reduzida. O platô inferior da curva sigmoide, chamado de P1, é um indicador de atividade parassimpática máxima, enquanto que o platô superior, ou P2, é um indicador de atividade simpática máxima (Head and McCarty, 1987). Houve uma redução de ambos os platôs após a microinjeção de capsazepina na área, e consequentemente a variação entre eles (ΔP) também foi reduzida, demonstrando que os receptores TRPV₁ presentes no CPFMV estão envolvidos com a modulação dos componentes simpático e parassimpático do barorreflexo.

Entretanto, a capsazepina não é um antagonista seletivo de receptores TRPV₁, podendo também bloquear canais de cálcio sensíveis à voltagem (Docherty et al., 1997). O bloqueio de canais de cálcio em neurônios do CPFMV altera a atividade do barorreflexo (Resstel et al., 2004). Portanto, com o intuito de confirmar que o efeito observado com a capsazepina sobre a atividade barorreflexa se deveu ao bloqueio específico de receptores TRPV₁, foi utilizado um segundo antagonista destes receptores, o 6-iodo, que além de não bloquear canais de cálcio, é cerca de quatro vezes mais seletivo do que a capsazepina (Appendino et al., 2003). Pode-se observar que o efeito do 6-iodo sobre a atividade barorreflexa foi semelhante ao efeito da capsazepina, o que reforça a possibilidade de que a redução na resposta barorreflexa observada com a administração de capsazepina se deva ao antagonismo específico dos receptores TRPV₁ presentes no CPFMV. Além disso, as doses

efetivas de 6-iodo (3 e 30 nmol/200nL) foram menores do que as doses efetivas de capsazepina (10 e 100 nmol/200nL), corroborando os dados existentes na literatura que demonstram a maior potência do segundo antagonista utilizado neste trabalho (Appendino et al., 2003, Aguiar, 2009, Aguiar et al., 2009). Além do mais, a capsazepina é capaz de bloquear receptores muscarínicos (de Man et al., 2008). Entretanto, estes receptores presentes no CPFMv não participam da modulação barorreflexa (Resstel et al., 2005). Portanto, é improvável a ocorrência de uma alteração da resposta barorreflexa por meio de uma interação não específica da capsazepina com os receptores muscarínicos da área.

A capsaicina é um agonista de receptores TRPV₁, sendo uma substância encontrada naturalmente na pimenta (Caterina et al., 1997). Este composto foi então administrado no CPFMv com o intuito de verificar se a ativação dos receptores TRPV₁ presentes na área altera a atividade barorreflexa cardíaca de forma inversa a observada com os antagonistas desses receptores. Observou-se então um aumento da atividade dos componentes taquicárdico e bradicárdico do barorreflexo, por meio da análise de regressão linear, quando a capsaicina foi injetada nas doses de 0,1 e 1 nmol/200nL. Além disso, a microinjeção de capsaicina aumentou a atividade dos componentes simpático e parassimpático do barorreflexo cardíaco, como pode ser observado através dos valores dos platôs (P1 e P2) da curva sigmoide. A inclinação da curva de regressão não-linear, que nos fornece o ganho (G) do barorreflexo cardíaco, aumentou após a injeção da droga no vCPFM. Portanto a magnitude da resposta reflexa aumentou.

Os receptores TRPV₁ são proteínas integrais de membrana e estão acoplados a um canal permeável a cátions, principalmente a íons Ca^{+2} , facilitando a sua entrada nos neurônios, podendo estar localizados tanto na membrana pré como pós-sináptica (Caterina et al., 1997, Toth et al., 2005). No CPFMv os receptores TRPV₁ se localizam principalmente na região pós-sináptica (Fogaca et al., 2012). Quando se apresentam nesta região e são ativados, permitem a entrada de íons Ca^{+2} , o que estimula a produção de óxido nítrico (NO) (Miyamoto et al., 2009). Este por sua vez atua como um mediador retrógrado, aumentando a liberação de neurotransmissores em nível pré-sináptico (Brenman et al., 1996, Cheah et al., 2006). Como os canais TRPV₁

podem aumentar a liberação de glutamato em várias áreas do SNC (Marinelli et al., 2002, Marinelli et al., 2003, Musella et al., 2009), acredita-se que isso também ocorra no CPFMV, através da produção de NO. Além disso, a transmissão glutamatérgica do CPFMV, via receptores NMDA e síntese de NO, possui um papel facilitatório sobre a atividade barorreflexa (Resstel and Correa, 2006c). Desta maneira, acreditamos que os canais TRPV₁ participam da modulação da atividade barorreflexa através do controle da transmissão glutamatérgica do CPFMV, sendo que a facilitação do barorreflexo observada após a microinjeção de capsaicina na área se deveu ao aumento da liberação de glutamato e produção de NO.

Appendino e colaboradores em 2003 demonstraram que o 6-iodo e a capsaicina competem pelo mesmo sítio de ligação no receptor TRPV₁ (Appendino et al., 2003). Baseado nisso, em um outro grupo de animais foi feito o pré-tratamento do CPFMV com uma dose inefetiva de 6-iodo (0,3 nmol/200nL) e cinco minutos depois procedeu-se a microinjeção de capsaicina (1 nmol/200nL). Pode-se observar que o 6-iodo foi capaz de abolir o aumento da inclinação das curvas de regressão linear dos componentes bradicárdico e taquicárdico do barorreflexo, bem como de inibir a alteração dos parâmetros da curva sigmoide. Portanto o aumento da atividade do barorreflexo devido a administração de capsaicina no CPFMV ocorreu através da ativação dos receptores TRPV₁ da área. Além disso, a microinjeção de doses maiores de capsaicina (3 e 10 nmol/200nL) frente ao pré-bloqueio dos receptores TRPV₁ da área restaurou o aumento na atividade do barorreflexo observado com a administração de doses menores do agonista (0,1 e 1 nmol/200nL), sem o pré-tratamento da área com o 6-iodo. Foi observado, através da análise da EC₅₀, que a curva dose-resposta da capsaicina foi deslocada para a direita na presença do antagonista 6-iodo, sem alteração do efeito máximo, o que é sugestivo de antagonismo competitivo (Colquhoun et al., 1979, Wyllie and Chen, 2007), estando de acordo com os achados de Appendino e colaboradores (Appendino et al., 2003).

Os endocanabinóides, como a anandamida, que são agonistas de receptores CB₁ (Devane et al., 1992) podem ativar receptores TRPV₁ (Zygmunt et al., 1999, Smart and Jerman, 2000). Estes dois receptores são co-expressos em várias áreas do cérebro (Vaughan et al., 2000) e são capazes de produzir

efeitos opostos (Howlett and Fleming, 1984, Marinelli et al., 2002), apesar de serem ativados pelo mesmo agonista endógeno. Rubino e colaboradores em 2008 mostraram que a microinjeção de metanandamina, um agonista não seletivo de receptores CB₁ e TRPV₁ (Ralevic et al., 2000), em doses baixas no CPFMV promoveu um efeito do tipo ansiolítico em roedores, via receptores CB₁, enquanto que em doses maiores observou-se um efeito do tipo ansiogênico, via receptores TRPV₁ (Rubino et al., 2008). Além disso, foi demonstrado que no PL existe uma interação entre os sistemas endovanilóide e endocanabinóide na modulação de comportamentos do tipo ansiedade (Fogaca et al., 2012), demonstrando uma relação fisiológica oposta entre estes sistemas presentes no CPFMV. Experimentos prévios do nosso laboratório demonstram que os receptores CB₁ presentes no CPFMV modulam a atividade barorreflexa. Os parâmetros das curvas de regressão linear e não linear foram aumentados pelo antagonismo dos receptores CB₁ (Ferreira-Junior et al., 2011). Diferentemente, o bloqueio dos receptores TRPV₁ promoveu uma redução da atividade barorreflexa, isto é, uma resposta oposta à observada no trabalho de Ferreira-Junior e colaboradores, sendo consistente com os dados encontrados na literatura, sugerindo que os sistemas endovanilóide e endocanabinóide são capazes de modular respostas fisiológicas de maneira oposta (Howlett and Fleming, 1984, Fogaca et al., 2012).

O CPFMV está envolvido com a modulação de respostas emocionais e autonômicas em situações aversivas (Lisboa et al., 2010b). Resstel e colaboradores em 2006, demonstraram que o bloqueio não específico de sinapses do CPFMV com cloreto de cobalto reduz o tempo de congelamento, bem como as respostas cardiovasculares de ratos submetidos ao modelo do medo condicionado ao contexto (Resstel et al., 2006). Posteriormente, verificou-se que o sistema endocanabinóide presente nesta área modula a expressão da resposta emocional condicionada, pois o bloqueio dos receptores CB₁ aumenta o tempo de congelamento e acentua o aumento da FC e da PA durante a reexposição de animais ao contexto aversivo (Lisboa et al., 2010a). Como o sistema endocanabinóide presente no CPFMV também é capaz de modular a atividade barorreflexa (Ferreira-Junior et al., 2011), acreditamos, que em situações aversivas os receptores CB₁ presentes na área participam da

modulação do arco reflexo barorreceptor, permitindo o acontecimento de ajustes cardiovasculares em tais situações.

Como os sistemas endovanilóide e endocanabinóide presentes no CPFMV interagem entre si (Fogaca et al., 2012), o bloqueio de receptores CB₁ do CPFMV, poderia deslocar a anandamida para a ativação de receptores TRPV₁, o que pode ser responsável pelo aumento do comportamento do tipo ansiogênico e das alterações cardiovasculares associados ao contexto aversivo (Lisboa et al., 2010a). Deste modo, os receptores TRPV₁ presentes no CPFMV também podem participar da modulação barorreflexa durante reações de defesa, podendo estar envolvidos, por exemplo, nos ajustes que facilitam a taquicardia reflexa observada em ratos submetidos ao modelo do estresse por restrição (Crestani et al., 2010), permitindo também o aumento de PA concomitante ao aumento de FC, característico da resposta autonômica que acontece durante situações aversivas (Resstel et al., 2008).

Os receptores TRPV₁ foram primeiramente descritos em fibras C aferentes que são neurônios nociceptivos (Caterina et al., 1997). Estes receptores são capazes de aumentar o disparo de tais neurônios durante processos inflamatórios e dolorosos, como na osteoartrite (Holzer, 1988, Han et al., 2012). O CPFMV, entre outras estruturas do SNC, além de modular a atividade cardiovascular (Resstel et al., 2004), está envolvido nas respostas cognitivas e emocionais relacionadas à dor, bem como na percepção da dor (Mohr et al., 2005, Wiech et al., 2006), sendo que a expressão dos receptores TRPV₁ está aumentada no IL e PL em camundongos submetidos a um modelo de dor neuropática (Giordano et al., 2011). Estímulos dolorosos podem modificar a atividade do sistema nervoso simpático, resultando em alterações da PA, FC e fluxo sanguíneo, revelando a existência de um componente cardiovascular na resposta à dor (Fazalbhoy et al., 2012). Tomadas em conjunto com os resultados deste trabalho estas informações levantam a possibilidade de que o CPFMV possa modular as alterações cardiovasculares que ocorrem durante processos dolorosos, possivelmente via receptores TRPV₁.

Tavares e colaboradores em 2009 demonstraram que existe um papel oposto do PL e do IL na resposta cardíaca em ratos submetidos ao modelo de estresse por restrição. A microinjeção bilateral de cloreto de cobalto, um

bloqueador não seletivo de sinapses, no PL aumentou a taquicardia durante a restrição dos animais, enquanto que a mesma droga injetada no IL reduziu a resposta taquicárdica frente ao estresse (Tavares and Correa, 2006). Este trabalho levantou a hipótese de que o PL e o IL poderiam estar modulando diferentemente a atividade do barorreflexo. Assim, para testar uma possível ação modulatória divergente dos receptores TRPV₁ localizados no PL e no IL, o 6-iodo foi microinjetado bilateralmente na dose de 3 nmol/200nL no PL ou no IL. Apesar da diferença na modulação autonômica entre o PL e IL observada no trabalho de Tavares e colaboradores, os nossos resultados mostram que os receptores TRPV₁ presentes nestas duas subáreas parecem modular a atividade barorreflexa da mesma maneira. A inclinação das curvas de regressão linear e os parâmetros fornecidos pelas curvas sigmoides foram alteradas da mesma forma pelo antagonista injetado no PL ou no IL. Entretanto, os resultados encontrados no nosso estudo são condizentes com outros dados encontrados na literatura, nos quais não se observa uma diferença da modulação de receptores presentes nestas duas subáreas sobre a atividade barorreflexa. (Ferreira-Junior et al., 2011).

7- Conclusões

Os resultados deste trabalho demonstram que os receptores TRPV₁ presentes no CPFMV participam da modulação da atividade do barorreflexo, não havendo diferença entre a função do PL e IL no controle desta resposta. Os resultados sugerem que este controle ocorra em situações específicas como estresse, permitindo ajustes cardiovasculares durante reações de defesa, bem como em processos dolorosos.

APÊNDICE

Tabelas

Tabela 1

Parâmetros derivados das curvas sigmóides geradas antes, 10 minutos e 60 minutos após a microinjeção bilateral de capsazepina no vCPFM nas doses de 1 nmol/200nL (n=6), 10 nmol/200nL (n=6) e 100 nmol/200nL (n=6).

Grupo	G (bpm/mmHg)	P1 (bpm)	P2 (bpm)	ΔP (bpm)	PA ₅₀ (mmHg)
Capsazepina 1	$F_{(2,17)} = 0,19$	$F_{(2,17)} = 0,65$	$F_{(2,17)} = 0,51$	$F_{(2,17)} = 0,54$	$F_{(2,17)} = 0,95$
Antes	$-1,68 \pm 0,95$	-61 ± 6	67 ± 8	130 ± 13	$0,97 \pm 2,18$
10 min	$-1,37 \pm 0,07$	-54 ± 7	65 ± 5	120 ± 8	$-3,59 \pm 2,82$
60 min	$-1,84 \pm 0,12$	-63 ± 6	77 ± 13	137 ± 14	$-1,35 \pm 1,96$
Capsazepina 10	$F_{(2,17)} = 56,65$	$F_{(2,17)} = 37,64$	$F_{(2,17)} = 30,68$	$F_{(2,17)} = 79,66$	$F_{(2,17)} = 0,14$
Antes	$-1,80 \pm 0,04$	-87 ± 2	79 ± 3	166 ± 4	$1,81 \pm 0,69$
10 min	$-1,09 \pm 0,05^*$	$-46 \pm 6^*$	$54 \pm 2^*$	$101 \pm 5^*$	$-1,49 \pm 1,77$
60 min	$-1,73 \pm 0,06$	-83 ± 3	81 ± 3	164 ± 4	$-1,41 \pm 0,87$
Capsazepina 100	$F_{(2,17)} = 49,65$	$F_{(2,17)} = 8,79$	$F_{(2,17)} = 13,91$	$F_{(2,17)} = 53,37$	$F_{(2,17)} = 0,68$
Antes	$-1,91 \pm 0,06$	-84 ± 5	85 ± 5	173 ± 6	$0,50 \pm 1,50$
10 min	$-1,23 \pm 0,07^*$	$-56 \pm 6^*$	$57 \pm 6^*$	$115 \pm 5^*$	$0,50 \pm 1,56$
60 min	$-2,08 \pm 0,06$	-95 ± 8	90 ± 4	178 ± 4	$-1,58 \pm 1,84$

*P < 0,05; one-way ANOVA seguido de pós-teste de Dunnet's Valor $\pm$ E.P.M.

Tabela 2

Parâmetros derivados das curvas sigmóides geradas antes, 10 minutos e 60 minutos após a microinjeção bilateral de 6-iodo no vCPFM nas doses de 0,3 nmol/200nL (n=6), 3 nmol/200nL (n=6) e 30 nmol/200nL (n=7).

Grupo	G (bpm/mmHg)	P1 (bpm)	P2 (bpm)	ΔP (bpm)	PA ₅₀ (mmHg)
6-iodo 0,3	$F_{(2,17)} = 2,51$	$F_{(2,17)} = 0,11$	$F_{(2,17)} = 0,81$	$F_{(2,17)} = 0,48$	$F_{(2,17)} = 0,40$
Antes	$-1,34 \pm 0,06$	-60 ± 4	64 ± 4	123 ± 4	$-1,30 \pm 1,63$
10 min	$-1,49 \pm 0,06$	-62 ± 5	63 ± 2	125 ± 2	$1,25 \pm 1,39$
60 min	$-1,47 \pm 0,04$	-59 ± 4	68 ± 3	127 ± 2	$-0,13 \pm 0,63$
6-iodo 3	$F_{(2,17)} = 83,75$	$F_{(2,17)} = 21,66$	$F_{(2,17)} = 22,20$	$F_{(2,17)} = 32,37$	$F_{(2,17)} = 0,37$
Antes	$-1,75 \pm 0,04$	-72 ± 4	76 ± 3	148 ± 5	$-0,22 \pm 1,63$
10 min	$-1,17 \pm 0,04^*$	$-44 \pm 4^*$	$56 \pm 2^*$	$100 \pm 5^*$	$-2,24 \pm 1,53$
60 min	$-1,84 \pm 0,04$	-73 ± 3	77 ± 2	150 ± 4	$-0,53 \pm 0,53$
6-iodo 30	$F_{(2,20)} = 33,64$	$F_{(2,20)} = 8,54$	$F_{(2,20)} = 32,35$	$F_{(2,20)} = 16,76$	$F_{(2,20)} = 0,84$
Antes	$-1,80 \pm 0,05$	-85 ± 7	85 ± 3	170 ± 9	$1,03 \pm 2,10$
10 min	$-1,38 \pm 0,05^*$	$-54 \pm 4^*$	$59 \pm 3^*$	$112 \pm 6^*$	$-0,47 \pm 1,67$
60 min	$-1,89 \pm 0,04$	-84 ± 6	87 ± 2	171 ± 8	$0,48 \pm 1,62$

*P < 0,05; one-way ANOVA seguido de pós-teste de Dunnet's Valor $\pm$ E.P.M

Tabela 3

Parâmetros derivados das curvas sigmóides geradas antes, 10 minutos e 60 minutos após a microinjeção bilateral de 6-iodo na dose de 3 nmol/200nL no PL (n=6) ou no IL (n=6).

Grupo	G (bpm/mmHg)	P1 (bpm)	P2 (bpm)	ΔP (bpm)	PA ₅₀ (mmHg)
6-iodo 3 (PL)	F _(2,17) = 11,00	F _(2,17) = 16,84	F _(2,17) = 10,38	F _(2,17) = 27,63	F _(2,17) = 0,93
Antes	-1,58 ± 0,06	-73 ± 4	76 ± 5	148 ± 5	-0,35 ± 1,15
10 min	-1,33 ± 0,06*	-51 ± 3*	54 ± 3*	105 ± 5*	0,24 ± 0,99
60 min	-1,67 ± 0,04	-77 ± 4	77 ± 4	154 ± 5	0,06 ± 1,12
6-iodo 3 (IL)	F _(2,17) = 83,75	F _(2,17) = 21,66	F _(2,17) = 22,20	F _(2,17) = 32,37	F _(2,17) = 0,37
Antes	-1,75 ± 0,04	-72 ± 4	76 ± 3	148 ± 5	-0,22 ± 1,63
10 min	-1,17 ± 0,04*	-44 ± 4*	56 ± 2*	100 ± 5*	-2,24 ± 1,53
60 min	-1,84 ± 0,04	-73 ± 3	77 ± 2	150 ± 4	-0,53 ± 0,53

*P < 0,05; one-way ANOVA seguido de pós-teste de Dunnet's
Valor ± E.P.M.

Tabela 4

Parâmetros derivados das curvas sigmóides geradas antes, 10 minutos e 60 minutos após a microinjeção bilateral de capsaicina no CPMV nas doses de 0,01 nmol/200nL (n=6), 0,1 nmol/200nL (n=6) e 1 nmol/200nL (n=5)

Grupo	Ganho (bpm/mmHg)	P1 (bpm)	P2 (bpm)	ΔP (bpm)	PA ₅₀ (mmHg)
Capsaicina 0,01	F _(2,17) = 1,95	F _(2,17) = 0,12	F _(2,17) = 2,27	F _(2,17) = 0,22	F _(2,17) = 0,13
Antes	-1,32 ± 0,06	-58 ± 3	60 ± 2	119 ± 9	-1,33 ± 1,52
10 min	-1,48 ± 0,07	-61 ± 4	55 ± 3	116 ± 2	1,88 ± 1,31
60 min	-1,42 ± 0,05	-60 ± 4	61 ± 2	122 ± 4	-1,20 ± 1,10
Capsaicina 0,1	F _(2,17) = 1,00	F _(2,17) = 30,82	F _(2,17) = 35,89	F _(2,17) = 58,50	F _(2,17) = 0,83
Antes	-1,62 ± 0,06	-61 ± 3	71 ± 3	133 ± 3	-0,20 ± 1,50
10 min	-1,76 ± 0,09	-89 ± 3*	196 ± 4*	196 ± 6*	-0,98 ± 0,61
60 min	-1,70 ± 0,05	-62 ± 3	73 ± 3	135 ± 4	-1,11 ± 1,13
Capsaicina 1	F _(2,14) = 33,69	F _(2,14) = 17,33	F _(2,14) = 37,37	F _(2,14) = 35,34	F _(2,14) = 0,46
Antes	-1,25 ± 0,06	-57 ± 5	63 ± 3	120 ± 6	-1,05 ± 0,79
10 min	-1,96 ± 0,09*	-96 ± 7*	97 ± 4*	194 ± 9*	0,72 ± 1,05
60 min	-1,38 ± 0,05	-58 ± 4	64 ± 3	123 ± 5	-0,75 ± 1,24

*P < 0,05; one-way ANOVA seguido de pós-teste de Dunnet's
Valor ± E.P.M.

Tabela 5

Parâmetros derivados das curvas sigmóides geradas antes, 10 minutos e 60 minutos após a microinjeção bilateral de 0,3 nmol/200nL de 6-iodo, previamente a injeção de capsaicina nas doses de 1 nmol/200nL (n=5), 3 nmol/200nL (n=6) e 10 nmol/200nL (n=5).

Grupo	G (bpm/mmHg)	P1 (bpm)	P2 (bpm)	ΔP (bpm)	PA ₅₀ (mmHg)
6-iodo 0,3 + Capsaicina 1	F _(2,14) = 2.66	F _(2,14) = 0.15	F _(2,14) = 3.66	F _(2,14) = 2.02	F _(2,14) = 0,92
Antes	-1.36 ± 0.06	-60 ± 6	65 ± 3	125 ± 5	1,06 ± 1,83
10 min	-1.34 ± 0.03	-57 ± 3	57 ± 2	114 ± 4	0,49 ± 0,98
60 min	-1.48 ± 0.04	-60 ± 4	65 ± 2	125 ± 4	0,19 ± 1,59
6-iodo 0,3 + Capsaicina 3	F _(2,17) = 27,06	F _(2,17) = 6,30	F _(2,17) = 12,40	F _(2,17) = 14,09	F _(2,17) = 0,83
Antes	-1,38 ± 0.06	-58 ± 4	62 ± 4	119 ± 6	1,02 ± 0,66
10 min	-1,93 ± 0.06*	-76 ± 3*	80 ± 2*	156 ± 3*	0,87 ± 0,43
60 min	-1,47 ± 0.05	-60 ± 4	62 ± 3	122 ± 6	0,39 ± 1,05
6-iodo 0,3 + Capsaicina 10	F _(2,14) = 20,90	F _(2,14) = 34,51	F _(2,14) = 12,11	F _(2,14) = 36,31	F _(2,14) = 0,61
Antes	-1,79 ± 0.10	-74 ± 2	71 ± 7	146 ± 6	2,92 ± 1,80
10 min	-2,29 ± 0.05*	-108 ± 5*	100 ± 2*	207 ± 5*	1,94 ± 1,01
60 min	-1,69 ± 0.04	-72 ± 3	69 ± 4	149 ± 6	0,96 ± 1,15

*P < 0,05; one-way ANOVA seguido de pós-teste de Dunnet's
Valor ± E.P.M.

Tabela 6

Parâmetros derivados das curvas sigmóides geradas antes, 10 minutos e 60 minutos após a microinjeção bilateral de DMSO 10% (n=5) no CPFMV e 6-iodo 3 nmol/200nL nas adjacências do CPFMV (OUT) (n=5).

Grupo	Ganho bpm/mmHg	P1 bpm	P2 bpm	ΔP bpm	PA ₅₀ (mmHg)
DMSO 10%	F _(2,14) = 0,33	F _(2,14) = 0,62	F _(2,14) = 1,11	F _(2,14) = 1,39	F _(2,14) = 0,97
Antes	-1,41 ± 0,05	-62 ± 5	64 ± 2	126 ± 4	1,15 ± 1,99
10min	-1,44 ± 0,04	-66 ± 5	61 ± 2	127 ± 3	0,66 ± 1,63
60 min	-1,39 ± 0,05	-59 ± 5	61 ± 2	120 ± 4	0,52 ± 1,80
6-iodo 3 nmol (OUT)	F _(2,14) = 4,34	F _(2,14) = 0,19	F _(2,14) = 0,38	F _(2,14) = 0,43	F _(2,14) = 0,98
Antes	-1,62 ± 0,08	-65 ± 8	69 ± 6	134 ± 11	-0,59 ± 1,67
10min	-1,71 ± 0,08	-66 ± 6	71 ± 6	137 ± 10	-0,12 ± 1,02
60 min	-1,39 ± 0,09	-60 ± 8	64 ± 6	123 ± 11	-0,42 ± 1,97

*P < 0,05; one-way ANOVA seguido de pós-teste de Dunnet's
Valor ± E.P.M.

Referências Bibliográficas

- Aguiar DC (2009) Anxiolytic effects of 6-iodonordihydrocapsaicin, a TRPV1 antagonist, injected into the medial prefrontal cortex of rats. In: *European Neuropsychopharmacology*, vol. 19, pp 597-598.
- Aguiar DC, Terzian AL, Guimaraes FS, Moreira FA (2009) Anxiolytic-like effects induced by blockade of transient receptor potential vanilloid type 1 (TRPV1) channels in the medial prefrontal cortex of rats. *Psychopharmacology (Berl)* 205:217-225.
- Albaghdadi M (2007) Baroreflex control of long-term arterial pressure. *Revista Brasileira de Hipertensão* 14:212-225.
- Appendino G, Harrison S, De Petrocellis L, Daddario N, Bianchi F, Schiano Moriello A, Trevisani M, Benvenuti F, Geppetti P, Di Marzo V (2003) Halogenation of a capsaicin analogue leads to novel vanilloid TRPV1 receptor antagonists. *Br J Pharmacol* 139:1417-1424.
- Auclair N, Otani S, Soubrie P, Crepel F (2000) Cannabinoids modulate synaptic strength and plasticity at glutamatergic synapses of rat prefrontal cortex pyramidal neurons. *J Neurophysiol* 83:3287-3293.
- Averill DB, Diz DI (2000) Angiotensin peptides and baroreflex control of sympathetic outflow: pathways and mechanisms of the medulla oblongata. *Brain Res Bull* 51:119-128.
- Breivogel CS, Griffin G, Di Marzo V, Martin BR (2001) Evidence for a new G protein-coupled cannabinoid receptor in mouse brain. *Mol Pharmacol* 60:155-163.
- Brenman JE, Christopherson KS, Craven SE, McGee AW, Bredt DS (1996) Cloning and characterization of postsynaptic density 93, a nitric oxide synthase interacting protein. *J Neurosci* 16:7407-7415.
- Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D (1997) The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 389:816-824.
- Cheah JH, Kim SF, Hester LD, Clancy KW, Patterson SE, 3rd, Papadopoulos V, Snyder SH (2006) NMDA receptor-nitric oxide transmission mediates neuronal iron homeostasis via the GTPase Dexas1. *Neuron* 51:431-440.
- Colquhoun D, Dreyer F, Sheridan RE (1979) The actions of tubocurarine at the frog neuromuscular junction. *J Physiol* 293:247-284.
- Crestani CC, Deolindo MV, Alves FH, Resstel LB, Correa FM (2009) Non-N-methyl-D-aspartate glutamate receptors in the lateral hypothalamus modulate cardiac baroreflex responses in conscious rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 36:1079-1085.
- Crestani CC, Tavares RF, Alves FH, Resstel LB, Correa FM (2010) Effect of acute restraint stress on the tachycardiac and bradycardiac responses of the baroreflex in rats. *Stress* 13:61-72.
- Crippa GE, Peres-Polon VL, Kuboyama RH, Correa FM (1999) Cardiovascular response to the injection of acetylcholine into the anterior cingulate region of the medial prefrontal cortex of unanesthetized rats. *Cereb Cortex* 9:362-365.
- Cristino L, de Petrocellis L, Pryce G, Baker D, Guglielmotti V, Di Marzo V (2006) Immunohistochemical localization of cannabinoid type 1 and vanilloid

- transient receptor potential vanilloid type 1 receptors in the mouse brain. *Neuroscience* 139:1405-1415.
- de Man JG, Boeckx S, Anguille S, de Winter BY, de Schepper HU, Herman AG, Pelckmans PA (2008) Functional study on TRPV1-mediated signalling in the mouse small intestine: involvement of tachykinin receptors. *Neurogastroenterol Motil* 20:546-556.
- de Novellis V, Vita D, Gatta L, Luongo L, Bellini G, De Chiaro M, Marabese I, Siniscalco D, Boccella S, Piscitelli F, Di Marzo V, Palazzo E, Rossi F, Maione S (2011) The blockade of the transient receptor potential vanilloid type 1 and fatty acid amide hydrolase decreases symptoms and central sequelae in the medial prefrontal cortex of neuropathic rats. *Mol Pain* 7:7.
- De Petrocellis L, Di Marzo V (2009) An introduction to the endocannabinoid system: from the early to the latest concepts. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 23:1-15.
- Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, Gibson D, Mandelbaum A, Etinger A, Mechoulam R (1992) Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* 258:1946-1949.
- Docherty RJ, Yeats JC, Piper AS (1997) Capsazepine block of voltage-activated calcium channels in adult rat dorsal root ganglion neurones in culture. *Br J Pharmacol* 121:1461-1467.
- Drummond HA, Welsh MJ, Abboud FM (2001) ENaC subunits are molecular components of the arterial baroreceptor complex. *Ann N Y Acad Sci* 940:42-47.
- Fazalbhoy A, Birznies I, Macefield VG (2012) Individual differences in the cardiovascular responses to tonic muscle pain: parallel increases or decreases in muscle sympathetic nerve activity, blood pressure, and heart rate. *Exp Physiol*.
- Fazan VPS (2002) Nervo depressor aórtico: importância dos estudos morfológicos na compreensão dos mecanismos fisiológicos do controle da pressão arterial? *Revista Brasileira de Hipertensão* 9:413-415.
- Fernandes KB, Crippa GE, Tavares RF, Antunes-Rodrigues J, Correa FM (2003) Mechanisms involved in the pressor response to noradrenaline injection into the cingulate cortex of unanesthetized rats. *Neuropharmacology* 44:757-763.
- Ferreira-Junior NC, Fedoce AD, Alves FH, Correa FM, Resstel LB (2011) Medial prefrontal cortex endocannabinoid system modulates baroreflex activity through CB1 receptors. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*.
- Fisk GD, Wyss JM (1997) Pressor and depressor sites are intermingled in the cingulate cortex of the rat. *Brain Res* 754:204-212.
- Fisk GD, Wyss JM (2000) Descending projections of infralimbic cortex that mediate stimulation-evoked changes in arterial pressure. *Brain Res* 859:83-95.
- Fogaca MV, Aguiar DC, Moreira FA, Guimaraes FS (2012) The endocannabinoid and endovanilloid systems interact in the rat prelimbic medial prefrontal cortex to control anxiety-like behavior. *Neuropharmacology* 63:202-210.

- Gabbott PL, Warner TA, Jays PR, Bacon SJ (2003) Areal and synaptic interconnectivity of prelimbic (area 32), infralimbic (area 25) and insular cortices in the rat. *Brain Res* 993:59-71.
- Gerdeman GL, Ronesi J, Lovinger DM (2002) Postsynaptic endocannabinoid release is critical to long-term depression in the striatum. *Nat Neurosci* 5:446-451.
- Gigg J, Tan AM, Finch DM (1994) Glutamatergic hippocampal formation projections to prefrontal cortex in the rat are regulated by GABAergic inhibition and show convergence with glutamatergic projections from the limbic thalamus. *Hippocampus* 4:189-198.
- Giordano C, Cristino L, Luongo L, Siniscalco D, Petrosino S, Piscitelli F, Marabese I, Gatta L, Rossi F, Imperatore R, Palazzo E, de Novellis V, Di Marzo V, Maione S (2011) TRPV1-Dependent and -Independent Alterations in the Limbic Cortex of Neuropathic Mice: Impact on Glial Caspases and Pain Perception. *Cereb Cortex*.
- Groenewegen HJ (1988) Organization of the afferent connections of the mediodorsal thalamic nucleus in the rat, related to the mediodorsal-prefrontal topography. *Neuroscience* 24:379-431.
- Guyenet PG (2006) The sympathetic control of blood pressure. *Nat Rev Neurosci* 7:335-346.
- Haibara AS (2000) Descobrimento e importância dos barorreceptores. *Revista Brasileira de Hipertensão* 7:113-115.
- Hampson AJ, Bornheim LM, Scanziani M, Yost CS, Gray AT, Hansen BM, Leonoudakis DJ, Bickler PE (1998) Dual effects of anandamide on NMDA receptor-mediated responses and neurotransmission. *J Neurochem* 70:671-676.
- Han P, Korepanova AV, Vos MH, Moreland RB, Chiu ML, Faltynek CR (2012) Quantification of TRPV1 Protein Levels in Rat Tissues to Understand its Physiological Roles. *J Mol Neurosci*.
- Head GA, McCarty R (1987) Vagal and sympathetic components of the heart rate range and gain of the baroreceptor-heart rate reflex in conscious rats. *J Auton Nerv Syst* 21:203-213.
- Holzer P (1988) Local effector functions of capsaicin-sensitive sensory nerve endings: involvement of tachykinins, calcitonin gene-related peptide and other neuropeptides. *Neuroscience* 24:739-768.
- Howlett AC, Fleming RM (1984) Cannabinoid inhibition of adenylate cyclase. Pharmacology of the response in neuroblastoma cell membranes. *Mol Pharmacol* 26:532-538.
- Huang CC, Wu YS, Chen T, Chang WN, Du YC, Wu CJ, Yip HK, Tsai NW, Tan TY, Chuang YC, Wang HC, Lu CH (2010) Long-term effects of baroreflex function after stenting in patients with carotid artery stenosis. *Auton Neurosci* 158:100-104.
- Iwata J, LeDoux JE, Meeley MP, Arneric S, Reis DJ (1986) Intrinsic neurons in the amygdaloid field projected to by the medial geniculate body mediate emotional responses conditioned to acoustic stimuli. *Brain Res* 383:195-214.
- Leonard CM (1969) The prefrontal cortex of the rat. I. Cortical projection of the mediodorsal nucleus. II. Efferent connections. *Brain Res* 12:321-343.
- Lisboa SF, Reis DG, da Silva AL, Correa FM, Guimaraes FS, Resstel LB (2010a) Cannabinoid CB1 receptors in the medial prefrontal cortex

- modulate the expression of contextual fear conditioning. *Int J Neuropsychopharmacol* 13:1163-1173.
- Lisboa SF, Stecchini MF, Correa FM, Guimaraes FS, Resstel LB (2010b) Different role of the ventral medial prefrontal cortex on modulation of innate and associative learned fear. *Neuroscience* 171:760-768.
- Marinelli S, Di Marzo V, Berretta N, Matias I, Maccarrone M, Bernardi G, Mercuri NB (2003) Presynaptic facilitation of glutamatergic synapses to dopaminergic neurons of the rat substantia nigra by endogenous stimulation of vanilloid receptors. *J Neurosci* 23:3136-3144.
- Marinelli S, Vaughan CW, Christie MJ, Connor M (2002) Capsaicin activation of glutamatergic synaptic transmission in the rat locus coeruleus in vitro. *J Physiol* 543:531-540.
- Micheline LC, Morris M (1999) Endogenous vasopressin modulates the cardiovascular responses to exercise. *Ann N Y Acad Sci* 897:198-211.
- Miyamoto T, Dubin AE, Petrus MJ, Patapoutian A (2009) TRPV1 and TRPA1 mediate peripheral nitric oxide-induced nociception in mice. *PLoS One* 4:e7596.
- Mohr C, Binkofski F, Erdmann C, Buchel C, Helmchen C (2005) The anterior cingulate cortex contains distinct areas dissociating external from self-administered painful stimulation: a parametric fMRI study. *Pain* 114:347-357.
- Musella A, De Chiara V, Rossi S, Prosperetti C, Bernardi G, Maccarrone M, Centonze D (2009) TRPV1 channels facilitate glutamate transmission in the striatum. *Mol Cell Neurosci* 40:89-97.
- Neafsey EJ (1990) Prefrontal cortical control of the autonomic nervous system: anatomical and physiological observations. *Prog Brain Res* 85:147-165; discussion 165-146.
- Offertaler L, Mo FM, Batkai S, Liu J, Begg M, Razdan RK, Martin BR, Bukoski RD, Kunos G (2003) Selective ligands and cellular effectors of a G protein-coupled endothelial cannabinoid receptor. *Mol Pharmacol* 63:699-705.
- Owens NC, Sartor DM, Verberne AJ (1999) Medial prefrontal cortex depressor response: role of the solitary tract nucleus in the rat. *Neuroscience* 89:1331-1346.
- Owens NC, Verberne AJ (2000) Medial prefrontal depressor response: involvement of the rostral and caudal ventrolateral medulla in the rat. *J Auton Nerv Syst* 78:86-93.
- Owens NC, Verberne AJ (2001) Regional haemodynamic responses to activation of the medial prefrontal cortex depressor region. *Brain Res* 919:221-231.
- Owsianik G, D'Hoedt D, Voets T, Nilius B (2006) Structure-function relationship of the TRP channel superfamily. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 156:61-90.
- Papademetriou V, Doumas M, Faselis C, Tsioufis C, Douma S, Gkaliagkousi E, Zamboulis C (2011) Carotid baroreceptor stimulation for the treatment of resistant hypertension. *Int J Hypertens* 2011:964394.
- Piomelli D (2003) The molecular logic of endocannabinoid signalling. *Nat Rev Neurosci* 4:873-884.

- Porszasz J, Jancso N (1959) Studies on the action potentials of sensory nerves in animals desensitized with capsaicine. *Acta Physiol Acad Sci Hung* 16:299-306.
- Ralevic V, Kendall DA, Randall MD, Zygmunt PM, Movahed P, Hogestatt ED (2000) Vanilloid receptors on capsaicin-sensitive sensory nerves mediate relaxation to methanandamide in the rat isolated mesenteric arterial bed and small mesenteric arteries. *Br J Pharmacol* 130:1483-1488.
- Resstel LB, Correa FM (2005) Pressor and tachycardic responses evoked by microinjections of L-glutamate into the medial prefrontal cortex of unanaesthetized rats. *Eur J Neurosci* 21:2513-2520.
- Resstel LB, Correa FM (2006a) Injection of l-glutamate into medial prefrontal cortex induces cardiovascular responses through NMDA receptor - nitric oxide in rat. *Neuropharmacology* 51:160-167.
- Resstel LB, Correa FM (2006b) Involvement of the medial prefrontal cortex in central cardiovascular modulation in the rat. *Auton Neurosci* 126-127:130-138.
- Resstel LB, Correa FM (2006c) Medial prefrontal cortex NMDA receptors and nitric oxide modulate the parasympathetic component of the baroreflex. *Eur J Neurosci* 23:481-488.
- Resstel LB, Correa FM, Guimaraes FS (2008) The expression of contextual fear conditioning involves activation of an NMDA receptor-nitric oxide pathway in the medial prefrontal cortex. *Cereb Cortex* 18:2027-2035.
- Resstel LB, Fernandes KB, Correa FM (2004) Medial prefrontal cortex modulation of the baroreflex parasympathetic component in the rat. *Brain Res* 1015:136-144.
- Resstel LB, Fernandes KB, Correa FM (2005) alpha-Adrenergic and muscarinic cholinergic receptors are not involved in the modulation of the parasympathetic baroreflex by the medial prefrontal cortex in rats. *Life Sci* 77:1441-1451.
- Resstel LB, Joca SR, Guimaraes FG, Correa FM (2006) Involvement of medial prefrontal cortex neurons in behavioral and cardiovascular responses to contextual fear conditioning. *Neuroscience* 143:377-385.
- Rubino T, Realini N, Castiglioni C, Guidali C, Vigano D, Marras E, Petrosino S, Perletti G, Maccarrone M, Di Marzo V, Parolaro D (2008) Role in anxiety behavior of the endocannabinoid system in the prefrontal cortex. *Cereb Cortex* 18:1292-1301.
- Sasamura T, Sasaki M, Tohda C, Kuraishi Y (1998) Existence of capsaicin-sensitive glutamatergic terminals in rat hypothalamus. *Neuroreport* 9:2045-2048.
- Smart D, Jerman JC (2000) Anandamide: an endogenous activator of the vanilloid receptor. *Trends Pharmacol Sci* 21:134.
- Tavares RF, Correa FM (2006) Role of the medial prefrontal cortex in cardiovascular responses to acute restraint in rats. *Neuroscience* 143:231-240.
- Terzian AL, Aguiar DC, Guimaraes FS, Moreira FA (2009) Modulation of anxiety-like behaviour by Transient Receptor Potential Vanilloid Type 1 (TRPV1) channels located in the dorsolateral periaqueductal gray. *Eur Neuropsychopharmacol* 19:188-195.

- Toth A, Boczan J, Kedei N, Lizanecz E, Bagi Z, Papp Z, Edes I, Csiba L, Blumberg PM (2005) Expression and distribution of vanilloid receptor 1 (TRPV1) in the adult rat brain. *Brain Res Mol Brain Res* 135:162-168.
- Vaughan CW, Connor M, Bagley EE, Christie MJ (2000) Actions of cannabinoids on membrane properties and synaptic transmission in rat periaqueductal gray neurons in vitro. *Mol Pharmacol* 57:288-295.
- Verberne AJ (1996) Medullary sympathoexcitatory neurons are inhibited by activation of the medial prefrontal cortex in the rat. *Am J Physiol* 270:R713-719.
- Verberne AJ, Lewis SJ, Worland PJ, Beart PM, Jarrott B, Christie MJ, Louis WJ (1987) Medial prefrontal cortical lesions modulate baroreflex sensitivity in the rat. *Brain Res* 426:243-249.
- Verberne AJ, Owens NC (1998) Cortical modulation of the cardiovascular system. *Prog Neurobiol* 54:149-168.
- Wiech K, Kalisch R, Weiskopf N, Pleger B, Stephan KE, Dolan RJ (2006) Anterolateral prefrontal cortex mediates the analgesic effect of expected and perceived control over pain. *J Neurosci* 26:11501-11509.
- Wyllie DJ, Chen PE (2007) Taking the time to study competitive antagonism. *Br J Pharmacol* 150:541-551.
- Xing J, Li J (2007) TRPV1 receptor mediates glutamatergic synaptic input to dorsolateral periaqueductal gray (dl-PAG) neurons. *J Neurophysiol* 97:503-511.
- Zygmunt PM, Petersson J, Andersson DA, Chuang H, Sorgard M, Di Marzo V, Julius D, Hogestatt ED (1999) Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature* 400:452-457.