



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**  
**DEPARTAMENTO DE NEUROCIÊNCIAS E CIÊNCIAS DO**  
**COMPORTAMENTO**

---



**CAROLINA DA SILVA CARVALHO**

**Identificação dos neurotransmissores das fibras  
mielínicas e amielínicas do nervo depressor aórtico  
de ratos: uma abordagem imunohistoquímica**

**Ribeirão Preto**

**2016**



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**  
**DEPARTAMENTO DE NEUROCIÊNCIAS E CIÊNCIAS DO**  
**COMPORTAMENTO**

---



**CAROLINA DA SILVA CARVALHO**

**Identificação dos neurotransmissores das fibras  
mielínicas e amielínicas do nervo depressor aórtico  
de ratos: uma abordagem imunohistoquímica**

Tese apresentada à Faculdade de  
Medicina de Ribeirão Preto da  
Universidade de São Paulo para  
obtenção do título de Doutora em  
Ciências

Área de Concentração: Neurologia e  
Neurociências

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Valéria Paula  
Sassoli Fazan

**Ribeirão Preto**

**2016**

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

### Catálogo da Publicação

#### Serviço de Documentação

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

Carvalho, Carolina da Silva

Identificação dos neurotransmissores das fibras mielínicas e amielínicas do nervo depressor aórtico de ratos: uma abordagem imunohistoquímica / Carolina da Silva Carvalho; orientadora Valéria Paula Sassoli Fazan. – Ribeirão Preto, 2016.

117 f. : il.

Tese (Doutorado)--Universidade de São Paulo, 2016.

1. Nervo Depressor Aórtico. 2. Nervo frênico. 3. Substância P. 4. Imunohistoquímica. I. Fazan, Sassoli. II. Título. III. Título: Identificação dos neurotransmissores das fibras mielínicas e amielínicas do nervo depressor aórtico de ratos: uma abordagem imunohistoquímica.

CDD

**CARVALHO, C. S. Identificação dos neurotransmissores das fibras mielínicas e amielínicas do nervo depressor aórtico de ratos: uma abordagem imunohistoquímica.** Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutora em Ciências.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

## DEDICATÓRIA

*Aos meus pais Glória e José, pelo exemplo de força, superação, honestidade e integridade. Princípios estes, que me permitiram enfrentar todos os desafios dessa imensa jornada científica e acadêmica com alegria, humildade e fé. Acredito de todo coração na força da união, na troca de conhecimentos para a promoção de um crescimento pessoal e profissional contínuo.*

*Ao meu noivo Antônio, por todo companheirismo, apoio e amor. Palavras se tornam ferramentas banais mediante tudo o que você significa para mim. Obrigado por me permitir sonhar e lutar por tudo que almejo.*

*Aos meus irmãos Vinícius e Márcio, por estarem sempre presentes em minha vida e me darem meus maiores presentes, meu sobrinho Gabriel e minhas sobrinhas Bianca e Beatriz.*

*À prof.<sup>a</sup> Dra. Valéria Fazan, por ter me dado a oportunidade de fazer parte desta família. Obrigada por nos ensinar a importância da humildade e do respeito ao próximo, servindo-me de exemplo profissional e ético. O verdadeiro educador transmite o conhecimento com exemplos e não apenas com a oratória.*

*Quanto mais aumenta nosso conhecimento, mais evidente fica nossa ignorância.*

*John Fitzgerald Kennedy (1971-1963)*

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente agradeço à Deus por me dar forças e fé para acreditar e alcançar meus sonhos, mesmo em momentos tortuosos.

À prof.<sup>a</sup> Dra. Kathleen A. Sluka, do Laboratório de Neurobiologia da Dor do Departamento de Fisioterapia e Ciências da Reabilitação da Universidade de Iowa, Estados Unidos da América, por todo acolhimento, empenho, sabedoria, compreensão frente às minhas limitações e acima de tudo, exigência.

À prof.<sup>a</sup> Dra. Ida J. Llewellyn-Smith, do Departamento de Medicina Cardiovascular, Fisiologia e Centro de Neurociência da Universidade de Flinders, Austrália, pela parceria e colaboração em estudos imunohistoquímicos, cuja presença física possibilitou a realização deste estudo. Obrigada pelo compartilhamento técnico-científico.

Aos meus queridos amigos do Laboratório de Neurobiologia da Dor da Universidade de Iowa, Estados Unidos da América, Jing Fortes-Danielson, Sandra Kolker, Lynn Rasmussen, Shinsuke Inoue, Ramy Essam Abdelhamid, Ericka Merriwether, César Torres Gutiérrez, Lucas Vasconcelos, Thiago Abner dos Santos Sousa, por todo carinho, atenção, dedicação e pelo tempo disponibilizado em meu treinamento. Agradeço também pelos bons momentos vividos, e por todas as comemorações e risadas compartilhadas. Nunca os esquecerei!!!

À Sandra Balero Penharvel Martins e ao Jorge Forjaz, do laboratório de Histologia e Imunohistoquímica, pelos ensinamentos compartilhados e apoio constante. Agradeço principalmente por alegrarem meu dia, pela conversa descontraída na hora do café, e por todos os abraços tão afetuosos.

Aos funcionários e técnicos do Laboratório de Fisiologia Cardiovascular, Jaci Airton Castania e Carlos Alberto Aguiar da Silva, pelo auxílio e orientação laboratorial. E também ao prof. Dr. Hélio César Salgado por nos ceder o espaço laboratorial e técnico para a realização deste projeto.

Ao Prof. Dr. Amilton Barreira do Laboratório de Neurologia Aplicada e Experimental (LNAE), por colocar a disposição seu laboratório e por nos ceder apoio técnico especializado através dos ensinamentos do querido Antônio Renato Meirelles e Silva.

Ao coordenador da Pós-Graduação em Neurociências e Ciências do Comportamento, Prof. Dr. João Pereira Leite, pela sua dedicação e honestidade.

À secretária da Pós Graduação, Silvana Lo Turco, pela amabilidade e colaboração prestada sempre que solicitada.

À CAPES e FAEPA pela concessão da bolsa e suporte financeiro.

À Elisabete de Cássia do Carmo, Vânia Alice de Aguiar Mendes e Milena Menezes de Amorim, companheiras de jornada e morada nos Estados Unidos, agradeço pelo suporte, incentivo e carinho, mas principalmente por serem grandes e leais amigas.

Aos meus queridos amigos do laboratório de Morfologia e Morfometria, Greice Anne Rodrigues, Luciana Sayuri Sanada, Renata Ferreira, Nathália Leilane Berto Machado, Letícia Oliveira Neri da Silva, Ana Leda Simões, Carolina Giorgetto, Lucas Fontanesi e Anacéres Ribeiro Rodrigues. É impossível descrever em breves palavras a importância desta convivência, foram quatro anos de muito aprendizado, amizade e apoio. Obrigada a todos por tornarem meus dias mais alegres e vivos.

## RESUMO

**CARVALHO, C. S. Identificação dos neurotransmissores das fibras mielínicas e amielínicas do nervo depressor aórtico de ratos: uma abordagem imunohistoquímica.** 2016. 117 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

O nervo depressor aórtico (NDA) é, primariamente, um conjunto de fibras aferentes que transmitem informações oriundas de alterações da pressão arterial (PA) a partir dos barorreceptores arteriais (mecanorreceptores localizados no arco da aorta ou seio carótico) aos centros de controle cardiovascular localizados no sistema nervoso central (SNC). Este mecanismo é responsável pela regulação reflexa da função cardíaca e vascular, promovendo ajustes nos centros vasoconstritor e vasodilatador, atuando simultaneamente sobre os sistemas simpático e parassimpático. Fato este que, contribui para o aumento da atividade vagal cardíaca e inibição de descargas simpáticas para vasos e coração, garantindo a manutenção dos níveis pressóricos dentro de uma faixa de normalidade. Diversos neurotransmissores foram descritos atuando nos centros de controle cardiocirculatório localizados no tronco encefálico, mais especificamente no bulbo, participando da regulação da PA. Nestas regiões centrais, os neurotransmissores glutamato, GABA (Ácido Gama Aminobutírico) e substância P (SP) foram amplamente investigados. Entretanto, em nenhum destes trabalhos foi realizado um estudo detalhado, investigando a presença da SP em nervos depressores aórticos de forma direta, sendo esta informação ainda desconhecida. Acredita-se que a SP seja um transmissor do reflexo barorreceptor, atuando na modulação deste circuito, na tentativa de atenuar elevações da pressão sanguínea. Existe portanto a necessidade de uma investigação morfológica e imunohistoquímica com o intuito de promover o esclarecimento sobre os neurotransmissores presentes no NDA. Os nervos frênicos foram utilizados como controle positivo, já que neste território a SP já se encontra caracterizada. Inúmeros são os estudos que descrevem a existência da SP em nervos frênicos, fato este que justifica a aplicação do referido nervo como controle do NDA, foco de estudo deste projeto. Baseados nestas necessidades, o objetivo do presente estudo foi primeiramente o de promover a padronização da técnica imunohistoquímica (IHQ),



bem como a verificação da viabilidade de utilização do glutaraldeído à 2,5% como um fixativo primário, auxiliando na identificação de neurotransmissores dentro do sistema nervoso periférico. Em seguida, a identificação e quantificação da SP em NDA de ratos normotensos através do método imunohistoquímico indireto (3,3'-Diaminobenzidina "DAB") foram realizados. O referido estudo foi desenvolvido em duas etapas. A primeira parte corresponde a padronização e otimização da técnica de imunohistoquímica em nervos frênicos de ratos Wistar através da localização e caracterização da SP e da enzima colina acetiltransferase (CAT). A segunda fase, trata-se da identificação e quantificação da SP no NDA, sendo este, um possível neurotransmissor ou neuromodulador do reflexo barorreceptor. Para este estudo foram utilizados no total 38 ratos da linhagem Wistar (*Rattus Norvegicus*), normotensos, com 20 semanas de idade, machos e fêmeas. Deste total, 16 animais machos foram destinados à padronização da técnica de IHQ em nervos frênicos. E para a caracterização e quantificação da SP no NDA foram utilizados 22 ratos Wistar, sendo 12 machos e 10 fêmeas. Nossos resultados demonstram de forma inédita a presença da SP em fibras amielínicas (tipo C) e fibras de pequeno diâmetro (A-delta) no NDA de forma bastante pontualizada em segmentos proximais e difusa distalmente, sugerindo a existência de subpopulações de fibras amielínicas do tipo C. Estes achados confirmam inúmeras suposições de que a SP atue como um dos neurotransmissores de aferências barorreceptoras, podendo participar na modulação do Sistema Nervoso Autônomo (SNA), uma vez que encontra-se localizada em centros responsáveis pela regulação reflexa da PA. Adicionalmente, a análise do percentual de marcação positiva à SP entre os gêneros apresentou um aparente predomínio da SP em machos mas sem diferença significativa entre os grupos. De forma semelhante, a padronização imunohistoquímica em cortes transversais e longitudinais de nervos frênicos apresentaram uma imunomarcação positiva e aleatória da SP em conjuntos de fibras amielínicas (tipo C) e em fibras de pequeno diâmetro localizadas próximo a periferia do espaço endoneural, corroborando com a localização relatada em estudos morfológicos e ultraestruturais, assegurando a especificidade e a reprodutibilidade do método. Distintamente, as fibras de grande e médio diâmetro (A-alfa, beta e gama), consideradas fibras mielinizadas de condução rápida, foram imunorreativas à CAT em nervos frênicos. Por fim, espera-se que a identificação deste neuropeptídeo sirva de gatilho para que futuras pesquisas envolvendo a liberação de neurotransmissores em aferências barorreceptoras sejam

explorados. Fato este, que contribuirá para a agregação de informações pertinentes à modulação ou transmissão da informação neural, propiciando desta forma melhor entendimento da comunicação e atividades barorreflexas associadas a mecanismos cardiovasculares.

**Palavras-chave:** Nervo Depressor Aórtico. Nervo frênico. Substância P. Colina Acetiltransferase. Ratos Wistar. Normotensos. Imunohistoquímica. Glutaraldeído.

## **ABSTRACT**

**CARVALHO, C. S. Identification of the neurotransmitters of myelinated and unmyelinated fibers from aortic depressor nerve: an immunohistochemical approach.** 2016. 117 f. Thesis (Doctoral) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

The aortic depressor nerve (ADN) is primarily a set of afferent fibers that transmit derived information of changes in arterial blood pressure (BP) from arterial baroreceptors (mechanoreceptors located in the aortic arch and carotid sinus) to sites of cardiovascular control located into central nervous system (CNS). This mechanism is responsible for the reflex regulation of cardiac and vascular function, promoting adjustments of vasoconstrictor and vasodilator centers, simultaneously acting on the sympathetic and parasympathetic systems. In addition, contributes to increased cardiac vagal activity and inhibition of sympathetic discharges to vessels and heart, ensuring the maintenance of blood pressure levels within the normal range. Many neurotransmitters have been described operating in cardio-circulatory control centers located in the brainstem, more specifically in the bulb, participating in the regulation of BP. In these central regions, the neurotransmitters glutamate, GABA (Gamma Aminobutyric Acid) and substance P (SP) have been widely investigated. However, none of these works was carried out a detailed study, investigating the presence of SP in aortic depressor nerves directly, and this information is still unknown. It is believed that SP can be a transmitter at the synapse of the baroreceptor reflex, operating in the modulation of this circuit in an attempt to attenuate elevation of blood pressure. Therefore, there is a need to investigate a morphological and immunohistochemical approach in order to promote the clarification on the present neurotransmitters into ADN. The phrenic nerves were used as a positive control, already as substance P (SP) is characterized in this territory. There have been numerous studies describing the existence of SP in phrenic nerves, a fact that justifies the application of the nerve as control of the ADN, study focus of this project. Based on these requirements, the aim of the present study is two-fold. Firstly, it attempts to promote the standardization of the immunohistochemical (IHC) technique as well as the verification of the feasibility of using glutaraldehyde fixative as a primary, assisting in the identification of

neurotransmitters in the peripheral nervous system (PNS). Subsequently, the identification and quantification of SP immunoreactivity in the ADN of normotensive rats by indirect immunohistochemical method (3,3'-Diaminobenzidine "DAB") were done. The study was developed in two stages. The first part corresponds to standardization and optimization of immunohistochemical technique in phrenic nerves of Wistar rats through location and characterization of the SP and enzyme choline acetyltransferase (ChAT). The second phase is about the identification and quantification of the SP into ADN, being a possible neurotransmitter or neuromodulator from the baroreceptor reflex. For this study we used a total of 38 Wistar rats (*Rattus norvegicus*), normotensive, 20 weeks old, male and female. From this total, 16 male animals were used for standardization of IHC technique in the phrenic nerves. Nonetheless, for the characterization and quantification of SP in ADN were used 22 Wistar rats, 12 males and 10 females. Our results showed an unprecedented manner the presence of SP in unmyelinated fibers (type C) and small diameter fibers (A-delta) into ADN, being quite focused on proximal segments and diffuse distally, suggesting the existence of subsets of unmyelinated fibers. These findings confirm numerous assumptions that the SP acts as a neurotransmitter from afferent baroreceptor and may participate in the modulation of the Autonomic Nervous System (ANS), since it is located in centers responsible for regulating reflex of BP. Further, an analysis of the percentage of positive SP staining between genders, presented an apparent predominance of SP in males but no significant difference between the groups were found. Similarly, IHC standardization in transverse and longitudinal sections of phrenic nerves showed a positive random and immunostaining of SP in sets of unmyelinated fibers (type C) and small diameter fibers located near the periphery of endoneural space, corroborating location reported on morphological and ultrastructural studies, ensuring the specificity and reproducibility of the method. Distinctly, the fibers of large and medium diameters (A-alpha, beta and gamma), considered myelinated fibers of fast conducting, were immunoreactive to ChAT in phrenic nerves. Finally, it is expected that the identification of neuropeptide serve as a trigger for that future studies involving the release of neurotransmitters into afferent baroreceptors be explored. These results could contribute to the aggregation of relevant information for the modulation and transmission of neural information, thus providing better understanding of communication and baroreflex activities associated with cardiovascular mechanisms.

**Keywords:** Aortic Depressor Nerve. Phrenic Nerve. Substance P. Choline Acetyltransferase. Wistar Rats. Normotensive. Immunohistochemistry. Glutaraldehyde.

## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1.** Visão dorsal do núcleo do trato solitário (NTS) mostrando a porção rostrocaudal em três distintos níveis.. .....29
- FIGURA 2.** Regulação neural reflexa da pressão arterial. ....32
- FIGURA 3.** Estrutura molecular da substância P, H-Arg<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup>-Lys<sup>3</sup>-Pro<sup>4</sup>-Gln<sup>5</sup>-Gln<sup>6</sup>-Phe<sup>7</sup>-Phe<sup>8</sup>-Gly<sup>9</sup>-Leu<sup>10</sup>-Met<sup>11</sup>-NH<sup>2</sup>, desenvolvida através do programa Avogadro que possibilita a edição e montagem de moléculas. ....41
- FIGURA 4.** Expressão dos genes PPT .....42
- FIGURA 5.** Reação catalizada pela colina acetiltransferase (CAT) para síntese da acetilcolina.....43
- FIGURA 6.** A) Cervicotomia para exposição do nervo depressor aórtico esquerdo. O nariz do animal se encontra na parte inferior da imagem. O nervo aórtico origina-se das artérias aorta (arco) a esquerda, ou artéria subclávia direita; B) Note a exposição do referido nervo em rato Wistar macho (linha preta) próximo ao nervo vago esquerdo, x par craniano (seta) e artéria carótida comum esquerda (\*) .....51
- FIGURA 7.** Ilustração da câmara úmida utilizada em todas as etapas imunohistoquímicas.....54
- FIGURA 8.** Cortes transversais do nervo frênico esquerdo de ratos Wistar machos, segmento proximal (Painéis A, B) e distal (Painéis C, D). Note a possível presença de aglomerados de fibras amielínicas (tipo C, não visível) situado perto do perineuro na periferia do nervo e dispersos no espaço endoneural (cabeça de setas, B, D, F e H). Secções transversais do nervo frênico direito, segmento proximal (painéis E, F) e distal (Painéis G, H). Granulações positivas à SP e intensificadas pela utilização do níquel (Ni-DAB, resultou em coloração preta e levemente acastanhada) foram intensamente coradas em feixes de fibras mielinizadas de pequeno diâmetro (tipo A-delta) (ver

setas, B, D e H). As letras E indicam o epineuro (A, E e G). As letras S evidenciam o núcleo de uma célula de Schwann envolvendo fibras mielínicas de grande diâmetro (tipo A). As letras A ilustram o axoplasma das fibras mielínicas. (\*) Ilustra vasos sanguíneos endoneurais. ....58

**FIGURA 9.** Cortes longitudinais do nervo frênico esquerdo de ratos Wistar machos, segmento proximal (Painel A) e distal (Painel B). Note pequenas granulações densamente marcadas ao longo da superfície do nervo (cabeça de setas). (Painel C) corresponde ao segmento proximal e (Painel D) ao segmento distal do nervo frênico direito de ratos machos. Detalhe da imunohistoquímica, mostrando uma marcação positiva para SP, sendo esta bastante focalizada e seguindo o trajeto da fibra nervosa. (\*) Indica vasos sanguíneos.. ....59

**FIGURA 10.** Cortes transversais do nervo frênico proximal (Painéis A, B, C, D) mostrando uma evidente imunopositividade para CAT em axônios mielínicos de grande, médio (cabeças de seta) e de pequeno diâmetro (setas). Inúmeras linhas axonais coradas ao longo dos feixes de fibras nervosas confirmam a presença desta enzima, precursora da acetilcolina em cortes longitudinais proximal (Painel E) e distal (Painel F). As letras P ilustram o perineuro. A letra S indica o núcleo de uma célula de Schwann. As letras A mostram o axoplasma das fibras mielínicas (\*) Eritrócitos no vaso sanguíneo.....61

**FIGURA 11.** Parâmetros fisiológicos da pressão arterial sistólica (PAS), diastólica (PAD) e média (PAM) dos ratos Wistar machos e fêmeas. Valores expressos em Média± Erro padrão.....62

**FIGURA 12.** (A, C) corte transversal do segmento proximal do NDA (lado esquerdo) ratos Wistar machos e fêmeas respectivamente, contendo visíveis conjuntos de fibras mielínicas de grande, médio e pequeno calibre (M). Granulações positivas à SP e intensificadas pela utilização do níquel (Ni-DAB, resultando em coloração preta e levemente acastanhada) foram intensamente coradas de forma pontualizada próximo ao perineuro, ver setas; (B, D) Corte transversal do segmento distal, mostrando feixes de axônios amielínicos (AM) e mielínicos (M) em ratos machos e fêmeas respectivamente; Ver (E, F) para fins meramente comparativos, perceba a disposição

das fibras mielínicas e amielínicas em imagens morfológicas do NDA, corroborando com os achados imunohistoquímicos; (G) Percentual da área total imunomarcada, comparação entre machos e fêmeas. A letra S indica o núcleo de uma célula de Schwann envolvendo uma fibra mielínica. (\*) Indica vasos sanguíneos.. .....64

**FIGURA 13.** Cortes longitudinais do NDA esquerdo de ratos Wistar machos (A, C) e fêmeas (B, D) altamente reativos à SP foram intensamente marcadas em feixes de possíveis fibras amielínicas (tipo C). Observe a distribuição de densas granulações dentro de fibras nervosas aferentes (cabeças de setas), localizadas próximo ao perineuro (P). (\*) Vasos sanguíneos endoneurais.....65



## LISTA DE SIGLAS

ABC	Avidina-Biotina-Peroxidase
Acetil-CoA	Acetil-Coenzima A
ACo	Acetilcolina
ACoE	Acetilcolinesterase
AHA	American Heart Association
AMPA	Ácido $\alpha$ -amino-3-hidróxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico
AP	Área Postrema
CAT	Colina Acetiltransferase
CDC	Centers for Disease Control and Prevention National
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CVLM	Bulbo Ventrolateral Caudal
DAB	Diaminobenzidina
EKA	Endocinina A
EKB	Endocinina B
EKC	Endocinina C
EKD	Endocinina D
EUA	Estados Unidos da América
GABA	Ácido Gama-Aminobutírico
GN	Gânglio Nodoso
GP	Gânglio Petroso
HAS	Hipertensão Arterial Sistêmica
HK-1	Hemocinina 1
HRP	Horseradish Peroxidase
IHQ	Imunohistoquímica
IML	Coluna Intermédiolateral
KA	Cainato
LAB	Labelled Avidin-Biotin
LSAB	Labelled Streptavidin-Biotin
NA	Núcleo Ambíguo
NDA	Nervo Depressor Aórtico
NK1	Neurocinina 1

NK2	Neurocinina 2
NK3	Neurocinina 3
NKA	Neurocinina A
NKB	Neurocinina B
NMDA	N-Metil-D-Aspartato
NPK	Neurocinina K
NP- $\gamma$	Neurocinina $\gamma$
NSC	Nervo do seio carótico
NTS	Núcleo do Trato Solitário
OCT	Optimal Cutting Temperature
OMS	Organização Mundial da Saúde
PA	Pressão Arterial
PAD	Pressão Arterial Diastólica
PAM	Pressão Arterial Média
PAP	Peroxidase-Antiperoxidase
PAS	Pressão Arterial Sistólica
pH	Potencial Hidrogeniônico
PNS	Pesquisa Nacional de Saúde
PPT-A	Preprotaquicinina A
PPT-B	Preprotaquicinina B
PPT-C	Preprotaquicinina C
RNA <sub>m</sub>	Messenger Ribonucleic Acid
RVLM	Bulbo Ventrolateral Rostral
SNA	Sistema Nervoso Autônomo
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Sistema Nervoso Periférico
SP	Substância P
SUS	Sistema Único de Saúde
SW	Shapiro Wilk

## LISTA DE SÍMBOLOS

>	maior
%	porcentagem
*	asterisco
/	por
=	igual
±	mais ou menos
≤	menor ou igual
≥	maior ou igual
μm	micrômetro
μm <sup>2</sup>	micrômetro quadrado
g	grama
h	hora
Hz	hertz
Kg	quilograma
kHz	quilohertz
M	molar
mg	miligrama
mM	milimolar
mmHg	milímetro de Mercúrio
ms	milissegundo
m/s	metro por segundo
°C	grau Celsius
R\$	real
U\$	dólar
x	vezes
α	alfa
β	beta
γ	gama
min	minuto

# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>23</b>
<b>1.1. Hipertensão arterial</b> .....	<b>23</b>
<b>1.2. Mecanismos de ajuste da pressão arterial</b> .....	<b>25</b>
1.2.1. Reflexos cardiovasculares e aferências nervosas .....	26
1.2.2. Barorreceptores arteriais e manutenção da pressão arterial .....	29
<b>1.3. Nervo depressor aórtico</b> .....	<b>33</b>
1.3.1. Anatomia e morfologia .....	33
<b>1.4. Nervo frênico</b> .....	<b>36</b>
<b>1.5. Neurotransmissores</b> .....	<b>38</b>
1.5.1. Substância P .....	40
1.5.2. Acetilcolina e acetiltransferase.....	43
<b>1.6. Fixação de tecidos</b> .....	<b>45</b>
1.6.1. Glutaraldeído versus formoldeído .....	45
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>48</b>
<b>2.1. Objetivos gerais</b> .....	<b>48</b>
<b>2.2. Objetivos específicos</b> .....	<b>48</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>50</b>
<b>3.1. Animais</b> .....	<b>50</b>
<b>3.2. Procedimentos cirúrgicos</b> .....	<b>50</b>
<b>3.3. Procedimentos histológicos</b> .....	<b>52</b>
<b>3.4. Imunohistoquímica</b> .....	<b>52</b>
3.4.1. Substância P e colina acetiltransferase .....	52

<b>3.5.</b>	<b>Análise qualitativa dos nervos frênicos .....</b>	<b>54</b>
<b>3.6.</b>	<b>Análise quantitativa dos nervos depressores aórticos.....</b>	<b>55</b>
<b>3.7.</b>	<b>Análise estatística .....</b>	<b>55</b>
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>57</b>
<b>4.1.</b>	<b>Substância P em nervos frênicos .....</b>	<b>57</b>
<b>4.2.</b>	<b>Colina acetiltransferase em nervos frênicos .....</b>	<b>60</b>
<b>4.3.</b>	<b>Nervo depressor aórtico .....</b>	<b>62</b>
	4.3.1. Dados fisiológicos .....	62
<b>4.4.</b>	<b>Aspectos morfológicos e imunohistoquímicos .....</b>	<b>63</b>
	4.4.1. Substância P .....	63
<b>5.</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>67</b>
<b>5.1.</b>	<b>Neurotransmissores.....</b>	<b>69</b>
<b>5.2.</b>	<b>Substância P .....</b>	<b>69</b>
<b>5.3.</b>	<b>Colina acetiltransferase .....</b>	<b>74</b>
<b>5.4.</b>	<b>Nervo depressor aórtico .....</b>	<b>75</b>
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>81</b>
<b>7.</b>	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>83</b>
<b>8.</b>	<b>ANEXOS.....</b>	<b>111</b>
<b>8.1.</b>	<b>Comitê de ética em pesquisa .....</b>	<b>111</b>
<b>8.2.</b>	<b>Artigo e trabalhos publicados em anais de congresso.....</b>	<b>112</b>

---

# INTRODUÇÃO

## 1. INTRODUÇÃO

Este trabalho baseia-se principalmente na identificação e quantificação da substância P (SP) em aferências barorreceptoras, mais especificamente no nervo depressor aórtico (NDA) através da técnica de imunohistoquímica. Este nervo participa ativamente na transmissão de informações periféricas oriundas de alterações da pressão arterial (PA) aos centros de controle cardiovascular localizados no tronco encefálico (bulbo). Este mecanismo conhecido como regulação neural da circulação é importante para promover o controle do centro vasoconstritor e vasodilatador, garantindo a manutenção dos níveis pressóricos dentro de uma faixa de normalidade. Embora aspectos patológicos não tenham sido investigados, iniciaremos esta breve revisão abordando inicialmente uma das principais doenças ocasionadas pela elevação da pressão arterial, bem como o impacto social e econômico advindo desta condição. Tal descrição se faz necessária a fim de tentar evidenciar a importância de se entender os mecanismos intrínsecos de aferências barorreceptoras que conectam e regulam diretamente o sistema nervoso central (SNC). Em seguida, mecanismos de ajuste da pressão arterial e aspectos morfológicos e anatômicos relacionados ao referido nervo serão apresentados. Uma sucinta atualização envolvendo os procedimentos imunohistoquímicos e fixativos mais utilizados em rotinas e práticas laboratoriais também serão expostos. As características morfológicas do nervo frênico, utilizado como controle positivo e como ferramenta de padronização da técnica de imunohistoquímica (IHQ), através de altas concentrações de glutaraldeído à 2,5% serão seguidamente apresentados. Por fim, dois neurotransmissores a SP e a enzima colina acetiltransferase (CAT) serão sucintamente discutidos. Vale salientar que este trabalho é pioneiro em descrever a presença da SP em nervos depressores aórticos, sendo um dos neurotransmissores primários de aferências barorreceptoras.

### 1.1. Hipertensão arterial

As doenças crônicas são consideradas um grave problema de saúde pública, tanto no Brasil como no mundo, gerando gastos imensuráveis aos cofres públicos. Dentre estas doenças destaca-se a hipertensão arterial sistêmica (HAS) que afeta

---

aproximadamente 1 bilhão de pessoas no mundo. Estima-se que este quadro sofra um aumento até o ano de 2025, atingindo 1,5 bilhões de adultos (CHOCKALINGAM, 2007; JARARI et al., 2016; WEYER, 2016). A HAS apresenta maior incidência com o avançar da idade, sendo mais evidente em mulheres do que em homens com idade igual ou superior a 65 anos, atingindo cerca de 66% da população idosa (JARARI et al., 2016, KOVELL et al., 2016; NGUYEN et al., 2012).

Em 2015, esta enfermidade estimadamente originou gastos diretos e indiretos da ordem de U\$ 118,6 bilhões de dólares nos Estados Unidos da América (EUA) apenas com despesas médicas e custos relacionados à perda da produtividade (HEIDENREICH et al., 2011). Adicionalmente, elevações da pressão sanguínea associada a doenças cardiovasculares acarretaram em 850.000 mortes nos EUA no ano de 2011, de acordo com levantamentos estatísticos obtidos em parceria com o Centros de Controle e Prevenção de Doenças (do inglês, *Centers for Disease Control and Prevention National*, CDC) e Associação Americana do Coração (do inglês, *American Heart Association*, AHA) (MOZAFFARIAN et al., 2015; ROGER et al., 2012). Além disso, o tratamento medicamentoso visando o controle da hipertensão, permeia valores em torno de U\$ 15 bilhões de dólares, totalizando 10% dos gastos com medicações do país (SPURGEON, 2004). A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que anualmente 17 milhões de mortes são atribuídas as doenças cardiovasculares e que 9,4 milhões são geradas devido à hipertensão (WHO, 2013).

No Brasil os gastos públicos diretos advindos da população com HAS são estimados em cerca de U\$ 671,6 milhões de dólares anuais, dados estes, obtidos no ano de 2005 (DIB; RIERA; FERRAZ, 2010). No ano de 2013, R\$ 31,3 milhões (21,4%) de pessoas com 18 anos ou mais de idade informaram que foram diagnosticadas com hipertensão arterial, sendo maior a proporção entre mulheres (24,2%) do que entre homens (18,3%) segundo estudos realizados pela Pesquisa Nacional de Saúde (PNS) (PNS, 2013). As doenças crônicas, são no seu conjunto, as principais responsáveis pelos custos com a saúde, quer sejam eles diretos ou indiretos, como consultas, medicamentos, cuidados de reabilitação, perda da produtividade, qualidade de vida etc. Atualmente o Brasil apesar de apresentar estudos predominantemente regionais e com baixa representatividade do cenário nacional ilustra elevadas despesas públicas oriundas da tentativa de controle da HAS. A grande maioria da população



brasileira (70%) é dependente do Sistema Público de Saúde (SUS), ou seja, não dispõe de recursos financeiros para os gastos médicos (PEREIRA, 2010).

A HAS é definida como uma elevação constante e persistente da pressão arterial, apresentando valores  $\geq 140/90$  mmHg (GOIT; ANSARI, 2016; WHO, 2013). A hipertensão é o maior fator de risco para doenças cardiovasculares, falência cardíaca e renal, ocasionando milhares de mortes prematuras (SMITH et al., 2016; WIDIMSKÝ, 2015). A pressão sanguínea elevada contribui para 62% de todos os acidentes vasculares encefálicos e 49% de todas as doenças cardíacas, afetando 20-50% da população adulta. Apesar dos grandes avanços no tratamento da hipertensão, os riscos cardiovasculares em indivíduos nessa condição aumentam progressivamente. Estudos indicam que a redução ou manutenção da pressão arterial abaixo dos valores recomendados ( $\leq 140/90$  mmHg ou  $\leq 130/80$  mmHg para indivíduos diabéticos) influenciam negativamente sobre a mortalidade. Além disso, estes valores alvos são muito difíceis de alcançar devido a inúmeros fatores, tais como, tratamento ou diagnóstico ineficaz, baixa adesão do paciente ao tratamento clínico ou hipertensão resistente (ausência de resposta ao tratamento convencional) etc (PAULIS; UNGER, 2010; THE ACCORD, 2010). Baseados nessas dificuldades, se faz necessário a investigação dos mecanismos intrínsecos do controle cardiovascular e de neurotransmissores que atuem nestes centros reguladores, auxiliando com isso, o desenvolvimento de novas tecnologias que possam contribuir para minimizar ou retardar sobrecargas de origem cardíaca e vascular.

## 1.2. Mecanismos de ajuste da pressão arterial

A pressão arterial (PA) é mantida estável ou dentro de uma faixa estreita de variação por meio de dois mecanismos: 1) curto prazo (controle neural), responsável pela regulação reflexa da função cardíaca e vascular (ACCORSI-MENDONÇA; MACHADO, 2013; HALL, 1989; THOMAS, 2011); 2) longo prazo (controle neuro-humoral) são mecanismos hormonais (sistema renina-angiotensina-aldosterona e simpático-adrenal) e estão intimamente ligados a volemia. Este sistema exerce ação direta sobre os rins, alterando a excreção de água e sal e conseqüentemente

---

regulando a perda hídrica (LOHMEIER, 2001; THOMAS, 2011). No entanto, apenas o controle neural será discutido e apresentado a seguir.

### **1.2.1. Reflexos cardiovasculares e aferências nervosas**

A regulação neural da PA consiste de um mecanismo de retroalimentação, o feedback negativo, que tem como objetivo corrigir o efeito inicial, trazendo o organismo de volta a homeostase (LA ROVERE; CHRISTENSEN, 2015; REYES DEL PASO et al., 2014). Este sistema é composto por aferências, eferências, receptores, centros de integração cardiovascular e órgãos efetores. As principais aferências envolvidas na regulação autônoma da pressão arterial são: 1) os barorreceptores; 2) quimiorreceptores e 3) receptores cardiopulmonares. No entanto, apenas os barorreceptores (reflexo barorreceptor) será amplamente discutido (ver seção 1.2.2).

Uma das principais aferências corresponde aos barorreceptores, que transmitirá informações de variações periféricas da PA ao SNC, promovendo o desencadeamento do reflexo barorreceptor e modulando o funcionamento cardiocirculatório. Este reflexo é o principal responsável pela regulação momento a momento da pressão arterial, exercendo importante papel na regulação da frequência cardíaca, do débito cardíaco, da contratilidade miocárdica, da vasomotricidade e da distribuição regional do fluxo sanguíneo (DURAND; FAZAN JR; SALGADO, 2012; REYES DEL PASO et al., 2014; THOMAS, 2011). A função primordial do barorreflexo (reflexo barorreceptor) é a de tamponar variações bruscas da PA, em diferentes situações comportamentais como, por exemplo, durante o exercício físico, mudança de postura e sono (GUYENET, 2006).

Os barorreceptores arteriais são terminações nervosas livres, densamente ramificadas e que encontra-se primordialmente agrupadas na porção ascendente do arco aórtico (barorreceptores aórticos), e na parede do seio carótico (barorreceptores caróticos). Todavia, pode também ser localizado na artéria subclávia direita, nas grandes artérias sistêmicas e nas paredes do coração (CHAPLEAU; SABHARWAL, 2011; FAZAN; SALGADO; BARREIRA, 1997; THOMAS, 2011). Tais aferências apresentam sensores ou terminações que podem ser divididos em duas distintas categorias baseadas em sua composição nervosa, sendo elas: 1) fibras nervosas

---

aferentes mielínicas, de condução rápida (fibras do tipo A), ou 2) fibras nervosas amielínicas, de condução lenta (fibras do tipo C) (TURNER, 2015). De forma geral, o barorreflexo se inicia a partir da ativação dos barorreceptores arteriais decorrente de elevações da PA. Estes barorreceptores são mecanorreceptores sensíveis ao estiramento e/ou deformação mecânica das paredes vasculares produzido pela elevação da pressão interna (CHAPLEAU et al., 2001). Os mecanorreceptores tem como função conduzir um processo denominado de transdução. A transdução é a transformação de estímulos físicos em potenciais de ação. Este procedimento depende de alguns fatores: 1) alteração ou deformação da complacência vascular; 2) propriedades viscoelásticas das paredes dos vasos e 3) transformação elétrica de estímulos mecânicos, com conseqüente despolarização das terminações nervosas e conversão em potenciais de ação (CHAPLEAU, 2001).

Na maioria dos animais, as aferências barorreceptoras do arco aórtico carregam informações decorrentes do estiramento dos mecanorreceptores através do nervo depressor aórtico ou nervo de Cyon (ver seção 1.3 para maiores detalhes). Em seguida, esta informação seguirá pelo nervo vago (X par craniano) até alcançar o núcleo do trato solitário (NTS). Em humanos, estas aferências ascendem aos centros de controle cardiocirculatório junto ao nervo vago. Contudo, as aferências barorreceptoras originadas no seio carótico seguem por uma via distinta, ou seja, trafegam pelo nervo do seio carótico (NSC) ou nervo de Hering até se unir ao nervo glossofaríngeo (IX par craniano) para depois adentrar o SNC, atingindo os núcleos bulbares (DURAND; FAZAN JR; SALGADO, 2012; PANNETON; LOEWY, 1980; THOMAS, 2011).

A segunda aferência refere-se aos quimiorreceptores arteriais localizados nos corpos caróticos presentes nas dilatações próximo à bifurcação da artéria carótida comum (quimiorreceptores caróticos) e no arco da aorta e artéria subclávia (quimiorreceptores aórticos). Os impulsos provenientes dos quimiorreceptores caróticos cursam pelo nervo do seio carótico e depois segue através do nervo glossofaríngeo, e por este, ascende até alcançar o NTS no tronco encefálico (bulbo). Vale lembrar que estes nervos apresentam tanto características quimiorreceptoras quanto barorreceptoras (CHAPLEAU; SABHARWAL, 2011; HOUSLEY et al., 1987; MIURA; REIS, 1972; PANNETON; LOEWY, 1980). Os quimiorreceptores aórticos, ascendem ao SNC também pelo nervo vago. Sapru e Krieger (1977) relataram que os

---

NDA de ratos não possuem quimiorreceptores aórticos funcionais, contendo exclusivamente fibras aferentes barorreceptoras (SAPRU; KRIEGER, 1977). Similarmente, Kobayashi et al. (1999) afirmaram que o NDA de ratos não contém um número significativo de quimiorreceptores capazes de contribuir para a formação de quimiorreflexos, por conseguinte não afetam a função pulmonar e cardiovascular (KOBAYASHI et al., 1999). Estudos anatômicos feitos por Barker, Easton e Howe (1980) e Easton e Howe (1983) sugerem a ausência desta categoria de quimiorreceptores em ratos (BARKER; EASTON; HOWE, 1980; EASTON; HOWE, 1983). Além disto, análises voltadas a eletroestimulação vêm demonstrando a existência de diferenças funcionais entre os quimiorreceptores aórticos e caróticos em cachorros (BURGH DALY; UNGAR; 1966; KARIM et al., 1980). Contudo, descrições contrárias ao consenso geral foram relatadas na literatura (CHENG, et al., 1997; HANSEN, 1981).

Do ponto de vista funcional, a ativação dos quimiorreceptores ocorre em decorrência de alterações químicas do sangue arterial, como redução dos níveis de oxigênio (hipóxia) e íons de hidrogênio (pH) ou elevação das taxas de gás carbônico (hipercapnia). Tais variações acarretam em um aumento das descargas quimiorreceptoras, que por sua vez excitará os centros respiratórios para reflexamente aumentar a taxa respiratória e de volume. De modo simultâneo, atuará sobre os centros vasomotores, influenciando a resistência vascular sistêmica, e aumentando o fluxo simpático, trazendo a homeostasia corporal (CHAPLEAU; SABHARWAL, 2011; KUMAR; PRABHAKAR, 2012; THOMAS, 2011).

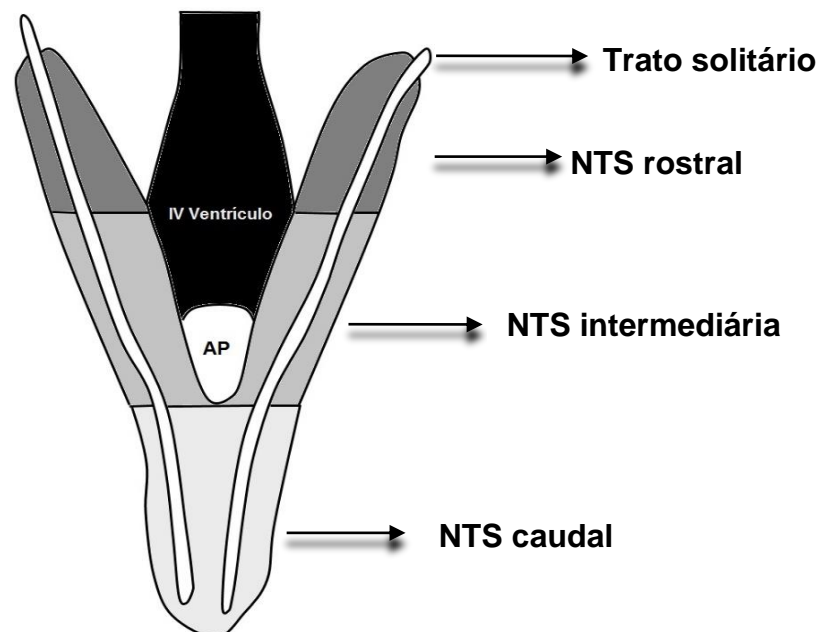
A terceira aferência corresponde aos receptores cardiopulmonares. Estes receptores de baixa pressão são distribuídos pelas câmaras cardíacas e vasos pulmonares que respondem às alterações de volume intratorácico, modulando a atividade simpática eferente e desempenhando um importante papel na regulação da PA e volume. Os receptores cardiopulmonares servem para minimizar alterações da PA em resposta as mudanças do volume sanguíneo. O aumento da descarga destes receptores reduzem o fluxo simpático renal e a liberação pituitária do hormônio vasopressina, através da diminuição da reabsorção de sódio e de água pelos rins, aumentando o volume de urina e conseqüentemente reduzindo o volume sanguíneo. Como o volume sanguíneo afeta o débito cardíaco e a PA, este mecanismo contribue

para a regulação da pressão sanguínea (DURAND; FAZAN JR; SALGADO, 2012; THOMAS, 2011).

Após apresentarmos sucintamente as principais aferências, enfocaremos a seguir na busca pelo entendimento da regulação barorreflexa do sistema cardiovascular, foco de estudo deste projeto.

### 1.2.2. Barorreceptores arteriais e manutenção da pressão arterial

Conforme mencionado anteriormente, a ativação dos barorreceptores arteriais se dará devido a elevação da PA, que promoverá um aumento das descargas elétricas ou potencial de ação. A informação decorrente de variações da PA, via nervo depressor aórtico ou nervo do seio carótico irá trafegar pelos nervos vago e glossofaríngeo, realizando sinapse com neurônios de segunda ordem no NTS. O núcleo do trato solitário é um importante centro de integração do controle cardiovascular e divide-se em 3 porções distintas, considerando a proximidade com a área postrema, o NTS rostral, NTS intermediária (medial e lateral) e NTS caudal, Figura 1.



**Figura 1.** Visão dorsal do núcleo do trato solitário (NTS) mostrando a porção rostrocaudal em três distintos níveis. AP indica área postrema. Adaptado de STREFLAND; JANSEN, 1999.

Entretanto, cada uma destas divisões apresenta inúmeros subnúcleos, com quantidades e características variadas de acordo com as espécies estudadas (COTTLE, 1964; FINLEY; KATZ, 1992; HYDE; MISELIS, 1992; STREEFLAND; JANSEN, 1999). No entanto, Hyde e Miselis (1992) afirma que humanos, ratos, gatos e cachorros possuem uma citoarquitetura semelhante, e que aspectos funcionais e neuroquímicos podem ser mantidos (HYDE; MISELIS, 1992).

As porções intermediária e comissural (subnúcleo da porção caudal) do NTS estão diretamente envolvidas no controle cardiovascular e respiratório, pois recebem as aferências oriundas dos barorreceptores e quimiorreceptores respectivamente (CHITRAVANSI; KACHROO; SAPRU, 1994; FINLEY; KATZ, 1992; GILLIS et al., 1980; TALMAN; PERRONE; REIS, 1980; VALENTI et al., 2007). Vale ressaltar que os corpos celulares destes neurônios aferentes primários estão localizados no gânglio nodoso e petroso (ACCORSI-MENDONÇA; MACHADO, 2013; CONTRERAS; BECKSTEAD; NORGREN, 1982; HELKE; SEAGARD, 2004; KALIA; WELLES, 1980; MENDELOWITZ, 1992; PALKOVITS; ZABORSZKY, 1977; SUMAL et al., 1983; TALMAN; PERRONE; REIS, 1980; WALLACH; LOEWY, 1980).

Simultaneamente, a atividade do barorreflexo promoverá a inibição da atividade simpática e a ativação parassimpática (vagal). Estes dois mecanismos demonstram ser independentemente regulados e ocorrem após a primeira sinapse entre as aferências sensoriais e neurônios de segunda ordem no NTS, através da presença do neurotransmissor glutamato (BENTZEN; GRUNNET, 2011; BROGNARA, 2016; LA ROVERE; CHRISTENSEN, 2015; VALENTINUZZI; SEGURA, 2010; ZANUTTO; WANG et al., 2001). Para que se estabeleça a inibição do fluxo simpático, os neurônios de segunda ordem realizam sinapse com o bulbo ventrolateral caudal (CVLM), onde estímulos excitatórios irão promover a ativação de neurônios simpato-inibitórios (gabaérgicos) localizados nesta região, novamente utilizando o glutamato (DAMPNEY, 2002; MADDEN; SVED, 2003; SCHREIHOFER; GUYENET, 2002; SVED; ITO; MADDEN, 2000).

A região CVLM é rica em neurônios gabaérgicos, alguns dos quais se projetam diretamente ao bulbo ventrolateral rostral (RVLM) e também em neurônios noradrenérgicos (GRANATA; KUMADA; REIS, 1985; GUYENET et al., 2013; SCHREIHOFER; GUYENET, 2002; SILVANI et al., 2015). De forma complementar, alguns autores relataram que a inibição de neurônios localizados na área CVLM,

---

acarreta em aumento da PA (PILOWSKY et al., 1987; SVED; ITO; MADDEN, 2000). Diversas linhas de pesquisa suportam a idéia de que estes neurônios simpato-inibitórios são componentes do reflexo barorreceptor e mostraram que lesões na área CVLM ou no NTS produzem hipertensão (CRAVO; MORRISON; REIS, 1991; DOBA; REIS, 1973; GRANATA et al., 1986).

Os neurônios advindos da porção CVLM por sua vez, enviará estímulos inibitórios através de neurônios gabaérgicos (GABA, Ácido Gama-Aminobutírico) para neurônios simpatoexcitatórios localizados na área RVLM (AGARWAL; CALARESU, 1991; GORDON; SVED, 2002; YU; GORDON, 1996). A inibição dos neurônios da porção RVLM resultará na diminuição de entradas excitatórias para as eferências simpáticas pré-ganglionares da coluna intermédio-lateral (IML), localizado na medula torácica, afetando o controle do reflexo do fluxo simpático (ROSS; RUGGIERO; REIS, 1985). E quando isto ocorre, a atividade da inervação simpática pós-ganglionar para as arteríolas, e coração é reduzida, o que conseqüentemente, reduz a pressão sanguínea e a frequência cardíaca (AICHER et al., 1995; BADOER et al., 1994; GORDON; SVED, 2002). Dampney et al. (2002) demonstraram que o bloqueio desta sinapse inibitória na região RVLM aboliu completamente o barorreflexo, demonstrando o papel crucial deste grupo de neurônios no controle do arco reflexo (DAMPNEY et al., 2002). Além disso, a excitação desta região RVLM produziu um aumento do fluxo simpático e da pressão sanguínea arterial, demonstrando que esta região é tonicamente ativa (DAMPNEY et al., 2003; GUYENET, 1990).

De maneira simultânea, os neurônios de segunda ordem também promoverá a excitação direta ou monosináptica dos neurônios pré-ganglionares parassimpáticos localizados principalmente no núcleo ambíguo e núcleo dorsal vagal e que projetará suas fibras diretamente ao coração através de fibras eferentes, via nervo vago, que realizará sinapse com os neurônios pós ganglionares que inervam os átrios (nó sinoatrial), sendo estes localizados no gânglio cardíaco. Estas regiões contém os corpos celulares dos neurônios pré-ganglionares do sistema nervoso parassimpático, que desencadeia o aumento do tônus vagal sobre o coração (AGARWAL; CALARESU, 1992; ANDRESEN, 2001; OLSHANSKY et al., 2008; ZANUTTO; VALENTINUZZI; SEGURA, 2010). A informação oriunda dos barorreceptores arteriais será transmitida aos órgãos efetores (musculatura lisa, músculo cardíaco e glândulas) por meio das eferências simpática e parassimpática. As fibras parassimpática que





---

Simultaneamente esses neurônios de segunda ordem também atuará sobre os neurônios no bulbo ventrolateral caudal (CVLM), inibindo os neurônios pré-ganglionares simpáticos no bulbo ventrolateral rostral (RVLM). A inibição de neurônios da porção RVLM reduzirá a ativação simpática na coluna intermédio-lateral (IML) da medula torácica espinhal, reduzindo a atividade simpática para vasos e coração.

Em contrapartida, em caso de queda da PA a atividade dos barorreceptores será reduzida. Fato este que acarretará em um aumento da atividade simpática para o coração e vasos, promovendo a redução da atividade vagal cardíaca, fazendo com que a PA retorne aos seus valores basais (THOMAS, 2011).

### **1.3. Nervos depressor aórtico**

#### **1.3.1. Anatomia e morfologia**

O nervo depressor aórtico foi descrito em 1866, pelos pesquisadores alemães Cyon e Ludwig (CYON; LUDWIG, 1866). Foi denominado depressor porque, após sua estimulação elétrica, os pesquisadores observaram queda da pressão arterial sistêmica, bradicardia e vasodilatação periférica. Em ratos, o NDA é a principal aferência barorreceptora, e ascende isoladamente até se unir ao nervo laríngeo superior e adentrar o nervo vago (X), se direcionando ao núcleo do trato solitário no SNC (DE PAULA, 1999; FAZAN; SALGADO; BARREIRA, 1997; PINTO et al., 2016; SAPRU; GONZALEZ; KRIEGER, 1981).

Descrições detalhadas da origem, curso na região cervical, terminação e tipos de fibras dos NDA de coelhos, foram realizadas no início do século XX. Sarkar (1922) utilizando fixação com ácido ósmico e inclusão em parafina, identificou fibras mielínicas de médio e pequeno diâmetros e sugeriu que as fibras finas amielínicas poderiam pertencer ao SNA, com funções eferentes (SARKAR, 1922).

O interesse no NDA de ratos aumentou significativamente a partir dos anos 1950, quando essa espécie animal passou a ser amplamente utilizada nas investigações das funções cardiovasculares. Experimentos com registros da atividade nervosa dos NDA vinham sendo realizados sem informações substanciais sobre a origem, o trajeto e as terminações desse nervo no rato. McCubbin, Masson e Page (1958) descreveram

---

o trajeto cervical do NDA em ratos normotensos da linhagem Sprague-Dawley. Verificaram que, embora os animais estudados fossem da mesma linhagem, o trajeto cervical apresentava-se muito variável. Estes nervos estão presentes, no lado esquerdo, como um fascículo isolado, em apenas metade dos animais. No lado direito, a frequência de aparecimento do NDA isolado é ainda menor. Esses mesmos pesquisadores observaram que quando o NDA não era identificado como um fascículo isolado, a atividade barorreceptora era registrada no nervo vago ou no nervo laríngeo recorrente (MCCUBBIN; MASSON; PAGE, 1958).

A anatomia macroscópica do NDA é relativamente bem conhecida em várias espécies animais tais como coelhos (SARKAR, 1922) gatos (AGOSTINI et al., 1957) e ratos (KRIEGER; MARSEILLAN, 1963). Após o período de 1950, embora o rato fosse o animal de escolha para estudos eletrofisiológicos envolvendo o NDA e funções barorreflexas, estudos microscópicos desse nervo continuaram sendo realizados em animais de maior porte. Devanandan (1964) descreveu o NDA de gatos, sendo o primeiro autor a contar, medir e distribuir as fibras mielínicas do NDA em histogramas de tamanho de fibras. O autor demonstrou que o NDA de gatos apresentam fibras mielínicas finas (menores que 7  $\mu\text{m}$  de diâmetro) (DEVANANDAN, 1964). Schmidt e Stromberg (1967) realizaram um estudo semelhante ao de Devanandan (1964), e descreveram histologicamente o NDA em porcos (DEVANANDAN, 1964; SCHMIDT; STROMBERG, 1967). Esses autores também realizaram contagens, medidas e distribuíram as fibras mielínicas em histogramas de tamanho de fibras, encontrando resultados muito semelhantes aos NDA de porcos comparados aos de gatos. Os autores Brown, Saum e Tuley (1976) confirmaram a presença de fibras amielínicas em NDA de ratos normotensos, através de estudos eletrofisiológicos (BROWN; SAUM; TULEY, 1976).

As características eletrofisiológicas das descargas das fibras mielínicas e amielínicas dos barorreceptores aórticos dos NDA de ratos têm sido estudadas desde os anos 1970 (BROWN; SAUM; TULEY, 1976; BROWN; SAUM; YASUI, 1978; SAPRU; GONZALEZ; KRIEGER, 1981; THORÉN; SAUM; BROWN, 1977). Tais estudos evidenciam que tanto as fibras mielínicas quanto as amielínicas dos NDA de ratos são barorreceptoras.

Embora muitas das características fisiológicas das fibras mielínicas e amielínicas dos NDA de ratos já fossem conhecidas, apenas no final dos anos 1990, um estudo

---

histológico detalhado, tanto em nível de microscopia de luz quanto em nível de microscopia eletrônica de transmissão foi realizado, incluindo informações sobre dimensões e números de fibras mielínicas e amielínicas do NDA de ratos normotensos. Fazan, Salgado e Barreira (1997) descreveram que o NDA de ratos normotensos é monofasciculado, sendo o diâmetro desse fascículo constante (40 µm), desde sua origem (próxima ao arco da aorta – segmento distal do nervo) até sua terminação (no nervo laríngeo superior - segmento proximal do nervo). Segundo os referidos autores, o nervo depressor aórtico apresenta, em média, 440 axônios, sendo 20% mielinizados e 80% amielínicos. O histograma de distribuição de tamanho das fibras mielínicas é unimodal e essas fibras apresentam diâmetro médio de 2,5 µm. O histograma de distribuição de tamanho das fibras amielínicas é também unimodal e o diâmetro médio dessas fibras é de 0,5 µm (FAZAN; SALGADO; BARREIRA, 1997).

Estudos comparativos entre os NDA de ratos normotensos e espontaneamente hipertensos (FAZAN et al., 1999; FAZAN; SALGADO; BARREIRA, 2001; FAZAN; SALGADO; BARREIRA, 2005) demonstraram que, embora o número de fibras mielínicas seja o mesmo, essas fibras apresentam diâmetros menores nos ratos hipertensos (FAZAN et al., 1999). As fibras amielínicas dos NDA dos ratos hipertensos além de apresentarem diâmetros menores (FAZAN; SALGADO; BARREIRA, 2001), encontram-se em menor número quando comparados aos NDA de ratos normotensos (relação de fibras amielínica:mielínica de 6:1 em ratos normotensos e de 3:1 em ratos espontaneamente hipertensos). Além disso, a relação entre a espessura da bainha de mielina e o tamanho do axônio das fibras mielínicas se encontram alteradas nos NDA de ratos espontaneamente hipertensos, comparado aos normotensos (FAZAN; SALGADO; BARREIRA, 2005). Reforçando este achados anatômicos, Doba e Reis (1973) relataram que a desnervação do NDA e do seio carótico em várias espécies de animais resultaram em uma elevação sustentada da pressão arterial sistêmica (DOBA; REIS, 1973). Esses dados morfológicos corroboram com as alterações do barorreflexo observadas através de abordagens funcionais em ratos hipertensos.

Em seres humanos não é possível evidenciar o nervo depressor aórtico de forma isolada, como ocorre em um grande número de animais. Em humanos, as aferências barorreceptoras trafegam junto ao nervo vago, ou seja, pequenos ramos vagais carregam impulsos oriundos dos barorreceptores aórticos (FADEL, 2008; TIMMERS et al., 2003) dificultando possíveis análises isoladas destas estruturas.

---

A real contribuição dos barorreceptores aórticos ou caróticos atuando no controle da frequência cardíaca em humanos permanece não esclarecida em sua totalidade devido a incapacidade de promover a estimulação seletiva de aferências barorreceptoras (FERGUSON; ABBOUD; MARK, 1985) ou a indisponibilidade de técnicas adequadas para investigar a influência dos barorreceptores arteriais sobre a pressão arterial (MANCIA et al., 1979). Diante de tal realidade, os barorreceptores aórticos associados com drogas vasoativas ou por meio de manobras (valsalva, vagal) vêm sendo investigados a fim de tentar compreender a importância do reflexo baroreceptor na regulação cardiovascular em humanos utilizando distintos métodos de análises (FERGUSON; ABBOUD; MARK, 1985; MANCIA et al., 1979; RUDAS et al., 1999; SANDERS; FERGUSON; MARK, 1988). Outra abordagem adotada refere-se à investigação ou estimulação do seio carótico, sendo esta amplamente pesquisada em humanos (EPSTEIN et al., 1969; HEUSSER et al., 2010; QUERRY et al., 2001; REA; ECKBERG, 1987). Todavia divergências vêm sendo pontuadas decorrente de diferenças metodológicas encontradas nestes trabalhos. Baseados nestas limitações, a modalidade ou extensão do controle da PA pelos barorreceptores arteriais têm sido amplamente pesquisado em animais.

Sendo o rato o modelo animal mais comumente utilizado em estudos que envolvem a regulação da PA e, sendo o NDA responsável pela aferência do barorreflexo, descrições morfológicas e morfométricas detalhadas desse nervo, associadas aos parâmetros funcionais e imunohistoquímicos, são dados importantes para futuras investigações de bases estruturais de respostas barorreflexas alteradas em condições fisiopatológicas tais como hipertensão, envelhecimento, arteriosclerose, diabetes e neuropatias periféricas.

## 1.4. Nervos frênicos

O nervo frênico é responsável por promover a inervação motora e sensorial ao músculo diafragma em humanos (DAVIS, 1967; MAISH, 2010; MULLER BOTHA, 1957), ratos (GOTTSCHALL, 1981; GOTTSCHALL; GRUBER, 1977; KORNELIUSSEN; WAERHAUG, 1973), gatos (RIKARD-BELL; BYSTRZYCKA, 1980; SANT'AMBROGIO, 1963) coelhos (MULLER BOTHA, 1957) e cachorros (LANDAU;

AKERT; ROBERTS, 1962). Em humanos, a parte motora do diafragma é innervado principalmente pelos nervos frênicos direito e esquerdo que se originam no plexo cervical a partir dos ramos ventrais de C3, C4 e C5, enquanto que a innervação sensorial é feita também por ramos dos nervos intercostais (ANRAKU; SHARGALL, 2009; MAISH, 2010; MULLER BOTHA, 1957). Em ratos esta musculatura é innervada predominantemente pelos ramos de C4 e C5, sendo detectado frequentemente o nervo frênico acessório em C6 (GOTTSCHALL, 1981; GOTTSCHALL; GRUBER, 1977).

O nervo frênico atravessa a cavidade torácica posteriormente e segue anteriormente ao pericárdio e em seguida perfura o diafragma. Cada nervo divide-se em quatro troncos: antero-lateral, póstero-lateral, esternal e tronco crural. A principal função do músculo diafragma é a respiração, além de servir como uma barreira física que separa o tórax do abdome. Durante o processo de inspiração o diafragma se contrai, e com o auxílio da musculatura intercostal externa a cavidade torácica se expande reduzindo a pressão intratorácica, permitindo a entrada de ar nos pulmões. A expiração normalmente ocorre de forma passiva devido ao relaxamento dos músculos inspiratórios, resultando na diminuição do volume da caixa torácica (ANRAKU; SHARGALL, 2009; MAISH, 2010). As lesões dos nervos frênicos acarretam em sérias disfunções da musculatura diafragmática, prejudicando o trabalho e eficiência respiratória. Em casos mais graves ocasionam paralisia diafragmática, atelectasias e taquipnéia (SIMANSKY et al., 2002; WILCOX et al., 1988).

Em humanos, o nervo frênico também é reconhecido como um nervo misto pois possui um predominate número de fibras mielínicas de grande diâmetro, apresentando em menor proporção fibras amielínicas de pequeno diâmetro que carregam sinais aferentes a partir do diafragma em direção ao SNC (MORÉLOT-PANZINI et al., 2009). Com relação aos aspectos morfométricos e morfológicos, estudos envolvendo a investigação de nervos periféricos em humanos são raros. Teixeira, Aranda e Becker (1992) com o auxílio de um microscópio eletrônico acompanharam o desenvolvimento do diâmetro axonal do nervo frênico em crianças com 3 dias até os 8 anos de idade e classificaram os axônios em dois grupos: mielínicos (0.1-0.5  $\mu\text{m}$  até 10  $\mu\text{m}$ ) e amielínicos (0.1-0.5  $\mu\text{m}$  até 3.0  $\mu\text{m}$ ), confirmando as descrições literárias (TEIXEIRA; ARANDA; BECKER, 1992).

---

Em animais, Langford e Schmidt (1983) demonstraram que os nervos frênicos esquerdo de ratos Wistar, pesando 250-400g, contém aproximadamente 700 axônios, sendo 404 (57%) mielínicos e 300 (43%) amielínicos (LANGFORD; SCHMIDT, 1983). Gottschall e Gruber (1977) descreveram 368 axônios mielínicos em nervos frênicos de ratos Wistar machos pesando igualmente 250-400g (GOTTSCHALL; GRUBER, 1977). Rodrigues Filho e Fazan (2006) e Rodrigues et al. (2011) divulgaram resultados morfométricos bastante similares em nervos frênicos de ratos machos e fêmeas das linhagens Wistar e Wistar- Kyoto (RODRIGUES FILHO; FAZAN, 2006; RODRIGUES et al., 2011). Similarmente, os autores Landau, Akert e Roberts (1962) constataram que 55 a 65% da população de axônios do nervo frênico de cachorros são eferentes (LANDAU; AKERT; ROBERTS, 1962). Apesar da pesquisa sobre esta temática revelar a utilização de distintos procedimentos técnico-científicos os achados se assemelham.

Estudos imunohistoquímicos no sistema nervoso periférico são esporádicos, sendo mais comumente pesquisados os nervos isquiático, vago e frênico através de distintas técnicas como radioimunoensaio (MALTHE-SØRENSEN; ØKTEDALEN, 1982; WHITE; HELME, 1985; BRIMIJOIN et al., 1980), cromatografia (WHITE; HELME, 1985), imunofluorescência (BRIMIJOIN et al., 1980; GAMSE; LEMBECK; CUELLO, 1979) etc. Todavia, a maioria destes estudos detectam apenas a concentração dos neurotransmissores e não abordam os aspectos morfológicos de tais elementos, havendo portanto, a necessidade de uma investigação mais detalhada e específica e com alto grau de preservação tecidual. A reduzida qualidade tecidual dificulta a visualização precisa das estruturas nervosas.

## 1.5. Neurotransmissores

A seguir será discutido brevemente as principais características de dois distintos neurotransmissores, a substância P e a enzima colina acetiltransferase, que foram submetidos a técnica de imunohistoquímica. Esta técnica foi postulada inicialmente por Coons, Creech e Jones (1941) no qual descreveram um método imunofluorescente para detecção de antígenos em tecidos através da conjugação de um anticorpo com um corante fluorescente (COONS; CREECH; JONES, 1941). Desde

---

então este método de imunocoloração vem sendo amplamente utilizado no diagnóstico anátomo-patológico através da ligação específica de um anticorpo com um antígeno, auxiliando no processo de localização de biomarcadores e proteínas expressas em diferentes partes de um tecido biológico. Uma vez que a interação antígeno-anticorpo ocorra, surge uma reação de cor visível por microscopia de luz ou luz ultravioleta, possibilitando a identificação do antígeno (proteína) (BRANDTZAEG, 1998; RAMOS-VARA, 2005). Vinte e cinco anos mais tarde, a enzima *horseradish peroxidase* (HRP) associada com o cromógeno 3'3-DAB (Diaminobenzidina tetra hidratado) foi usada para estudar rins de camundongos (GRAHAM; KARNOVSKY, 1966). Depois de quase duas décadas, Hancock desenvolveu o método DAB com níquel, no qual foi adicionado o sulfato de amônio e níquel, levando a um produto de reação preta a fim de facilitar a visualização das estruturas imunomarcadas (HANCOCK, 1984). E através desta técnica, muitos autores conseguiram identificar a presença da SP e da CAT em distintas regiões do sistema nervoso central (SNC) e periférico de roedores (CUELLO; FIACCO; PAXINOS, 1978; FACTOR; HART; JONAKAIT, 1993; GRAHAM et al., 2007; HEBB; KRNJEVIC; SILVER, 1964; INAGAKI et al., 1982; JONAKAIT; WALKER; HART, 1991; LEE et al., 1985; WALKER et al., 1991).

A técnica de imunohistoquímica apresenta metodologias bastante diversificadas, podendo ser direta ou indireta. No método direto os anticorpos primários são conjugados diretamente com enzimas, fluoróforos, biotina ou ouro coloidal, ou seja, o anticorpo que possui o marcador se liga diretamente ao antígeno, resultando numa única etapa, simples e rápida (RAMOS-VARA, 2005). Este método é adequado apenas quando os anticorpos estão disponíveis em uma quantidade suficiente para que a imunomarcação ocorra, sendo este um teste com baixa sensibilidade devido a pequena amplificação do sinal (HEYDERMAN, 1979). No método indireto, o anticorpo primário não é marcado, mantendo uma maior atividade e um sinal mais forte, aumentando com isso a intensidade da reação. Todavia, o anticorpo secundário deverá ser marcado contra o primário. Além disso, esta técnica apresenta vantagens adicionais, onde o anticorpo secundário poderá ser usado para detectar diferentes anticorpos primários concomitantemente. Entre os métodos indiretos destaca-se a peroxidase-antiperoxidase (PAP) e a avidina-biotina-peroxidase (ABC) e mais recentemente os polímeros (BERGROTH, 1983; HEYDERMAN, 1979; RAMOS-

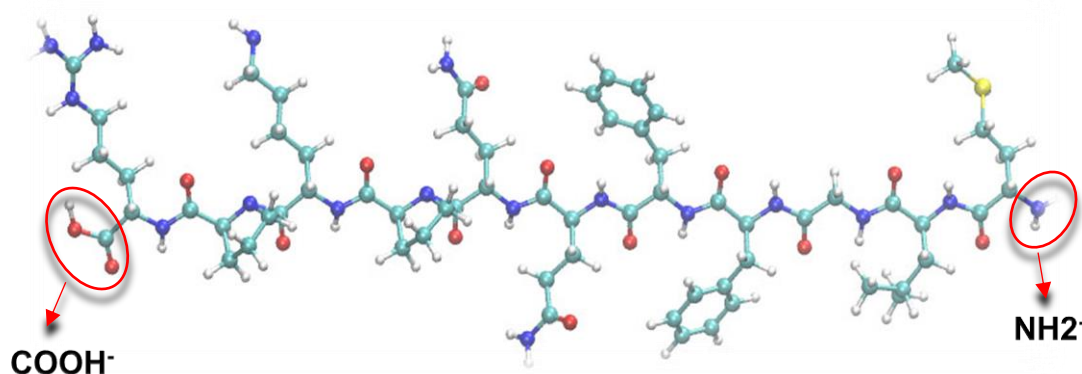
---

VARA, 2005; VANDESANDE, 1979). Posteriormente ao método ABC surgiram inovações utilizando a streptavidina, conhecida como *Labelled Avidin-Biotin* (LAB) e a *Labelled Streptavidin-Biotin* (LSAB), sendo esta última adotada neste estudo. Esta técnica divide-se basicamente em três etapas: 1) aplicação do anticorpo primário dirigido contra o antígeno; 2) aplicação do anticorpo secundário biotilado dirigido contra o anticorpo primário e 3) streptavidina marcada normalmente com HRP ou fosfatase alcalina, substâncias estas que irão possibilitar a visualização, conferindo cor ao local da ligação antígeno-anticorpo (ELIAS; MARGIOTTA; GABORC, 1989; RAMOS-VARA, 2005). Este método de marcação imunoenzimática utiliza reações do tipo enzima-substrato para obterem produtos finais coloridos a partir de cromógenos. A HRP é a enzima mais comumente usada para esta proposta, obtida a partir da raiz do rábano *Armoracia rusticana*. Este composto apresenta um grupo heme (hematina) que forma um complexo com o peróxido de hidrogênio (substrato), provocando sua decomposição em água e oxigênio. Este complexo enzima-substrato irá oxidar um dador de elétrons (3'3-DAB) ao reagir com o peróxido de hidrogênio, ocasionando a cor marrom no local da reação onde ocorreu a ligação antígeno-anticorpo (DAKO, 2013; VEITCH, 2004; WEIR et al., 1974).

### 1.5.1. Substância P

A substância P foi descoberta em 1931 por Von Euler, sendo extraída a partir do cérebro e intestino de cavalos, apresentando ações hipotensivas e com atuação sobre a contratilidade da musculatura lisa (HARRISON; GEPPEI, 2001; VON EULER; GADUM, 1931). O nome substância P, que caracteriza este neuropeptídeo, foi dado por Gaddum e Schild (1934), referindo-se ao pó "P" obtido após o processo de extração. Contudo, somente em 1971 isolaram e caracterizaram a estrutura de aminoácidos que compõem a SP a partir de estudos em hipotálamo de bovinos (CHANG; LEEMAN; NIALL, 1971; GADDUM; SCHILD, 1934) Figura 3.



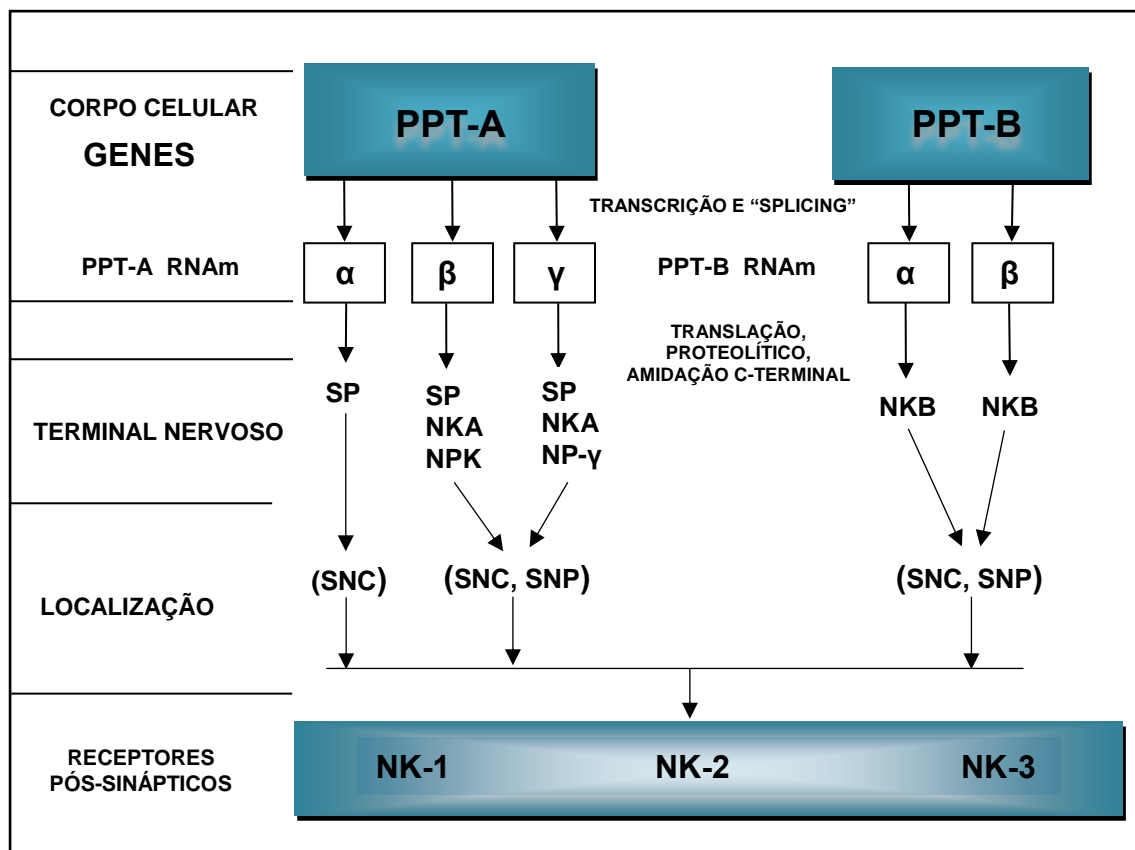


**Figura 3.** Estrutura molecular da substância P, H-Arg<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup>-Lys<sup>3</sup>-Pro<sup>4</sup>-Gln<sup>5</sup>-Gln<sup>6</sup>-Phe<sup>7</sup>-Phe<sup>8</sup>-Gly<sup>9</sup>-Leu<sup>10</sup>-Met<sup>11</sup>-NH<sup>2</sup>, desenvolvida através do programa Avogadro (HANWELL et al., 2012), que possibilita a edição e montagem de moléculas.

Uma década depois, a SP foi introduzida como membro da família de taquicininas. Os peptídeos que constituem essa classe de taquicininas são a SP, neurocinina A (NKA), neurocinina B (NKB), neurocinina K (NPK) e neurocinina  $\gamma$  (NP- $\gamma$ ). Estes peptídeos por sua vez, exibem atividades biológicas similares e compartilham uma sequência C-terminal comum (COOH<sup>-</sup>) e uma distinta região N-terminal (NH<sub>2</sub>). A região C-terminal é crucial para ativação dos receptores neurocinérgicos do tipo NK1, NK2 e NK3, enquanto a região N-terminal é responsável pela especificidade ao receptor (CASCIERI et al., 1992; GUARD; WATSON, 1991; KRAUSE et al., 1987; PAGE, 2004). Diversos estudos têm mostrado que estas taquicininas são derivadas de precursores codificados por dois genes com características similares, a preprotaquicinina (PPT) A, B e C (GUARD; WATSON, 1991; KURTZ et al., 2002; ZHANG et al., 2000).

A preprotaquicinina A codifica três RNAm (do inglês, *Messenger Ribonucleic Acid*) do tipo  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ , que por sua vez, dará origem aos neuropeptídeos SP, NKA, NPK e NP- $\gamma$ . Todavia a preprotaquicinina B irá codificar apenas o NKB, apresentando apenas dois RNAm ( $\alpha$  e  $\beta$ ) (CARTER; KRAUSE, 1990; GUARD; WATSON, 1991; KRAUSE et al., 1987; NAWA; KOTANI; NAKANISHI, 1984). As sequências precursoras da SP são codificadas por todos RNAm oriundos do gene PPT-A, enquanto NKA, NPK e NP- $\gamma$  derivam dos RNAm ( $\beta$  e  $\gamma$ ). A preprotaquicinina C foi descoberta recentemente, e origina a hemocinina 1 (HK-1) e as endocininas (EKA, EKB, EKC, EKD) (KURTZ et al., 2002; PAGE et al., 2003; ZHANG et al., 2000). Belluci et al. (2002) afirmam que a HK-1 apresenta similaridades em relação a SP, atuando

sobre os receptores NK1, NK2 e NK3, mas com alta afinidade por NK1 (BELLUCCI et al., 2002; MORTEAU et al., 2001) ver representação diagramática de alguns genes na Figura 4.



**Figura 4.** Expressão dos genes PPT (Adaptado de GUARD; WATSON,1991; HARRISON; GEPPETI, 2001).

Atualmente, três tipos de receptores taquicininas vêm sendo amplamente discutidos NK1, NK2 e NK3. Os receptores NK1 exibem preferência para SP, mas isto não implica que este neuropeptídeo atue apenas nesta classe de receptores, podendo ativar também os receptores NK2 e NK3. Contudo, distintas ações da SP são mediadas pelo receptor NK1, sendo este expresso à nível central e periférico estando presente em neurônios, células vasculares endoteliais, músculo e diferente tipos de células imunes (MAENO; KIYAMA; TOHYAMA, 1993; MAGGI, 1995; REGOLI et al., 1994; PENNEFATHER et al., 2004). Após a ligação da SP com o receptor NK1, ocorrerá uma rápida endocitose e internalização do receptor, contribuindo para a dessensibilização das células à sinalização da SP, que é seguidamente degradada

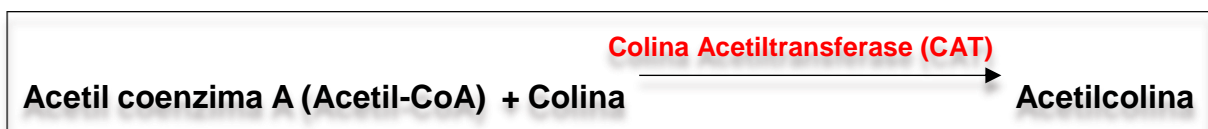
em um compartimento ácido (GARLAND et al., 1994). No SNP, a ativação deste receptor ocasiona importantes efeitos como a vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, contração da musculatura lisa e estimulação de secreções salivares e aéreas (MAGGI, 1995). Os receptores NK2 e NK3 por sua vez exibem preferência para a NKA e NKB respectivamente (REGOLI et al., 1994).

A SP encontra-se localizada em áreas cerebrais envolvidas na regulação neural reflexa da PA no sistema nervoso central e em neurônios sensoriais de aferências primárias de distintas fibras amielínicas, atuando sobre inúmeros tecidos periféricos (ARAI; EMSON, 1986; GILLIS et al., 1980; HELKE; O'DONOHUE; JACOBOWITZ, 1980; HELKE; SEAGARD, 2004; UNGER et al., 1981). Além disso, receptores NK1 que apresentam alta afinidade à SP foram identificados em regiões centrais e periféricas contribuindo para o fortalecimento da hipótese de participação da SP na modulação ou excitação reflexa autonômica (GAMBOA-ESTEVEZ; MCWILLIAM; BATTEN, 2004; MALEY; SASEK; SEYBOLD, 1988; MAZZONE; GERAGHTY, 1999).

Entretanto, em nenhum dos trabalhos supramencionados, foi realizado um estudo detalhado, investigando a presença da SP no nervo depressor aórtico, sendo uma descrição apenas sugestiva. Contudo, a confirmação deste neurotransmissor em aferências barorreceptoras periféricas ainda é desconhecida. Existe, portanto a necessidade explorativa de tal levantamento.

### 1.5.2. Acetilcolina e acetiltransferase

A acetilcolina (ACo) é sintetizada nos terminais nervosos a partir da acetilcoenzima A (acetil-CoA) e da colina em uma reação catalisada pela colina acetiltransferase (CAT, sintetizada dentro do pericário “corpo neuronal”), Figura 5.



**Figura 5.** Reação catalizada pela colina acetiltransferase (CAT) para síntese da acetilcolina.

---

A presença de CAT no sistema nervoso periférico é uma forte indicação de que a acetilcolina seja utilizada como um de seus neurotransmissores. A colina está presente no citoplasma, e é captada por neurônios colinérgicos a fim de atuar na síntese da ACo nos terminais nervosos. Após a sintetização da acetilcolina, esta é rapidamente transportada para o interior das vesículas, onde fica armazenada de forma muito concentrada, até o momento de sua liberação na fenda sináptica. Com a liberação da acetilcolina na fenda sináptica pode ocorrer dois distintos fenômenos: 1) a acetilcolina é hidrolisada em acetato e colina pela enzima acetilcolinesterase (ACoE), que encontra-se concentrada na fenda sináptica, assegurando uma rápida diminuição na concentração deste neurotransmissor no terminal pré-sináptico; 2) ligação a receptores específicos na superfície da célula pós sináptica a partir do disparo de um potencial de ação que estimulou a exocitose da ACo de vesículas pré-sinápticas (ODA, 1999; PURVES et al., 2005; USDIN et al., 1995).

A acetilcolina participa do controle central e periférico do movimento, funcionamento do sistema nervoso autônomo, regulação do sono e de múltiplos processos cognitivos como memória, atenção e aprendizado (GOLD, 2003; SARTER; PARIKH, 2005). Este neurotransmissor exerce suas funções fisiológicas através da ativação de duas distintas famílias de receptores conhecidos como colinérgicos, os receptores nicotínicos e muscarínicos (CAULFIELD; BIRDSALL, 1998). O termo colinérgico refere-se aos receptores que respondem à ACo.

Os receptores nicotínicos (ionotrópicos) se encontram principalmente em junções neuromusculares, gânglios autonômicos periféricos e SNC, sendo estes ativados com a liberação da acetilcolina nas sinapses. No SNP, são mediadores-chave no processo de contração da musculatura esquelética, e no SNC, estão envolvidos em vários processos relacionados às funções cognitivas, aprendizado e memória, controle motor e analgesia. Este termo nicotínico e muscarínico deve-se a presença da nicotina e da muscarina, que também se liga a esta classe de receptores colinérgicos. Os receptores muscarínicos (metabotrópicos, associados a proteína G) são encontrados em órgãos-alvo do sistema parassimpático e em certos alvos do sistema simpático, vasos sanguíneos de músculos esqueléticos, gânglios e SNC (hipocampo, córtex e tálamo) (JENSEN et al., 2005; TIWARI et al., 2013).

Atualmente estudos imunohistoquímicos voltados para a identificação da CAT vêm sendo bastante utilizados na investigação de procedimentos cirúrgicos para

---

reconexão axonal (neurorrafia) a fim de verificar processos regenerativos (CAO et al., 1999; GRAHAM et al., 2007). Contudo, descrições acerca de imunomarcações envolvendo a caracterização da CAT em fibras nervosas periféricas são relativamente escassas.

## **1.6. Fixação de tecidos**

### **1.6.1. Glutaraldeído versus formoldeído**

O glutaraldeído tem sido considerado um excelente agente de formação cruzada, resultando em insolubilizações de proteínas, promovendo com isso uma fixação relativamente não distorcida das estruturas celulares (HABEEB; HIRAMOTO, 1968). Esse composto vêm sendo utilizado como o principal fixativo para técnicas de microscopia eletrônica por Sabatini, Bensch e Barnett (1963), garantindo uma boa preservação ultraestrutural dos tecidos. No entanto, o formoldeído vêm sendo amplamente usado como o principal fixativo em análises imunohistoquímicas, devido ao seu elevado grau de penetração tecidual, boa capacidade de preservação sobre a imunorreatividade quando comparado ao glutaraldeído (SABATINI; BENSCH; BARNETT, 1963). Em contrapartida, alguns autores sugerem que o glutaraldeído é provavelmente mais efetivo na preservação morfológica (BEROD; HARTMAN; PUJOL, 1981). Além disso, o uso do glutaraldeído envolvendo a localização morfológica de neurotransmissores em nervos periféricos são escassamente compreendidos.

No sistema nervoso periférico (SNP), a utilização do glutaraldeído como fixativo primário ainda não foi apropriadamente descrito. No sistema nervoso central, a SP e a CAT têm sido consideravelmente discutidas (CUELLO; KANAZAWA, 1978; HOUSER et al., 1983; MCGEER et al., 1974; SHULTS et al., 1984). No entanto, ambos os neurotransmissores não foram completamente explorados a nível periférico.

Estudos imunohistoquímicos envolvendo nervos periféricos e a aplicação do glutaraldeído como fixador primário são raros, sendo os fixativos mais comumente usados: mistura de ácido picríco e paraformoldeído (FRIED; BRODIN; THEODORSSON, 1989), mistura de formoldeído a 4% e glutaraldeído 0,5-1% “Faglu”

(COSTA et al., 1980; FURNESS; HEATH; COSTA, 1978), “Karnovsky” ou fixação em solução tamponante contendo dois diferentes aldeídos, formoldeído a 4% e glutaraldeído a 2,5% (KARNOVSKY, 1965) ou apenas paraformoldeído em distintas concentrações “Bouin’s fluid” (GRAHAM et al., 2007; STOLL et al., 1989; TANIUCHI et al., 1988).

As preocupações básicas relacionadas a fixação do tecido no SNP não diferem da metodologia aplicada à tecidos localizados no SNC (medula espinhal ou cérebro). Em análises morfológicas ultraestruturais (microscópio eletrônico ou transmissão) o glutaraldeído à 2,5-3% é o método de escolha, sendo preferível a fixação por perfusão. No entanto, não é aconselhado a utilização do glutaraldeído para a realização de análises imunohistoquímicas, devido a capacidade de interferência deste fixativo sobre a detecção dos antígenos. Neste caso, o paraformoldeído é o método indicado para a identificação da ligação específica entre antígeno-anticorpo, sendo usado em concentrações que variam de 1-4%, ocasionando uma má preservação da bainha de mielina. Todavia, para corrigir este efeito, a adição do glutaraldeído em pequenas concentrações (0,1-0,2%) é usualmente aplicada. Por fim, quando a fixação por perfusão torna-se inviável, a fixação por imersão poderá ser usada. Este método não é tido como padrão-ouro porém têm sido bastante utilizado em condutas imunohistoquímicas. O perineuro dos nervos periféricos fornecem uma barreira de difusão, e o glutaraldeído penetra lentamente nos feixes de fibra nervosa. Recomenda-se que nervos grandes sejam cortados no sentido longitudinal (FIX; GARMAN, 2000; JORTNER, 2011; KASUKURTHI et al., 2009). A maioria dos estudos optam pela perfusão para lavagem e fixação dos tecidos utilizando o paraformoldeído. Baseados nessas necessidades, um dos objetivos deste estudo foi o de demonstrar a viabilidade do uso do glutaraldeído através da fixação por imersão, como um fixativo primário, auxiliando na identificação de neurotransmissores dentro do sistema nervoso periférico.

O referido trabalho mostra-se de grande valia, pois o modelo apresentado é pioneiro e inovador, propiciando o esclarecimento de mecanismos intrínsecos do nervo depressor aórtico e sua participação como barorreceptor aórtico no sistema cardiovascular, atuando como possível trajeto de neurotransmissores aferentes.

---

**OBJETIVOS**

## **2. OBJETIVOS**

Neste trabalho tivemos os seguintes objetivos:

### **2.1. Objetivos gerais:**

- 1) Padronização da técnica de imunohistoquímica para neurotransmissores em nervos fixados em altas concentrações de glutaraldeído (2,5%). Nervos frênicos de ratos Wistar machos, normotensos, com 20 semanas de idade, foram utilizados e dois neurotransmissores, a substância P (SP) e a enzima colina acetiltransferase (CAT) foram testados.
- 2) Verificação da viabilidade de aplicação da técnica padronizada em nervos frênicos, para o Nervo Depressor Aórtico (NDA).

### **2.2. Objetivos específicos:**

- 1) Identificação e localização da substância P em axônios do nervo depressor aórtico de ratos Wistar, machos e fêmeas, normotensos, com 20 semanas de idade, fixados em altas concentrações de glutaraldeído a 2,5%.
- 2) Quantificação da substância P imunomarcada em axônios do nervo depressor aórtico de ratos Wistar, machos e fêmeas, normotensos, com 20 semanas de idade, a fim de verificar possíveis diferenças entre gêneros.



---

## **MATERIAL E MÉTODOS**

---

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Animais

O referido estudo foi desenvolvido em duas etapas. A primeira parte corresponde a padronização e/ou otimização da técnica de imunohistoquímica em nervos frênicos de ratos Wistar através da localização e caracterização do neurotransmissor SP e da enzima CAT. A segunda fase, trata-se da identificação e quantificação da SP no nervo depressor aórtico, sendo este, um possível neurotransmissor ou neuromodulador do reflexo barorreceptor.

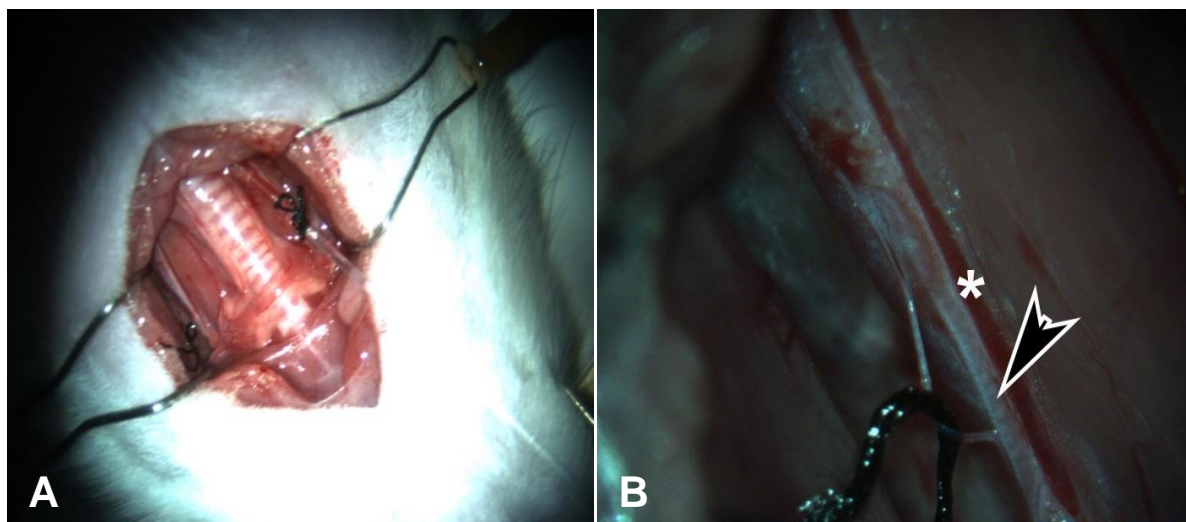
Foram utilizados no total 38 ratos da linhagem Wistar (*Rattus Norvegicus*), normotensos, com 20 semanas de idade, machos e fêmeas. Deste total, 16 animais machos (N=8: SP; N=8: CAT) pesando aproximadamente  $599\pm 19$ g foram destinados à padronização da técnica de IHQ em nervos frênicos. E para a caracterização e quantificação da SP em nervos depressores aórticos foram utilizados 22 ratos Wistar, sendo 12 machos e 10 fêmeas pesando  $627\pm 13,2$  e  $381\pm 5,6$ , respectivamente.

Os animais provenientes do biotério central da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto foram mantidos, em trios, em gaiolas plásticas grandes (34 x 42 x 37 cm), em ambiente com ventilação forçada, temperatura controlada entre 21 e 23 °C, umidade relativa do ar entre 40 e 70% e ciclo claro/escuro de 12 horas. Os animais, até o dia do experimento, tiveram livre acesso à água e ração padrão para roedores (Nuvilab CR1 – Nuvital®). O projeto está de acordo com os princípios éticos da experimentação animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) sob protocolo USP nº 001/2009 (ver Anexo, seção 8.1).

#### 3.2. Procedimentos cirúrgicos

Imediatamente antes do experimento, os animais foram pesados, e anestesiados com pentobarbital sódico (Nembutal, Laboratório Abbott, Illinois), na dose de 40 mg/Kg, por via intraperitoneal. Os animais foram posicionados na mesa cirúrgica em decúbito dorsal, com as patas fixadas em abdução e submetidos a cervicotomia. A

dissecação da artéria carótida foi realizada para a medida direta da pressão arterial e o NDA do lado esquerdo (próximo à clavícula até antes da entrada no nervo laríngeo superior), quando presente isoladamente, foi dissecado e posicionado sobre um eletrodo de aço bipolar para registro de sua atividade espontânea, Figura 6.



**Figura 6.** A) Cervicotomia para exposição do nervo depressor aórtico esquerdo. O nariz do animal se encontra na parte inferior da imagem. O nervo aórtico origina-se das artérias aorta (arco) a esquerda, ou artéria subclávia direita; B) Note a exposição do referido nervo em rato Wistar macho (linha preta) próximo ao nervo vago esquerdo, X par craniano (seta) e artéria carótida comum esquerda (\*).

A atividade nervosa, sincrônica com os pulsos de pressão arterial foi amplificada por meio de um pré-amplificador de alta impedância (modelo 113, Princeton Applied Research), e o sinal passado por um filtro ativo passa-banda (100 Hz a 3 kHz). Tal atividade foi visualizada num osciloscópio (modelo 5113, Tektronics, Inc.) e monitorizada por um alto-falante. Um integrador de atividade nervosa (modelo 605C, University of Iowa Bioengineering) foi utilizado para contar, em intervalos de 200 ms, os potenciais que excedem uma determinada voltagem selecionada imediatamente acima do nível de ruído. Essa atividade foi registrada através de um conversor analógico/digital (Lynx, Tecnologia Eletrônica Ltda) e gravada (100 Hz) no disco rígido de um microcomputador (IBM/PC-AT 486) simultaneamente com os registros da pressão arterial pulsátil. Após o registro da atividade nervosa e da pressão arterial pulsátil, o nervo depressor aórtico foi removido, e mantido em solução fixadora composta por glutaraldeído a 2,5% em tampão fosfato 0,1M, pH 7.4.

Após esta etapa, a sensibilidade dolorosa foi novamente verificada, a fim de constatar a eficácia do anestésico. Em seguida foram submetidos a uma ampla toracotomia e foram retirados os nervos frênicos direitos e esquerdos (proximal e distal) da face lateral do pericárdio até o diafragma e armazenados em solução fixadora. Imediatamente após a retirada deste nervo, os animais foram devidamente eutanasiados.

### 3.3. Procedimentos histológicos

Após a dissecação, todos os nervos foram esticados sobre uma tira de papel filtro, para que não houvesse retração dos mesmos. A seguir, os nervos foram armazenados numa solução fixadora, composta de glutaraldeído a 2,5% em tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 7.4 por 72 horas, sob agitação orbital contínua, em temperatura ambiente a 20°C. Finalizada esta etapa, os nervos foram imersos em distintas concentrações crescentes de sacarose (10%- 24h; 20%-24h e 30%-24h) totalizando 72 horas em geladeira, a 4°C. Posteriormente, os nervos foram congelados em OCT (do inglês *Optimal Cutting Temperature*) e gelo seco, sendo armazenados a -80°C, até o momento do corte do material e futura análise por IHQ. Devido ao tamanho reduzido do nervo depressor aórtico, optou-se por realizar o congelamento dos dois nervos em conjunto, para que fosse mais fácil a identificação do NDA nos cortes transversais. O segmento proximal esquerdo do nervo frênico foi congelado junto ao NDA, tornando viável a visualização do material durante o processo de corte histológico.

### 3.4. Imunohistoquímica

#### 3.4.1. Substância P e colina acetiltransferase

Os nervos foram cortados em secções longitudinais semifinas (16µm) e transversais (18µm) em toda sua extensão. Com os nervos isolados, cortados e

previamente posicionados nas lâminas silanizadas (Starfrost, Waldemar Knittel, Alemanha), iniciou-se a primeira etapa da IHQ. Os nervos foram submetidos a três lavagens com Tris-PBS-Triton (10mM Tris, 0.9% NaCl, 0.05% thimerosal, T5125-Sigma) em 10 mM de tampão fosfato 0.4M, pH 7.4, contendo 0.3% Triton X-100 (TPBS-Triton) por 10 minutos.

Em seguida, foram realizadas as etapas de bloqueio com soro de cavalo (NHS) a 10% em TPBS-Triton, por 30 minutos. Posteriormente os cortes foram incubados em uma solução contendo o anticorpo primário diluído em 10% de soro de cavalo e TPBS-Triton por 24 horas, a 20°C. O anticorpo primário policlonal de coelho anti-substância P (RMSP I/2; 1:10.000; MORRIS et al., 1986) e o anticorpo primário policlonal de cabra anti-colina acetiltransferase (CAT; 1:1.000; Chemicon, Millipore AB144P) foram utilizados.

Após a incubação com o anticorpo primário, os cortes foram imersos em anticorpo secundário biotilado de burro anti-coelho e burro anti-cabra (1:500, 711-065-152; 705-065-003, Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA respectivamente) por 24 horas a 20°C. Com a finalização desta incubação, as lâminas foram transferidas para o conjugado extravidina-peroxidase (1: 500, E-2886; Sigma) por 24 horas.

Para revelação da imunorreatividade à SP e colina acetiltransferase, os cortes foram mergulhados por 5 minutos em uma solução contendo DAB (3,3` diaminobenzidina tetra hidratado, DAB-D 5637 Sigma, 50 mg/ml) intensificado com 1% de níquel (Ni-DAB) em 10 mM de tampão fosfato de sódio 0,4 M, pH 7.4 e água destilada (LEVEY et al., 1986; LLEWELLYN-SMITH; PILOWSKY; MINSON, 1993). Após os 5 minutos, a primeira solução com DAB foi retirada e uma segunda solução de DAB + peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 0.3%) foi novamente acrescida por apenas 2 minutos, a fim de se promover uma reação insolúvel em álcool (de coloração levemente acastanhada a preta). Em seguida, as lâminas foram submetidas a processos de desidratação (álcoois) e diafanização com xileno "xilol".

Todas as etapas descritas acima foram realizadas em câmara úmida com temperatura ambiente controlada a 20° C, a fim de evitar o ressecamento do material biológico, Figura 7.



**Figura 7.** Ilustração da câmara úmida utilizada em todas as etapas imunohistoquímicas.

Após a revelação, as lâminas foram desidratadas em concentrações crescentes de etanol (25%, 35%, 50%, 70%, 75%, 80%, 95%, e duas vezes em 100%, 1 minuto cada etapa), diafanizadas com xilol puro (duas vezes, 1 minuto cada etapa) e montadas com Permount (Fisher Scientific). Todas as reações foram acompanhadas por lâminas de controles negativos, onde os anticorpos primários e secundários foram omitidos. Este procedimento assegura a especificidade e a reprodutibilidade do método.

### 3.5. Análise qualitativa dos nervos frênicos

Os cortes semifinos obtidos dos nervos frênicos foram observados quanto à disposição dos elementos neuronais e conjuntivos que constituem o nervo, sendo analisados de forma observacional quanto ao seu aspecto e arranjo dos neurônios sensitivos e motores. As estruturas imunomarcadas à SP e CAT foram avaliadas e discutidas de forma semelhante.

### 3.6. Análise quantitativa dos nervos depressores aórticos

O processo de quantificação das regiões imunorreativas à SP foi realizado na segunda etapa do projeto (ver seção 4.4.1), onde apenas os NDA de ratos machos e fêmeas foram calculados. As imagens das seções transversais imunomarcadas foram digitalizadas através da utilização de um microscópio de luz (Carl Zeiss Imager, M1) acoplado com uma câmera digital AxioCam MRC5. Para a digitalização das imagens, foram utilizadas as objetivas de 100x e um conjunto de lentes auxiliares (optovar) de 1,25. Após o processo de digitalização, o cálculo da área imunomarcada e a área total dos fascículos foram obtidos a fim de quantificar o valor percentual da área imunorreativa à SP através do programa Image J (versão 1, 49, National Institute of Health, Wayne Rasband, EUA), sendo o sistema de unidade padronizado em  $\mu\text{m}^2$ . A quantificação da área imunomarcada foi realizada de maneira que o observador não tinha conhecimento do gênero do animal que estava sendo observado. Foram avaliados 10 nervos (5 de machos e 5 de fêmeas) sendo quantificadas cinco seções para cada animal.

### 3.7. Análise estatística

O teste de Shapiro Wilk (SW) foi aplicado para testar a normalidade da distribuição de todas as variáveis investigadas. Para as análises paramétricas, comparações entre os grupos foram realizadas através do teste T para amostras independentes e para as amostras não paramétricas optou-se pelo teste de Mann-Whitney. As análises estatísticas e gráficos foram realizados por meio dos programas (SPSS, versão 22, IBM Corporation, 2013 e SigmaPlot, versão 12,5, Systat 2011), respectivamente.

---

**RESULTADOS**



---

## 4. RESULTADOS

De forma similar aos métodos, os resultados são apresentados em duas partes. A primeira refere-se aos dados oriundos da padronização da técnica imunohistoquímica, envolvendo a identificação qualitativa da SP e CAT em nervos frênicos. E a segunda parte corresponde à quantificação e caracterização da SP em nervos depressores aórticos.

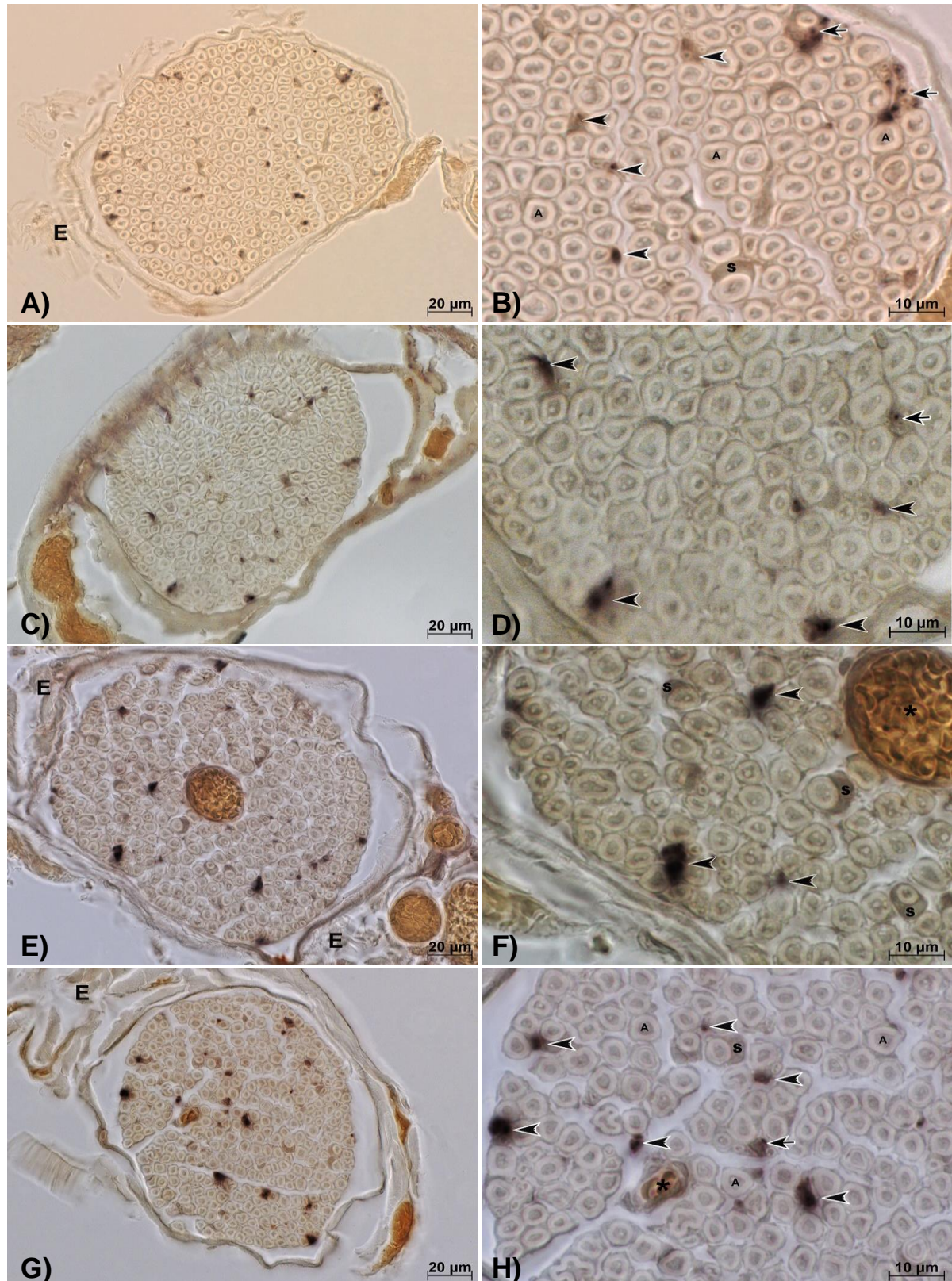
### 4.1. Substância P em nervos frênicos

A análise das secções transversais e longitudinais semifinas dos nervos frênicos através da técnica de microscopia de luz, demonstraram evidente e intensa imunorreatividade à SP, sendo esta, facilmente visualizada dentro do espaço endoneural.

A figura 8 ilustra uma boa preservação de todos os segmentos dos nervos frênicos (proximal e distal) de ambos os lados (direito e esquerdo) apresentando um único fascículo, sendo este circundado por um epineuro bem definido. O nervo frênico mostrado abaixo, é constituído por fibras mielínicas e amielínicas, apresentando diâmetros e formatos variados, sendo estas distribuídas no espaço endoneural.

Em cortes transversais, os nervos frênicos direito e esquerdo apresentaram uma imunomarcção positiva e bem distinta da SP em conjuntos de fibras amielínicas (tipo C) e em fibras de pequeno diâmetro (A-delta) localizadas próximo a periferia do endoneuro, Figura 8.

A figura 8 ilustra uma grande quantidade de fibras mielínicas de grande ou médio diâmetro, consideradas fibras de condução nervosa rápida (tipo alfa, beta e gama). Contudo, não houve uma imunomarcção positiva à SP nesta classe de fibras motoras. Nestas secções a bainha de mielina é facilmente visualizada envolvendo o axoplasma (citoplasma do axônio) das fibras mielínicas.

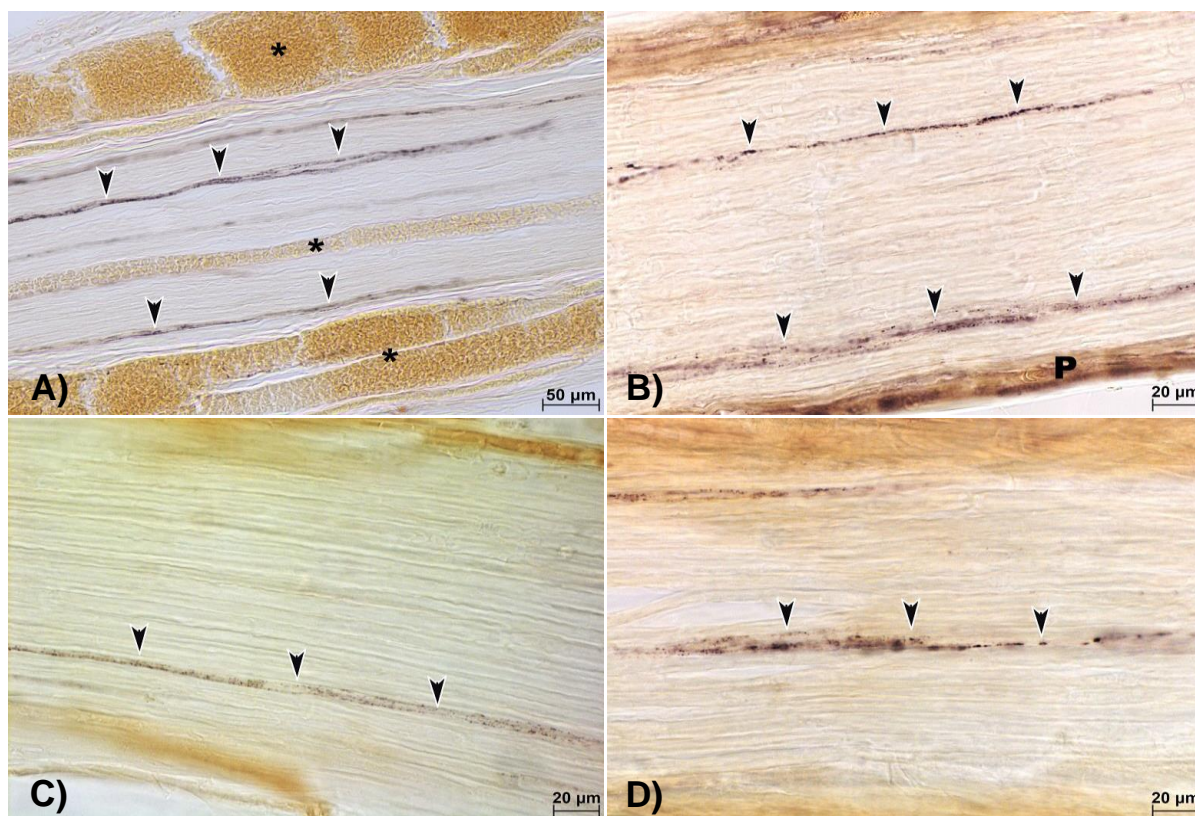


**Figura 8.** Cortes transversais do nervo frênico esquerdo de ratos Wistar machos, segmento proximal (Painéis A, B) e distal (Painéis C, D). Note a possível presença de aglomerados de fibras amielínicas (tipo C, não visível) situado perto do perineuro na periferia do nervo e dispersos no espaço endoneural (cabeça de setas, B, D, F e H). Secções transversais do nervo frênico direito, segmento proximal (Painéis E, F) e distal (Painéis G, H). Granulações positivas à SP e intensificadas pela utilização do níquel (Ni-DAB, resultou em coloração preta

e levemente acastanhada) foram intensamente coradas em feixes de fibras mielinizadas de pequeno diâmetro (tipo A-delta) (ver setas, B, D e H). As letras E indicam o epineuro (A, E e G). As letras S evidenciam o núcleo de uma célula de Schwann envolvendo fibras mielínicas de grande diâmetro (tipo A). As letras A ilustram o axoplasma das fibras mielínicas. Objetivas de 40x (20µm) e 100x (10µm) foram utilizadas para a captura das imagens. (\*) Ilustra vasos sanguíneos endoneurais.

Em cortes longitudinais (Figura 9), a disposição de fibras positivas para SP se apresenta em feixes que acompanham o eixo longitudinal do nervo, mais evidentes na periferia do endoneuro, próximos ao perineuro, confirmando os achados dos cortes transversais.

A figura 9 evidencia uma grande quantidade de granulações imunorreativas à SP que se coram em preto. O endoneuro se cora num tom amarelo claro após o processo de diafanização, acentuando a positividade da marcação. O perineuro aparece como várias camadas de células achatadas (9B) e de coloração marrom claro. Note a presença de um vaso sanguíneo preenchido com pequenas hemácias coradas em amarelo no interior do endoneuro, Figura 9A.



**Figura 9.** Cortes longitudinais do nervo frênico esquerdo de ratos Wistar machos, segmento proximal (Painel A) e distal (Painel B). Note pequenas granulações densamente marcadas ao longo da superfície do nervo (cabeça de setas). (Painel C) corresponde ao segmento proximal

---

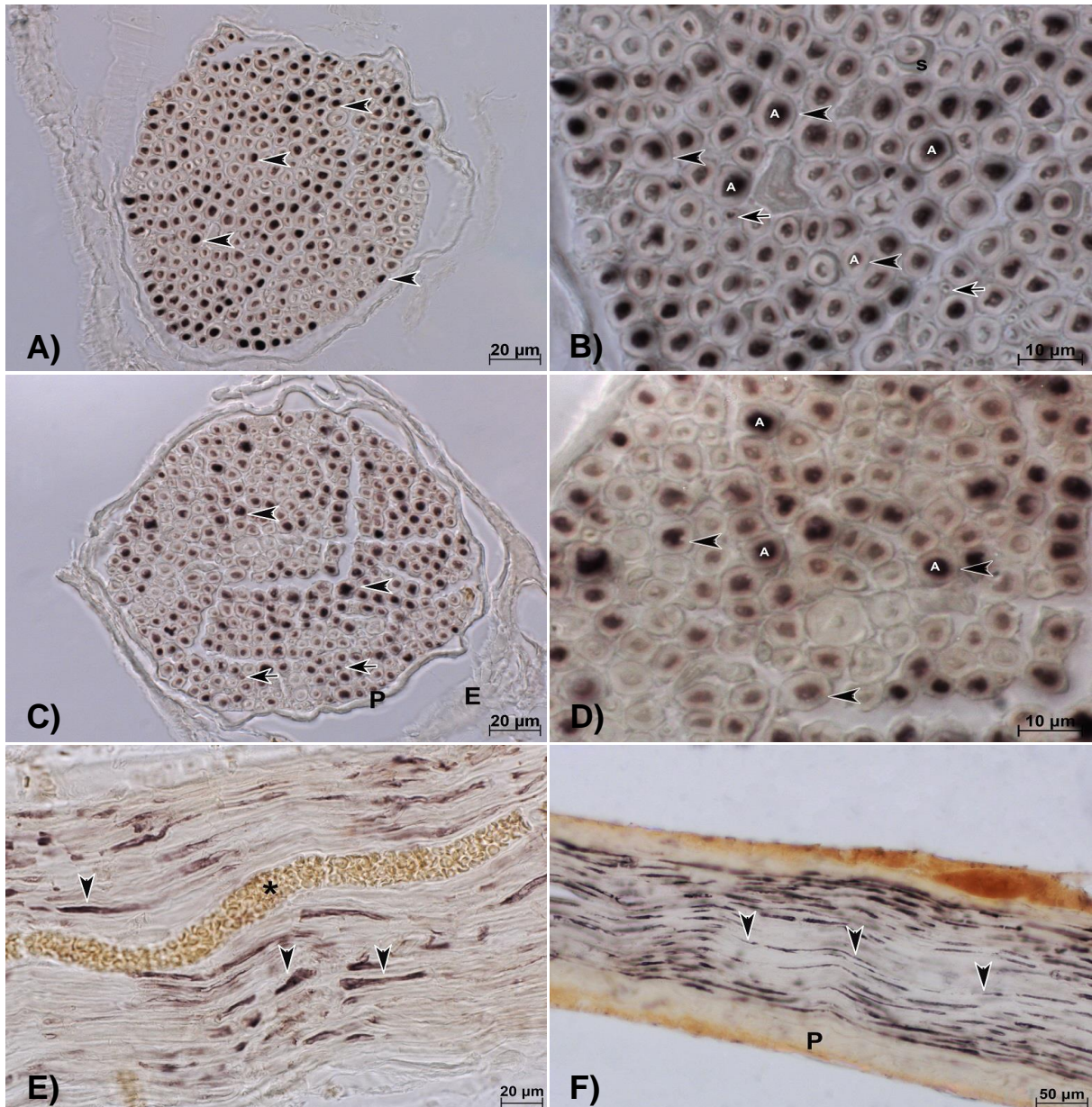
(Painel D) e distal do nervo frênico direito de ratos machos. Detalhe da imunohistoquímica, mostrando uma marcação positiva para SP, sendo esta bastante focalizada e seguindo o trajeto da fibra nervosa. (\*) Indica vasos sanguíneos. Objetivas de 20x (50 µm) e 40x (20 µm).

## 4.2. Colina acetiltransferase em nervos frênicos

As fibras de grande, médio e pequeno diâmetro imunorreativas à colina acetiltransferase (CAT) são visualizadas em cortes transversais de nervos frênicos de ratos normotensos, Figura 10.

A figura 10 (A, B, C e D) mostra intensa marcação positiva em axônios mielínicos calibrosos que correspondem as fibras nervosas do tipo alfa, beta e gama. Esses achados estão em situação contrária à descrição acima, onde apenas as fibras amielínicas e de pequeno diâmetro (A-delta) foram imunomarcadas à SP, fornecendo um panorama favorável a aplicabilidade desta técnica em NDA de ratos, devido sua eficácia na diferenciação de fibras nervosas sensoriais e motoras. Notar que as bainhas de mielina não se encontram imunomarcadas, sendo a presença de CAT confirmada no interior dos axônios somente.

Em cortes longitudinais figura 10 (E, F) os segmentos distais apresentam uma intensa marcação sugerindo que há um acúmulo de CAT em terminações nervosas.



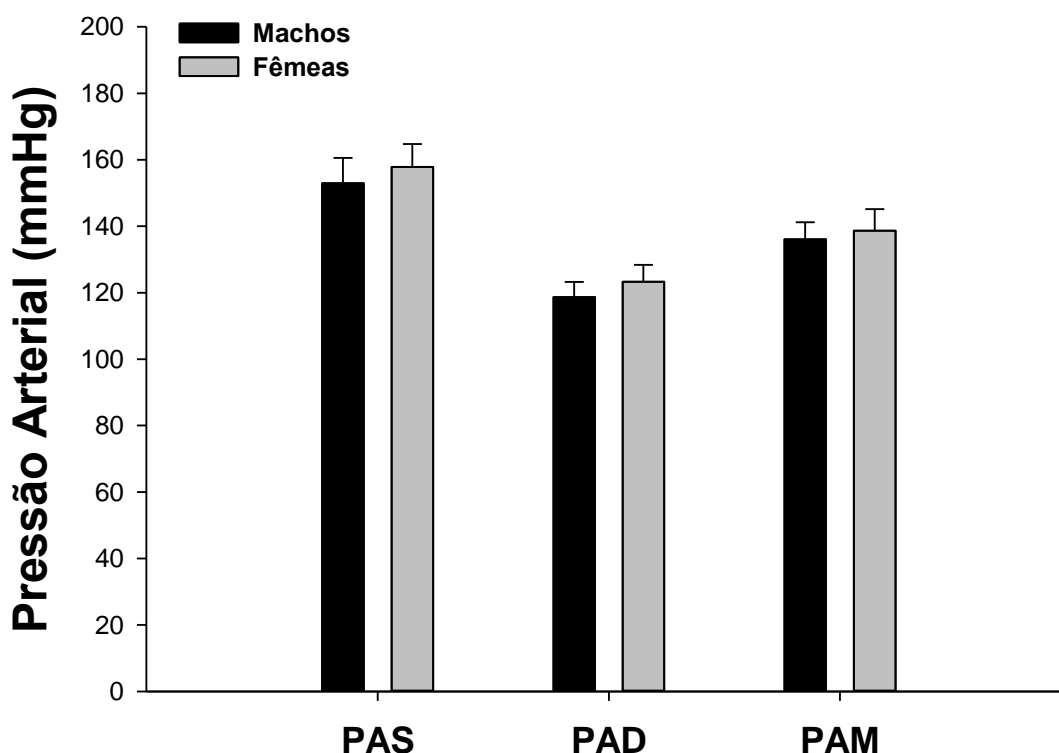
**Figura 10.** Cortes transversais do nervo frênico proximal (Painéis A, B, C, D) mostrando uma evidente imunopositividade para CAT em axônios mielínicos de grande, médio (cabeças de seta) e de pequeno diâmetro (setas). Inúmeras linhas axonais coradas ao longo dos feixes de fibras nervosas confirmam a presença desta enzima, precursora da acetilcolina em cortes longitudinais proximal (Painel E) e distal (Painel F). As letras P ilustram o perineuro. A letra S indica o núcleo de uma célula de Schwann. As letras A mostram o axoplasma das fibras mielínicas. (\*) Eritrócitos no vaso sanguíneo. Objetivas de 20x (50 μm) e 40x (20 μm).

Ainda, tanto nos cortes transversais quanto nos longitudinais, a imunomarcção para CAT mostra que as fibras motoras estão dispersas por todo o espaço endoneural, diferentemente do observado para a SP.

### 4.3. Nervos depressor aórtico

#### 4.3.1. Dados fisiológicos

A figura 11 mostra os valores médios da pressão arterial de ratos machos e fêmeas, coletados após cervicotomia e dissecação da artéria carótida apresentando valores basais de pressão arterial sistólica, diastólica e média. A comparação entre gêneros não apresentou diferenças significativas em relação a estes parâmetros  $p > 0,05$ .



**Figura 11.** Parâmetros fisiológicos da pressão arterial sistólica (PAS), diastólica (PAD) e média (PAM) dos ratos Wistar machos e fêmeas. Valores expressos em Média  $\pm$  Erro padrão.

Como esperado, diferenças estatisticamente significativas foram encontradas nas variáveis peso, sendo os machos maiores e 61% mais pesados do que as fêmeas  $p = 0,001$ , ver valores médios na seção 3.1.

---

## 4.4. Aspectos morfológicos e imunohistoquímicos

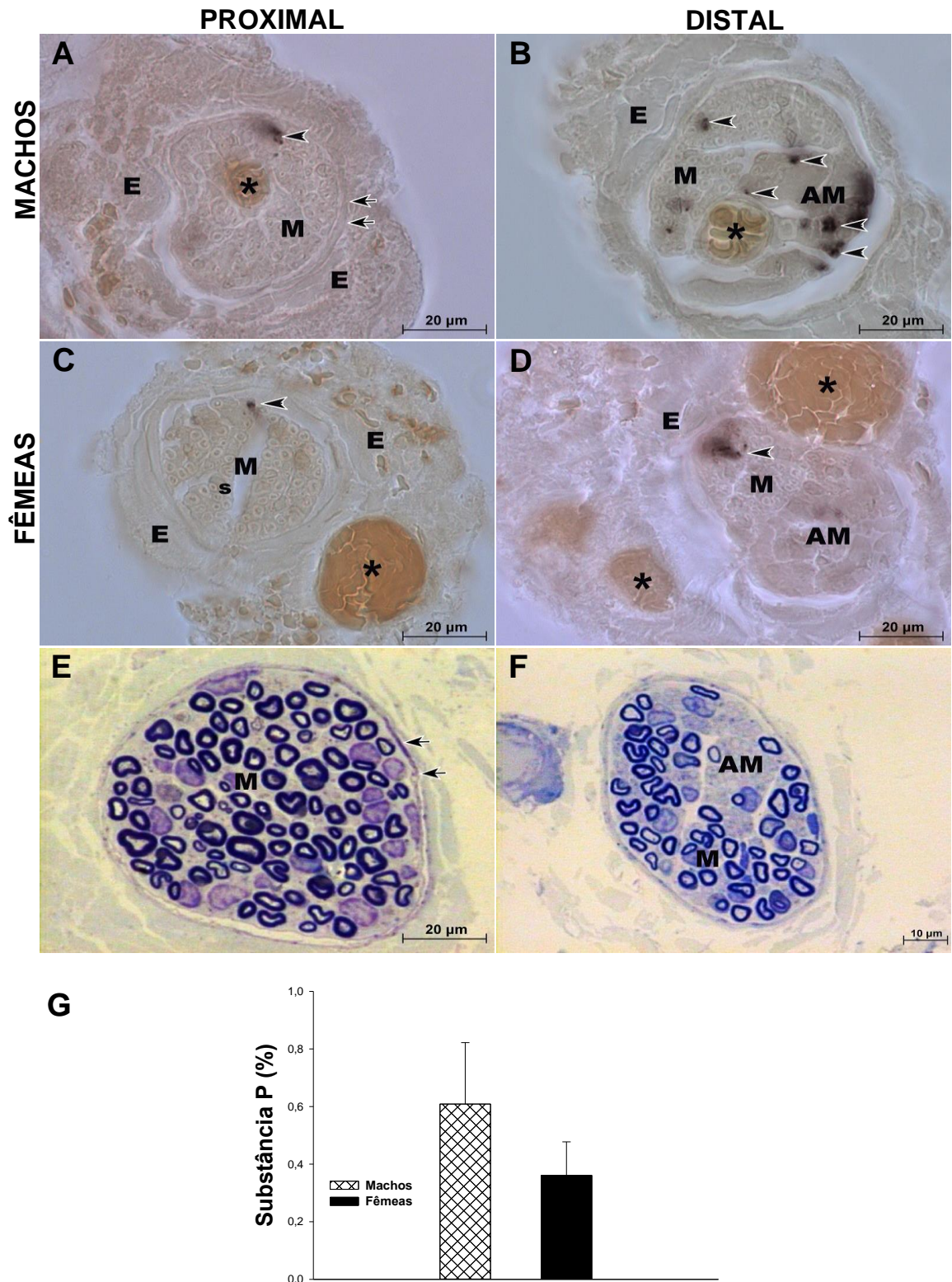
### 4.4.1. Substância P

Nossos resultados demonstram de forma inédita a presença da SP em aferências barorreceptoras do nervo depressor aórtico esquerdo de ratos machos e fêmeas.

A figura 12 (A,B,C e D) ilustra secções transversais com uma evidente e intensa imunopositividade à SP em feixes de axônios amielínicos (tipo C) e fibras de pequeno diâmetro (tipo A-delta) em segmentos proximais e distais do NDA, sendo esta constatação semelhante aos achados obtidos durante a padronização da técnica utilizando os nervos frênicos. Notamos a presença de uma maior positividade à SP em segmentos distais, localização onde aparentemente predomina-se os conjuntos de fibras amielínicas.

Em segmentos proximais não houve uma separação regional entre axônios mielínicos e amielínicos, mostrando uma distribuição uniforme de fibras mielínicas de pequeno, médio e principalmente grande calibre. Notamos a presença de uma imunomarcção mais puntual nos segmentos proximais (ver Figuras 12 A e C). Em contraste, em segmentos distais (próximo ao arco aórtico) foi possível visualizar uma evidente delimitação entre estas duas classes de fibras nervosas. Percebe-se uma distribuição assimétrica das fibras mielínicas (M) e amielínicas (AM) dentro do espaço endoneural (12B) com intensa reatividade ao referido neuropeptídeo e com inúmeras áreas imunomarcadas, na porção que contém uma maior quantidade de fibras amielínicas. De forma complementar, secções transversais semifinas do NDA foram coradas com azul de toluidina a 1% com a finalidade de evidenciar a disposição das fibras mielínicas e amielínicas (12 E e F), possibilitando a verificação de similaridades com nossos achados imunohistoquímicos.

Por fim, a figura 12G ilustra o percentual comparativo de marcação entre os gêneros, com aparente predomínio da SP em machos, sem diferença significativa  $p > 0,05$ . A área fascicular mostrou-se maior em ratos machos ( $2479,6 \mu\text{m}^2 \pm 260,9$ ) comparado com as fêmeas ( $1689,2 \mu\text{m}^2 \pm 177,2$ ),  $p = 0,037$  com uma diferença de 32% entre os gêneros.

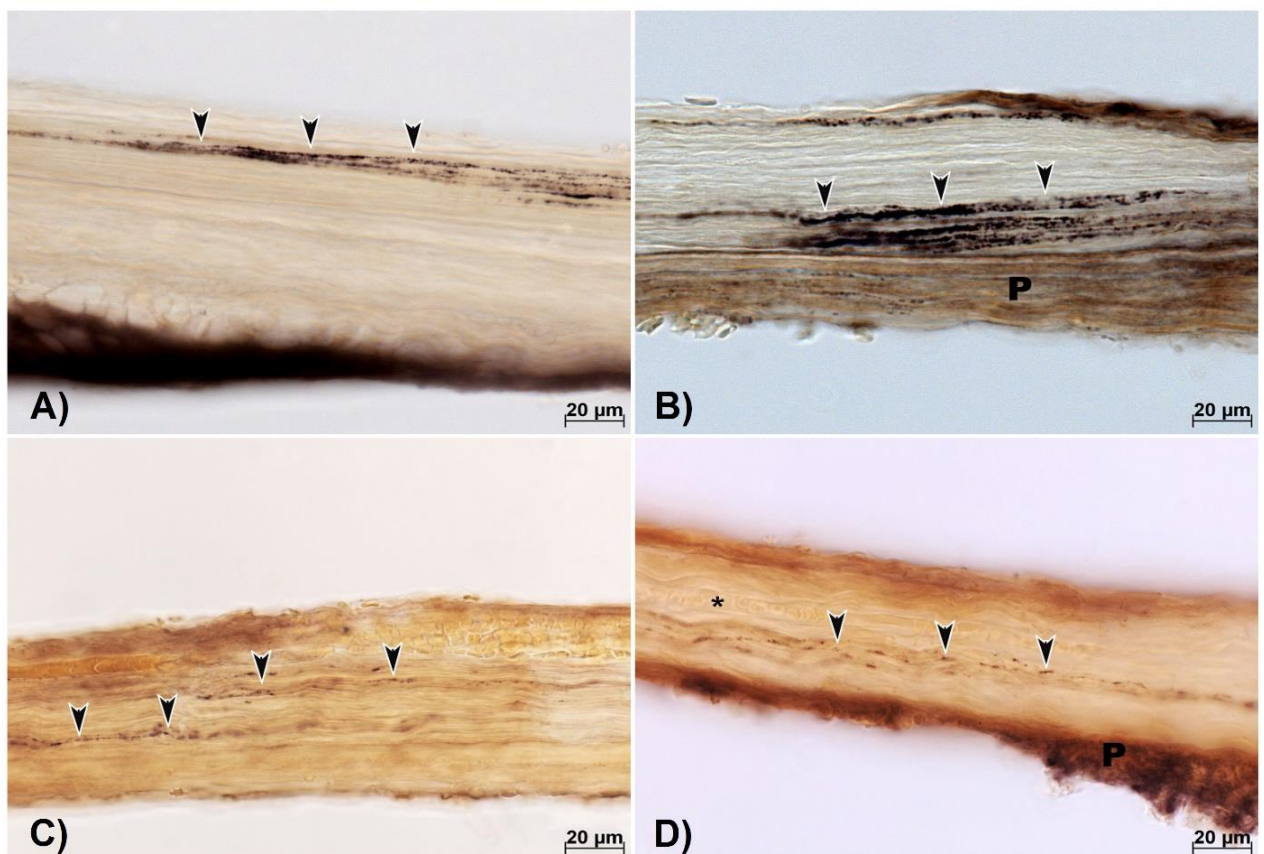


**Figura 12.** (A, C) Corte transversal do segmento proximal do NDA (lado esquerdo) ratos Wistar machos e fêmeas respectivamente, contendo visíveis conjuntos de fibras miélicas de grande, médio e pequeno calibre (M). Granulações positivas à SP e intensificadas pela utilização do níquel (Ni-DAB, resultando em coloração preta e levemente acastanhada) foram intensamente coradas de forma pontualizada próximo ao perineuro, ver setas; (B, D) Corte transversal do segmento distal, mostrando feixes de axônios amiélicos (AM) e miélicos (M) em ratos machos e fêmeas respectivamente; Ver (E, F) para fins meramente



comparativos, perceba a disposição das fibras mielínicas e amielínicas em imagens morfológicas do NDA, corroborando com os achados imunohistoquímicos; (G) Percentual da área total imunomarcada, comparação entre machos e fêmeas. A letra S indica o núcleo de uma célula de Schwann envolvendo uma fibra mielínica. (\*) Indica vasos sanguíneos. Objetivas de 100x+1,25 optovar (20µm) e 100x+1,6 optovar (10 µm).

Em cortes longitudinais (Figura 13) identificamos grande quantidade de grânulos densamente corados ao longo dos feixes de fibras nervosas. Esses feixes acompanham o eixo longitudinal do nervo e a maioria se localiza na periferia, no espaço endoneural muito próximo ao perineuro, confirmando os achados dos cortes transversais. O fascículo do nervo é circundado por tecido conectivo chamado perineuro, de coloração marrom-escuro. A região central da fibra nervosa devido ao processo de diafanização adotou uma coloração amarelada que possibilitou uma maior acentuação da marcação ao neuropeptídeo.



**Figura 13.** Cortes longitudinais do NDA esquerdo de ratos Wistar machos (A, C) e fêmeas (B, D) altamente reativos à SP foram intensamente marcadas em feixes de possíveis fibras amielínicas (tipo C). Observe a distribuição de densas granulações dentro de fibras nervosas aferentes (cabeças de setas), localizadas próximo ao perineuro (P). (\*) Vasos sanguíneos endoneurais. Objetivas de 40x.

---

**DISCUSSÃO**

## 5. DISCUSSÃO

A fixação por imersão utilizando glutaraldeído a 2,5% em 0,1M de fosfato de sódio possibilitou a preservação da imunorreatividade para neuropeptídeos e marcadores colinérgicos em nervos periféricos. Com a utilização de um microscópio de luz, esta técnica mostrou-se eficaz na preservação da morfologia tecidual, sem amplificar os sinais de coloração de fundo “background”.

Contraditoriamente, um limitado número de autores descreveram a eficiência e a utilidade do uso de altas concentrações de glutaraldeído não apenas para os estudos de microscopia eletrônica, mas também para a microscopia de luz em imunohistoquímica envolvendo o sistema nervoso central (KOSAKA et al., 1986; LLEWELLYN-SMITH; MINSON, 1992). Corroborando com nossos achados, Mrini et al. (1995) descreveram que cortes de tecidos cerebrais de ratos perfundidos com 3,5% de glutaraldeído apresentaram uma qualidade equivalente ou superior quando comparados com outras misturas (paraformaldeído 4% + glutaraldeído 0,05-0,2%) para a maioria dos antígenos pesquisados. Dos dezessete antígenos investigados neste trabalho, a fixação por glutaraldeído puro obteve a pontuação máxima de intensidade para a maioria dos elementos imunomarcados, correspondendo a 82% (14 dos 17). De forma geral, a combinação de dois diferentes aldeídos mostrou-se mais prejudicial do que o glutaraldeído puro (MRINI et al., 1995). Similarmente, Llewellyn-Smith e Minson (1992) demonstraram uma boa imunorreatividade para neuropeptídeos (SP, encefalina e neuropeptídeo Y) após fixação em soluções tamponantes contendo 1-2,5% de glutaraldeído. Adicionalmente, afirma que a alta concentração de glutaraldeído promove uma melhor conservação dos anticorpos primários do que fixativos com pouco ou nenhum glutaraldeído em sua composição, garantindo diluições relativamente elevadas destes anticorpos (LLEWELLYN-SMITH; MINSON, 1992).

No SNP, Gottschall (1981) utilizando o glutaraldeído a 2,5% foi capaz de evidenciar marcações positivas à acetilcolinesterase, enzima responsável pela hidrólise da acetilcolina em colina e acetato, em nervos frênicos de ratos Wistar. Fato este que possibilitou a obtenção de resultados bastante satisfatórios, precisos e de intensa imunorreatividade em fibras motoras (GOTTSCHALL, 1981). Ohnishi, Offord

---

e Dyck (1974) analisaram o efeito da duração da fixação do glutaraldeído à 2% após 1 ou 12 horas de fixação em nervos fibulares (ramo do nervo isquiático). Não foram encontradas diferenças significativas em relação aos parâmetros morfométricos (área fascicular, número de lamelas de mielina, área da fibra miélica), comprovando a eficácia do procedimento (OHNISHI; OFFORD; DYCK, 1974). Além disso, estudos imunohistoquímicos voltados a tecidos periféricos evidenciaram similaridades em relação aos fixadores utilizados. Grube (1980) através do uso de novos marcadores fluorescentes associado com 3'3 DAB e peroxidase (PAP) testou distintos fixadores (paraformoldeído + ácido pícrico, paraformoldeído+ glutaraldeído e glutaraldeído puro) em tecidos de ratos e humanos, onde foi constatado que todas as células foram imunomarcadas independente do tipo de fixativo e do anticorpo testado (GRUBE, 1980). Graham e Karnovsky (1966) relataram que a localização da atividade enzimática (DAB + peroxidase) não difere dos tecidos submetidos a diferentes agentes fixadores como o glutaraldeído puro (5%) ou misturas de formoldeído (4%) + glutaraldeído (5%) quando examinados por microscopia de luz e eletrônica (GRAHAM; KARNOVSKY, 1966). Vale ressaltar que a distribuição da SP em fibras amielínicas e de pequeno diâmetro A-delta, visualizadas neste estudo, foram similares às descrições imunohistoquímicas discutidas anteriormente, no qual não foi adicionado o fixador glutaraldeído (KNIGHT et al., 1987; LAWSON et al., 1993; MCCARTHY; LAWSON, 1989). De forma equivalente, a localização da CAT, mostrou alta similaridade com estudos onde o glutaraldeído foi aplicado como fixador primário (GOTTSCHELL, 1981).

Com relação ao método LSAB empregado neste estudo, Ramos-Vara (2005) descreve que o supracitado teste, apresenta uma maior sensibilidade em relação à técnica ABC, podendo identificar pequenas quantidades de antígenos (RAMOS-VARA, 2005). De acordo com Nakane e Pierce (1967) a conjugação de enzimas e anticorpos não limita a atividade enzimática e imunológica do tecido, podendo ser aplicado tanto a nível de microscopia de luz quanto eletrônica devido a sua especificidade em marcar o local da ligação antígeno-anticorpo (NAKANE; PIERCE, 1967). No que se refere ao método de fixação, Fix e Garman (2000) relata que a utilização da imersão direta de tecidos nervosos em solução fixadora à base de aldeídos (glutaraldeído, formoldeído) é um método bastante usual. Todavia é preferível a perfusão sistêmica para a lavagem e fixação do leito vascular (FIX;

GARMAN, 2000). Kasukurthi et al. (2009) avaliaram a preservação do nervo isquiático comparando estas duas técnicas, a de perfusão e a de imersão. Contudo, não foram encontradas variações qualitativas ou quantitativas entre os dois métodos. Embora a perfusão seja considerada o padrão-ouro, a fixação por imersão é realizada mais facilmente, exige uma menor quantidade de fixador e minimiza o tempo de operação (KASUKURTHI et al., 2009). O referido estudo através de altas concentrações de glutaraldeído puro e da fixação por imersão, mostrou-se eficaz na preservação tecidual, garantindo uma boa integridade celular e química das fibras motoras e sensoriais por meio de processos imunohistoquímicos.

Atualmente, o glutaraldeído é aplicado extensivamente apenas em análises ultraestruturais (microscopia eletrônica) seguido de pós fixação com tetróxido de ósmio (FAZAN et al., 2009; HOPWOOD, 1972; HOPWOOD; CALLEN; MCCABE, 1970; WEBSTER; COLLINS, 1964) ou através de misturas contendo paraformaldeído e glutaraldeído (ABRAHÃO et al., 2004). A microscopia eletrônica é ainda hoje um método extremamente dispendioso, que demanda tempo e mão de obra especializada. O estabelecimento de técnicas imunoenzimáticas de baixo custo, com boa especificidade e sensibilidade através da técnica de microscopia de luz é de considerável importância. A somatória destes fatos reforçam a veracidade e reprodutibilidade de nossos achados imunohistoquímicos, inserindo o glutaraldeído como um fixador primário em estudos voltados para a microscopia de luz convencional aplicados em nervos periféricos.

## **5.1. Neurotransmissores**

## **5.2. Substância P**

Os achados qualitativos oriundos da padronização imunohistoquímica em nervos frênicos possibilitou a identificação de axônios mielínicos e amielínicos em vias motoras e sensoriais (aférentes e eférentes), comprovando a eficácia da técnica e da utilização do glutaraldeído como fixador primário em nervos periféricos.

Em relação aos aspectos morfológicos macro e microscópicos, o nervo frênico consiste de três camadas. A camada mais externa é envolvida por tecido conjuntivo frouxo e gordura, denominada de epineuro. Abaixo do epineuro reside o perineuro

---

(segunda camada), que envolve completamente o nervo. O perineuro contém camadas de células escamosas que são interconectadas por junções firmes “tight junctions”. O endoneuro é a terceira camada e também a mais interna, sendo composto basicamente de fibras colágenas orientadas longitudinalmente que preenchem grande parte do espaço entre os axônios mielínicos e amielínicos no interior do perineuro (FAZAN et al., 2009; LANGFORD; SCHMIDT, 1983). Os axônios das fibras mielínicas apresentam-se envolvidos por uma bainha de mielina típica, regular e de aspecto compacto. Esta bainha é formada por múltiplas camadas compactas de membranas plasmáticas lipídicas que atuam na transmissão do impulso nervoso saltatório, garantindo uma condução nervosa rápida (NAVE; WERNER, 2014; QUARLES; MACKLIN; MORELL, 2006). O aspecto desarranjado de algumas bainhas de mielina é interpretado como artefato de processamento. É sabidamente reconhecido que fibras mielínicas de grande diâmetro apresentam proporcionalmente bainhas de mielina mais espessas do que as fibras de pequeno diâmetro (FRAHER, 1992). Essa diferença pode ser constatada comparando as fibras mielínicas de grande calibre com as de menor, onde os axônios com pequeno diâmetro são envolvidos por uma bainha de mielina fina e axônios maiores com bainha de mielina espessa. Alguns fascículos do nervo frênico apresentaram um único vaso capilar no espaço endoneural, consistindo de endotélio, lâmina basal e pericitos, e com uma localização mais central. No entanto, este número pode ser variável.

Os principais componentes dos nervos frênicos que foram processados congelados não diferiram de outros nervos, apresentando axônios mielínicos e amielínicos, células de Schwann que envolvem os axônios, bainha de mielina, axoplasma, epineuro, perineuro, endoneuro, vasos sanguíneos (eritrócitos), sendo estes circundados por tecido conjuntivo e fibras de colágeno. Todos estes aspectos macroscópicos puderam ser contemplados através da microscopia de luz. E tais características já foram descritas anteriormente (FAZAN et al., 2009; RODRIGUES FILHO; FAZAN, 2006). Nos cortes de todos os nervos estudados são observadas fibras de aspecto normal dentro dos fascículos. Estas observações qualitativas possibilitaram a identificação da SP em aferências nervosas, que se estende ao longo de todo axônio, demonstrando a eficácia do glutaraldeído na preservação morfológica de nervos periféricos (FAZAN et al., 2009; RODRIGUES FILHO; FAZAN, 2006).

---

Com relação aos achados imunohistoquímicos, a presença de imunorreatividade à SP pôde ser visualizada de forma condensada em várias áreas dispersas por todo o endoneuro, sendo identificada predominantemente próximo ao perineuro dos nervos frênicos, região esta que contém grupos de fibras amielínicas (tipo C) e de fibras de pequeno diâmetro A-delta, corroborando com a localização relatada em estudos morfológicos e ultraestruturais de ratos (FAZAN et al., 2009; RODRIGUES et al., 2011). Embora os conjuntos ou feixes de fibras amielínicas não possam ser visualizadas claramente através da microscopia de luz convencional, a SP é descrita como sendo o neurotransmissor primário de neurônios sensoriais (axônios amielínicos) e fibras de pequeno diâmetro (mielínicas finas) (CARLTON; ZHOU; COGGESHALL, 1996; HÖKFELT et al., 1975; LAWSON et al., 1993; LEEMAN; GAMSE, 1981; LEMBECK; GAMSE, 1982; MCCARTHY; LAWSON, 1989; WHITE, 1997). Estas fibras aferentes transmitem informações somatossensoriais do SNP ao SNC, a fim de ser processada e interpretada centralmente. Todavia, para uma visualização precisa destes conjuntos de fibras amielínicas os microscópios eletrônicos de transmissão ou de varredura poderão ser utilizados, possibilitando com isso a observação direta de aspectos ultraestruturais das fibras (FAZAN et al., 2009).

O nervo frênico e os demais nervos periféricos possuem basicamente 4 tipos de fibras A (alfa, beta, gama e delta, mielínicas) e fibras do tipo C (amielínicas) (LANGFORD; SCHMIDT, 1983; LI; BAK, 1976; WHITWAM, 1976). Distintamente, alguns autores classificam em 3 classes: A (fortemente mielinizadas) B (menos mielinizadas) e C (amielínicas) (GARTNER; HIATT, 2007). Hoitsma et al. (2004) descreve uma categorização baseada no tamanho, fibras mielínicas de grande diâmetro (A-alfa e beta), médio (A-gama), pequeno (A-delta) e amielínicas (C) (HOITSMA et al., 2004). As fibras A-alfa são responsáveis pela contração dos músculos esqueléticos e pela propriocepção enquanto que as fibras A-beta transmitem informações relacionadas às sensações de toque. As fibras A-gama, por sua vez, carregam funções motoras para os fusos musculares (HOITSMA et al., 2004; LI; BAK, 1976). Estudos envolvendo a identificação ou quantificação de neurotransmissores em nervos periféricos são escassos e pobremente compreendidos. No entanto, alguns autores vêm investigando a SP em distintos nervos de composição mista. Yaksh et al. (1980) descreveram que após a estimulação elétrica bilateral do nervo isquiático de gatos aumentou a liberação da SP

---

substancialmente em fibras do tipo C e A-delta, enquanto que as fibras A-alfa e beta apresentaram uma expressão insignificante (LEEMAN; GAMSE, 1981; YAKSH et al., 1980). Além disso, a distribuição de axônios imunopositivos à SP têm sido descrito em aferências primárias de pequeno diâmetro em nervos intra-renais de ratos, que projeta a informação para a medula espinhal e depois para o tronco encefálico (KNIGHT et al., 1987). Essas fibras nociceptivas do tipo C e as fibras de pequeno diâmetro (A-delta, mielínicas finas) que contém a SP, podem atuar transmitindo a sensação de dor e temperatura, bem como de funções autonômicas (HOITSMA et al., 2004). De acordo com Malthe-Sørensen e Øktedalen (1982) a SP é conduzida através do nervo frênico por meio do transporte axonal rápido (MALTHE-SØRENSEN; ØKTEDALEN, 1982). No entanto, neste trabalho não foi possível observar imunorreatividade positiva em fibras de grande diâmetro (A-alfa e A-beta ou A-gama) para este neurotransmissor. Adicionalmente, estudos fisiológicos e imunohistoquímicos verificaram a positividade para SP em gânglios da raiz dorsal (L4) de ratas Wistar fêmeas. No entanto, a SP foi identificada em apenas 50% dos neurônios pequenos (fibras C), em 10-20% dos neurônios médios (fibras A-delta) e 0% em neurônios grandes (fibras A-alfa e beta) (LAWSON et al., 1993; MCCARTHY; LAWSON, 1989).

Nas últimas décadas, houve um crescente interesse na SP, visto que, este neuropeptídeo encontra-se localizado em áreas cerebrais envolvidas no controle cardiovascular. Estudos vêm relatando sobre a possível participação da SP na modulação do sistema nervoso autônomo simpático e parassimpático, uma vez que esta substância encontra-se em centros responsáveis por ativações e/ou inibições destes mecanismos em diversas espécies animais, sendo este neuropeptídeo localizado no núcleo do trato solitário (MORILAK; MORRIS; CHALMERS, 1988; SHULTS et al., 1984), bulbo ventrolateral caudal (KAWANO; MASUKO, 1997), bulbo ventrolateral rostral (HELKE et al., 1984; LI; GUYENET, 1997; MILNER et al., 1988), coluna intermédio-lateral (CHARLTON; HELKE, 1987; HELKE et al., 1982; NAKAYA et al., 1994; TAKANO; LOEWY, 1984), núcleo ambíguo (AGARWAL; CALARESU, 1991; NAKAYA et al., 1994; RIBEIRO DA SILVA; HÖKFELT, 2000), nervo vago (GAMSE; LEMBECK; CUELLO, 1979; BRIMIJOIN et al., 1980; VON EULER, 1963) e nervo do seio carótico (JACOBOWITZ; HELKE, 1979). O NTS é uma região rica em terminais nervosos contendo a SP e receptores NK1, cuja inervação advém de fibras



---

aferentes primárias do nervo vago e glossofaríngeo (GILLIS et al., 1980; HELKE; O'DONOHUE; JACOBOWITZ, 1980; MAZZONE; GERAGHTY, 1999). De fato, microinjeções da substância P no NTS acarretam queda da PA e redução da frequência cardíaca (FC), sugerindo que a SP seja um transmissor do reflexo barorreceptor (HALL; MILEY; STEWART, 1989; KUBO; KIHARA, 1987; VAN GIERSBERGEN; PALKOVITS; DE JONG, 1992). Kubo e Kihara (1987) injetando baixas dosagens de SP no NTS de ratos ocasionou hipotensão, bradicardia e apnéia. Além disso a administração de antagonistas à SP aboliram respostas cardiovasculares (KUBO; KIHARA, 1987). Similarmente, Hall, Miley e Stewart (1989) observaram queda na PA e na frequência cardíaca após injeção da SP em regiões consideradas barorreceptoras (HALL; MILEY; STEWART, 1989).

Inúmeros estudos relataram os efeitos da injeção da SP no NTS atuando sobre a inibição da atividade simpática e acentuada ativação vagal (HAEUSLER; OSTERWALDER, 1980; HALL; MILEY; STEWART, 1989; KUBO; KIHARA, 1987; LOREZ; HAEUSLER; AEPPLI, 1983; LUKOVIC; DE JONG; DE WIED, 1987). Contudo divergências acerca de tal efeito depressor (ABDALA; HAIBARA; COLOMBARI, 2003; CARTER; LIGHTMAN, 1983; SEAGARD; DEAN; HOPP, 2000; TALMAN; PERRONE; REIS, 1980) ocorrem devido a diversidade de métodos utilizados (HALL; MILEY; STEWART, 1989), podendo estar relacionado com a utilização de diferentes anestésicos (MISTROVA; KRUZLIAK; CHOTTOVA DVORAKOVA, 2015). No entanto microinjeções da SP têm promovido um aumento da sensibilidade da resposta reflexa bradicárdica via NTS (CHAN; BARNES; CHAN, 1990; SEAGARD; DEAN; HOPP, 2000).

Em contrapartida, Gilbey, McKenna e Schramm (1983) verificaram que a injeção de SP em neurônios pré-ganglionares simpáticos localizados na medula torácica de ratos ocasionou a despolarização de neurônios da coluna dorsal da medula espinhal, aumentando com isso a descarga simpática (GILBEY; MCKENNA; SCHRAMM, 1983). Estes resultados indicam que a SP pode ser um transmissor excitatório ou modulador, elevando a atividade simpática (HELKE; CHARLTON; KEELER, 1985).

No SNP diversas regiões contendo a SP foram investigadas através da técnica de imunohistoquímica ou traçadores neuronais, principalmente aquelas associadas ao trajeto de aferências barorreceptoras. Helke, O'Donohue e Jacobowitz (1980) visualizaram a SP em discretas fibras na túnica adventícia do arco aórtico e da região

---

do seio carotíco de ratos. Adicionalmente, corpos celulares imunorreativos à SP também foram encontrados na porção rostral do gânglio nodoso através da marcação axonal retrógrada com true blue (HELKE; GOLDMAN; JACOBOWITZ, 1980; HELKE; O'DONOHUE; JACOBOWITZ, 1980) e gânglio petroso (HELKE; NIEDERER, 1990). Adicionalmente, Helke, O'Donohue e Jacobowitz (1980) descreveram que a remoção uni-lateral do gânglio nodoso reduziu a quantidade da SP em porções do NTS sabidamente reconhecidas como barorreceptoras e quimiorreceptoras (NTS intermediária e NTS caudal), respectivamente (HELKE; O'DONOHUE; JACOBOWITZ, 1980). Vale ressaltar que em todos os experimentos imunohistoquímicos supracitados foram utilizados paraformaldeído em distintas concentrações, "puros" ou associados com baixíssimas concentrações de glutaraldeído, sendo esta última condição considerada rara. Por fim, a presença da SP em todos os níveis do arco barorreflexo, sugere que este peptídeo apresente um papel modulatório no controle barorreflexo da pressão sanguínea (HELKE; SEAGARD, 2004; SEAGARD; DEAN; HOOP, 2000).

Estes fatos apresentados mostram que até o presente momento, o mecanismo de sinalização da SP bem como sua participação na regulação reflexa da pressão sanguínea ainda precisa ser compreendido.

### **5.3. Colina acetiltransferase**

A imunorreatividade para CAT foi intensamente evidenciada no interior das fibras mielínicas de pequeno, médio e grande diâmetro, preenchendo praticamente todo o espaço endoneural dos nervos frênicos, exceto os conjuntos de fibras amielínicas (tipo C). De forma semelhante à SP, investigações imunohistoquímicas envolvendo a neurotransmissão colinérgica periférica são escassas, e descrições imunohistoquímicas em nervos periféricos são praticamente inexistentes. Estes achados fornecem subsídios que comprovam a eficácia da técnica na imunomarcção de nervos periféricos, sendo capaz de reconhecer distintas fibras motoras e sensoriais, revelando desta forma os axônios colinérgicos periféricos.

Como esperado, a musculatura esquelética e muitos nervos periféricos contém a CAT e o neurotransmissor acetilcolina. Segundo, Hebb, Krnjevic e Silver (1964) a

---

desnervação crônica de nervos frênicos ocasionam uma redução na liberação da enzima CAT e torna a acetilcolina praticamente indetectável, sugerindo que há um acúmulo destas substâncias em terminações nervosas (HEBB; KRNJEVIC; SILVER, 1964). Similarmente, Gottschall (1981) identificou a enzima acetilcolinesterase em fibras mielínicas motoras do tipo A (alfa e gama), exibindo uma imunopositividade de 71% nesta classe de axônios, sendo esta bastante evidente no interior das fibras mielínicas (axoplasma). Contrariamente, as fibras sensoriais mostraram-se negativamente imunomarcadas (29%) (GOTTSCHALL, 1981). Graham et al. (2007) identificaram a CAT em axônios de grande, médio e pequeno diâmetro a partir de nervos isquiáticos de ratos Sprague-Dawley, fixados com paraformoldeído a 4%, diluído em tampão fosfato a 0,1M, pH 7,2 (GRAHAM et al., 2007). Embora os autores tenham optado por um fixador usual e rotineiro de práticas laboratoriais, estes resultados se assemelham aos nossos dados, confirmando a consistência e veracidade das informações apresentadas.

Como esperado, a presença de CAT no nervo frênico indica que o neurotransmissor acetilcolina seja produzido no neuroplasma (citoplasma da célula nervosa) e que atue sobre junções neuromusculares participando do controle motor do músculo diafragma.

#### **5.4. Nervos depressor aórtico**

As análises fisiológicas revelaram discretas alterações nos índices sistólicos e diastólicos de ambos os grupos investigados. Todavia esta condição não é classificada como patológica, uma vez que os animais estão sob a influência de anestésicos. O pentobarbital, anestésico utilizado neste estudo, é amplamente aceito na prática clínica e laboratorial, sendo de baixo custo e de rápido efeito. No entanto, pode promover efeitos variáveis no sistema cardiovascular, dependendo da dose, espécie e estado volêmico. Investigadores relataram que o pentobarbital não deprime tão eficazmente o sistema cardiovascular quanto o anestésico cetamina e xilazina, fornecendo uma inadequada ou inconsistente analgesia em camundongos. Os animais sob o efeito do pentobarbital mostraram-se muito nervosos após a aplicação do anestésico e demoraram para adormecer (6-7 min) em comparação àqueles

submetidos a cetamina e xilazina (2-3 min) (ERHARDT et al., 1984). Folle e Levesque (1976) reportaram aumento da pressão arterial em ratos (FOLLE; LEVESQUE, 1976). Tuma et al. (1985) verificaram que ratos fêmeas (N=344, 12 meses de idade), submetidas ao referido anestésico tiveram uma elevação da pressão arterial média (130 mmHg) quando comparadas aos ratos acordados (114 mmHg) (TUMA et al., 1985). Por outro lado, Wixson et al. (1987) não relataram alterações significativas na frequência cardíaca de ratos com o uso do pentobarbital (WIXSON et al., 1987), no entanto a taquicardia é vista em coelhos submetidos a doses subanestésicas (MURTHY et al., 1982).

Com relação aos aspectos morfológicos, o referido nervo apresentou características morfológicas semelhantes áquelas descritas por Fazan, Salgado e Barreira (1997) e Fazan et al. (1999), sendo composto por axônios mielinícos e amielinícos, núcleo de células de Schwann, fibras de colágeno no perineuro e endoneuro, pequenos e grandes vasos sanguíneos endoneurais, perineurais e epineurais. O NDA é rodeado por uma camada espessa de tecido conjuntivo frouxo, o epineuro. O epineuro reveste a parte exterior do nervo, e contém vasos, tecido gorduroso e fibroso e células típicas do tecido conjuntivo. O perineuro, camadas de células achatadas justapostas, aparece envolvendo todo o fascículo nervoso (FAZAN et al., 1999; FAZAN; SALGADO; BARREIRA, 1997). Os barorreceptores cardiovasculares aórticos estão conectados ao SNC pelos axônios mielinícos e amielinícos que compõem o NDA esquerdo.

Diversas descrições morfológicas relataram que os nervos depressores aórticos de ratos são constituídos aproximadamente por 80% de fibras amielinícas (tipo C) e 20% por fibras mielinícas (tipo A), numa relação de 4:1 (FAZAN; SALGADO; BARREIRA, 2001). Complementarmente Fazan, Salgado e Barreira (1997) constataram que 81% e 83% das fibras nervosas são compostas de axônios amielinícos em segmentos proximais e distais de ratos machos Wistar, respectivamente. Embora os cortes transversais do NDA tenham ilustrado um prevalente número de fibras mielinícas de pequeno, médio e grande calibre (alfa, beta e gama) em segmentos proximais, a literatura vigente descreve que o NDA apresenta grandes proporções de fibras amielinícas ~80-90% em ambos os segmentos, sendo os clusters de fibras amielinícas mais visíveis distalmente (ANDRESEN; KRAUHS; BROWN, 1978; FAZAN; SALGADO; BARREIRA, 1997). Corroborando com as

descrições morfológicas, estudos eletrofisiológicos descreveram que fibras amielínicas do NDA mostram uma lenta velocidade de condução de 0.6-2 m/s e um diâmetro de 0,25-0,9  $\mu\text{m}$ , enquanto que as fibras do tipo A-delta mostraram valores em torno de 3-12 m/s. Já as fibras mielínicas de grande diâmetro (1,5-6,5  $\mu\text{m}$ ), consideradas fibras de condução rápida do barorreflexo, tiveram velocidades de 10, 20 e 25 m/s (BROWN; SAUM; TULEY, 1976). Similarmente, Fan e Andresen (1998) mostraram que fibras mielínicas conduzem numa faixa de 10m/s e fibras amielínicas 0.5m/s (FAN; ANDRESEN, 1998).

Os parâmetros da área fascicular do NDA de ratos machos mostraram valores superiores quando comparados as fêmeas. Rodrigues et al. (2011) demonstraram que as áreas fasciculares dos nervos frênicos de ratos machos foram maiores em relação as fêmeas de duas distintas linhagens (Wistar-Kyoto e espontaneamente hipertenso) (RODRIGUES et al., 2011). Comparações entre o NDA de camundongos e ratos mostraram que diferenças morfométricas ocorrem devido ao tamanho do animal, sugerindo que componentes neuronais acompanham tais adaptações (DA SILVA CARVALHO et al., 2014). Em contrapartida, estes valores fasciculares diferem de estudos morfométricos e morfológicos descritos na literatura. Oliveira et al. (2013) mostraram fascículos do NDA em torno de 1,673  $\mu\text{m}^2$  para ratos Wistar machos pesando 180-200g (OLIVEIRA et al., 2013). Da Silva Carvalho et al. (2014) divulgaram valores de 1,024  $\mu\text{m}^2$  para ratos Wistar machos, com peso médio de 295g (DA SILVA CARVALHO et al., 2014). Fazan et al. (1999) encontraram valores de área de 1,92-1,94  $\mu\text{m}^2$  em ratos fêmeas Wistar-Kyoto com peso variando de 250 a 400g (FAZAN et al., 1999). Estas variações podem ser decorrentes da diferença do tamanho do animal, bem como de diferenças metodológicas aplicadas. De fato, divergências eram esperadas, pois em análises morfométricas a amostra é submetida a um complexo processo de desidratação, fixação, inclusão em resinas especiais, e polimerização (~72 horas) a fim de garantir um grau de rigidez suficiente para permitir a realização de cortes ultrafinos (DA SILVA; JORDÃO; FAZAN, 2007; JORTNER, 2011). Fato este que pode ter promovido alterações dos parâmetros morfométricos previamente discutidos.

Os achados imunohistoquímicos mostraram que a SP foi identificada em fibras amielínicas do tipo C e prováveis fibras mielínicas finas de pequeno diâmetro do tipo A-delta de forma bastante pontualizada à nível proximal e de forma intensificada e

---

amplamente distribuída distalmente nestas classes de fibras nervosas. Estas constatações sugerem a existência de subpopulações de fibras amielínicas do tipo C. Thorén, Saum e Brown (1977) e Thorén, Andresen e Brown (1983) investigando o NDA esquerdo de ratos verificaram que existe dois tipos de padrões de descarga neuronal em fibras do tipo C, sendo a primeira regular e a segunda irregular (THÓREN; ANDRESEN; BROWN, 1983; THÓREN; SAUM; BROWN, 1977). Acredita-se que estas fibras barorreceptoras do tipo C afetam a atividade simpática (AKRE; AARS, 1977), mas a localização de terminais de axônios simpáticos no arco aórtico é desconhecido. Atualmente não há evidências estruturais que confirmem os dois tipos de fibras amielínicas, no entanto fibras de diferentes tamanhos foram observadas (KRAUHS, 1979).

Em meados da década de 70, dois distintos autores sugeriram que axônios amielínicos do NDA com descargas irregulares desempenham um importante papel no controle da pressão sanguínea, exercendo um efeito inibitório sobre os centros vasomotores principalmente em casos de elevação da pressão arterial (KARDON; PETERSON; BISHOP, 1975; THORÉN; SAUM; BROWN, 1977). Turner et al. (2014) através de análises eletrofisiológicas descreveram que as fibras amielínicas do tipo C em nervos depressores proporcionam reduções na atividade do sistema nervoso simpático e na pressão arterial quando comparadas as fibras do tipo A (mielínicas). Além disso, afirma que a redução da pressão arterial após a estimulação elétrica em aferências barorreceptoras são mediadas através da ativação de fibras do tipo C (TURNER et al., 2014). Segundo Kardon, Peterson e Bishop (1975) pequenas alterações na pressão sanguínea ativam fibras mielínicas (tipo A) resultando em variações recíprocas na atividade vagal e eferente simpática. Em contrapartida, apenas aumentos significativos da PA ativariam as fibras aferentes do tipo C produzindo efeitos na frequência cardíaca via eferências vagais do NDA (KARDON; PETERSON; BISHOP, 1975). Além disso, os barorreceptores aórticos se tornam relativamente inativos quando a PA está abaixo de seu limite de normalidade, sugerindo que este atue como um possível mecanismo anti-hipertensivo (OBERG, 1981; PELLETIER; SHEPHERD, 1973; TURNER et al., 2014). Turner et al. (2015) salienta que as fibras amielínicas são criticamente importantes na promoção de inibição do SNA e redução da pressão arterial em casos de elevação da pressão sanguínea (TURNER et al., 2015).

---

Como esperado, as fibras mielínicas de grande, médio e pequeno diâmetro não foram imunomarcadas no NDA, uma vez que a substância P não se encontra nesta classe de fibras nervosas. Por fim, as análises quantitativas, não apresentaram variações significativas entre os gêneros. Fato este, que pode ser justificado pela utilização de secções de ambos os segmentos proximais e distais durante o processo de quantificação do supracitado nervo, o que acarretou em grande variabilidade intra e inter-grupo. Até o presente momento, não há parâmetros literários que se possa correlacionar com os nossos achados, uma vez que, investigações imunohistoquímicas em aferências barorreceptoras aórticas são inexistentes. A primeira e provavelmente única descrição envolvendo a identificação imunohistoquímica de aferências quimiorreceptoras foi realizada por Jacobowitz e Helke (1979), onde foi identificado a SP em nervos do seio carótico e nos corpos caróticos de ratos. Adicionalmente, os autores inferem que a presença da SP em corpos caróticos não implica que toda a população de fibras aferentes contenham exclusivamente o peptídeo (JACOBOWITZ; HELKE, 1979).

Espera-se que a identificação da SP no nervo depressor aórtico sirva de gatilho para que futuras pesquisas envolvendo a liberação de neurotransmissores em aferências barorreceptoras sejam explorados. Fato este, que contribuirá para a agregação de informações pertinentes à modulação ou transmissão da informação neural, propiciando desta forma melhor entendimento da comunicação e atividades barorreflexas associadas a mecanismos cardiovasculares.

---

**CONCLUSÃO**



## 6. CONCLUSÃO

A utilização de altas concentrações de glutaraldeído e da fixação por imersão em nervos congelados, mostrou-se eficaz na preservação da imunorreatividade para neuropeptídeos (SP) e marcadores colinérgicos (CAT) em nervos periféricos garantindo uma boa integridade celular e química das fibras motoras e sensoriais para investigação por meio de processos imunohistoquímicos.

Esta é a primeira identificação morfológica da presença de substância P em nervos depressores aórticos, confirmando inúmeras suposições de que a SP atue como um dos neurotransmissores de aferências barorreceptoras, participando do centro de integração do controle cardiovascular. Diferenças entre gêneros não foram observadas nesta primeira análise.

---

## **REFERÊNCIAS**

---

## 7. REFERÊNCIAS

ABDALA, A. P.; HAIBARA, A. S.; COLOMBARI, E. Cardiovascular responses to substance P in the nucleus tractus solitarii: microinjection study in conscious rats. **American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology**, v. 285, n. 2, p. H891-H898, 2003.

ABRAHÃO, D. S. et al. Estudo comparativo com diversos fixadores para aplicação em microscopia eletrônica de transmissão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 63, n. 2, p. 248-254, 2004.

ACCORSI-MENDONÇA, D.; MACHADO, B. H. Synaptic transmission of baro-and chemoreceptors afferents in the NTS second order neurons. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**, v. 175, n. 1-2, p. 3-8, 2013.

AGARWAL, S. K.; CALARESU, F. R. Electrical stimulation of nucleus tractus solitaries excites vagal preganglionic cardiomotor neurons of the nucleus ambiguus in rats. **Brain Research**, v. 574, n. 1-2, p. 320-324, 1992.

AGARWAL, S. K.; CALARESU, F. R. Monosynaptic connection from caudal to rostral ventrolateral medulla in the baroreceptor reflex pathway. **Brain Research**, v. 555, n. 1, p. 70-74, 1991.

AGOSTINI, E. et al. Functional and histological studies of the vagus nerve and its branches to the heart, lungs and abdominal viscera in the cat. **The Journal of Physiology**, v. 135, n. 1, p. 182-205, 1957.

AICHER, S. A. et al. Monosynaptic projections from the medullary gigantocellular reticular formation to sympathetic preganglionic neurons in the thoracic spinal cord. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 363, n. 4, p. 563-580, 1995.

AKRE, S.; AARS, H. Pressure-independent inhibition of sympathetic activity by noradrenaline: role of baroreceptor C fibres. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 100, n. 3, p. 303-308, 1977.

ANDRESEN, M. C. Cellular mechanisms of baroreceptor integration at the nucleus tractus solitarius. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 940, p. 132-141, 2001.

---

ANDRESEN, M. C.; KRAUHS, J. M.; BROWN, A. M. Relationship of aortic wall baroreceptor properties during development in normotensive and spontaneously hypertensive rats. **Circulation Research**, v. 43, n. 5, p. 728–738, 1978.

ANRAKU, M.; SHARGALL, Y. Surgical conditions of the diaphragm: anatomy and physiology. **Thoracic Surgery Clinics**, v. 19, n. 4, p. 419-429, 2009.

ARAI, H.; EMSON, P.C. Regional distribution of neuropeptide K and other tachykinins (neurokinin A, neurokinin B and substance P) in rat central nervous system. **Brain Research**, v. 399, n. 2, p. 240-249, 1986.

BADOER, E. et al. Localization of barosensitive neurons in the caudal ventrolateral medulla which project to the rostral ventrolateral medulla. **Brain Research**, v. 657, n. 1-2, p. 258-268, 1994.

BARKER, S. J.; EASTON, J. C.; HOWE, A. Peripheral arterial chemoreceptors in the rat: Paucity of thoracic glomus tissue. **Journal of Physiology London**, v. 308, p. 62, 1980.

BELLUCCI, F. et al. Pharmacological profile of the novel mammalian tachykinin, hemokinin 1. **British Journal of Pharmacology**, v. 135, n. 1, p. 266-274, 2002.

BENTZEN, B. H.; GRUNNET, M. Central and peripheral GABAA receptor regulation of the heart rate on conscious state of the animal. **Advances in Pharmacological Sciences**, p. 1-10, 2011.

BERGROTH, V. Comparison of various immunohistochemical methods. Demonstration of extracellular antigens in cryostat sections. **Histochemistry**, v. 77, n. 2, p. 177-184, 1983.

BEROD, A.; HARTMAN, B. K.; PUJOL, J. F. Importance of fixation in immunohistochemistry: Use of formaldehyde solutions at variable pH for the localization of tyrosine hydroxylase. **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 29, n. 7, p. 844-850, 1981.

BRANDTZAEG, P. The increasing power of immunohistochemistry and immunocytochemistry. **Journal of Immunological Methods**, v. 216, n. 1-2, p. 49-67, 1998.

---

BRIMIJOIN, S. et al. Axonal transport of substance P in the vagus and sciatic nerves of the guinea pig. **Brain Research**, v. 191, n. 2, p. 443-457, 1980.

BROGNARA, F. Cardiovascular responses elicited by continuous versus intermittent electrical stimulation of the aortic depressor nerve in conscious rats. **Life Sciences**, v. 148, p. 99-105, 2016.

BROWN, A. M.; SAUM, W. R.; TULEY, F. H. A comparison of aortic baroreceptor discharge in normotensive and spontaneously hypertensive rats. **Circulation Research**, v. 39, n. 4, p. 488-496, 1976.

BROWN, A. M.; SAUM, W. R.; YASUI, S. Baroreceptor dynamics and their relationship to afferent fiber type and hypertension. **Circulation Research**, v. 42, n. 5, p. 694-702, 1978.

BURGH DALY, M.; UNGAR, A. Comparison of the reflex responses elicited by stimulation of the separately perfused carotid and aortic body chemoreceptors in the dog. **The Journal of Physiology**, v. 182, n. 2, p. 379-403, 1966.

CAO, X. Choline acetyltransferase activity in collateral sprouting of peripheral nerve after surgical intervention: experimental study in rats. **Journal of Reconstructive Microsurgery**, v. 15, n. 6, p. 443-448, 1999.

CARLTON, S. M.; ZHOU, S.; COGGESHALL, R. E. Localization and activation of substance P receptors in unmyelinated axons of rat glabrous skin. **Brain Research**, v. 734, n. 1-2, p. 103-108, 1996.

CARTER, M. S.; KRAUSE, J. E. Structure, expression, and some regulatory mechanisms of the rat preprotachykinin gene encoding substance P, neurokinin A, neuropeptide K, and neuropeptide gamma. **The Journal of Neuroscience**, v. 10, n. 7, p. 2203-2214, 1990.

CARTER, M. S.; LIGHTMAN, S. L. Substance P microinjections into the nucleus tractus solitarius elicit a pressor response in capsaicin-treated rats. **Neuroscience Letters**, v. 43, n. 2-3, p. 253-257, 1983.

CASCIERI, M. A. et al. Determination of the amino acid residues in substance P conferring selectivity and specificity for the rat neurokinin receptors. **Molecular Pharmacology**, v. 41, n. 6, p. 1096-1099, 1992.

---

CAULFIELD, M. P.; BIRDSALL, N. J. International union of pharmacology. XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors. **Pharmacological Reviews**, v. 50, n. 2, p. 279-290, 1998.

CHAN, J. Y.; BARNES, C. D.; CHAN, S. H. Tonic enhancement of the sensitivity of baroreceptor reflex response by endogenous substance P in the rat. **Regulatory Peptides**, v. 29, n. 2-3, p. 199-213, 1990.

CHANG, M. M.; LEEMAN, S. E.; NIALL, H. D. Amino-acid sequence of substance P. **Nature: New Biology**, v. 232, n. 29, p. 86-97, 1971.

CHAPLEAU, M. W. et al. Mechanisms determining sensitivity of baroreceptor afferents in health and disease. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 940, p. 1-19, 2001.

CHAPLEAU, M. W.; SABHARWAL, R. Methods of assessing vagus nerve activity and reflexes. **Heart Failure Reviews**, v. 16, n. 2, p. 109-127, 2011.

CHARLTON, C. G.; HELKE, C. J. Substance P-containing medullary projections to the intermediolateral cell column: identification with retrogradely transported rhodamine-labeled latex microspheres and immunohistochemistry. **Brain Research**, v. 418, n. 2, p. 245-254, 1987.

CHENG, Z. et al. A laser confocal microscopic study of vagal afferent innervation of rat aortic arch: chemoreceptors as well as baroreceptors. **Journal of the Autonomic Nervous System**, v. 67, n. 1-2, p. 1-14, 1997.

CHITRAVANSI, V. C.; KACHROO, A.; SAPRU, H. N. A midline area in the nucleus commissuralis of NTS mediates the phrenic nerve responses to carotid chemoreceptor stimulation. **Brain Research**, v. 662, n. 1-2, 1994.

CHOCKALINGAM, A. Impact of world hypertension day. **The Canadian Journal of Cardiology**, v. 23, n. 7, p. 517-519, 2007.

CONTRERAS, R. J.; BECKSTEAD, R. M.; NORGRÉN, R. The central projections of the trigeminal, facial, glossopharyngeal and vagus nerves: an autoradiographic study in rat. **Journal of the Autonomic Nervous System**, v. 6, n. 3, p. 303-322, 1982.

---

COONS, A. H.; CREECH, H. J.; JONES, R. N. Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group. **Experimental Biology and Medicine**, v. 47, n. 2, p. 200-202, 1941.

COSTA, M. et al. Immunohistochemical localization of polypeptides in peripheral autonomic nerves using whole mount preparations. **Histochemistry**, v. 65, n. 2, p. 157-165, 1980.

COTTLE, M. K. Degeneration studies of primary afferents of IXTH and XTH cranial nerves in the cat. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 122, p. 329-345, 1964.

CRAVO, S. L.; MORRISON, S. F.; REIS, D. J. Differentiation of two cardiovascular regions within caudal ventrolateral medulla. **The American Journal of Physiology**, v. 261, n. 4 Pt 2, p. R985-R994, 1991.

CUELLO, A. C.; FIACCO, M. D.; PAXINOS, G. The central and peripheral ends of the substance P-containing sensory neurons in the rat trigeminal system. **Brain Research**, v. 152, n. 3, p. 499-509, 1978.

CUELLO, C.; KANAZAWA, I. The distribution of substance P immunoreactive fibers in the rat central nervous system. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 178, n. 1, p. 129-156, 1978.

CYON, E. V.; LUDWIG, C. Die reflexe eines der sensiblen nerven des herzens auf die motorischen der blutgefäße. **Arbeiten aus der Physiologischen Anstalt zu Leipzig**, v. 1, p. 128-149, 1866.

DA SILVA CARVALHO, C. et al. Ultrastructural morphometry of the aortic depressor nerves and extrinsic renal nerves: similarities and differences between mice and rats. **Anatomy & Physiology**, v. 4, n. 3, p. 1-7, 2014.

DA SILVA, A. P.; JORDÃO, C. E.; FAZAN, V. P. Peripheral nerve morphometry: comparison between manual and semi-automated methods in the analysis of a small nerve. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 159, n. 1, p. 153-157, 2007.

DAKO CORPORATION. **Basic Enzymology in IHC**. In: JENSEN, S. S (Ed.). 6 ed, 2013, p. 210-211. Disponível em: <[http://www.dako.com/08002\\_ihc\\_staining\\_methods.pdf](http://www.dako.com/08002_ihc_staining_methods.pdf)>. Acesso em: 18 jul. 2018.

---

DAMPNEY, R. A. et al. Central mechanisms underlying short-and long-term regulation of the cardiovascular system. **Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology**, v. 29, n. 4, p. 261-268, 2002.

DAMPNEY, R. A. et al. Functional organization of brain pathways subserving the baroreceptor reflex: studies in conscious animals using immediate early gene expression. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 23, n. 4-5, p. 597-616, 2003.

DAVIS, J. N. Phrenic nerve conduction in man. **Journal of Neurology, Neurosurgery Psychiatry**, v. 30, n. 5, p. 420-426, 1967.

DE PAULA, P. M. et al. Hemodynamic responses to electrical stimulation of the aortic depressor nerve in awake rats. **The American Journal of Physiology**, v. 277, R31-R38, 1999.

DEVANANDAN, M. S. A study of the myelinated fibres of the aortic nerve of cats. **The Journal of Physiology**, v. 171, n. 3, p. 361-367, 1964.

DIB, M. W.; RIERA, R.; FERRAZ, M. B. Estimated annual cost of arterial hypertension treatment in Brazil. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 27, n. 2, p. 125-131, 2010.

DOBA, N.; REIS, D. J. Acute fulminating neurogenic hypertension produced by brainstem lesions in the rat. **Circulation Research**, v. 32, n. 5, p. 584-593, 1973.

DURAND, M. T.; FAZAN JR, R.; SALGADO, H. C. Fisiologia da pressão arterial normal. In: BRANDÃO, A. A.; AMODEO, C.; NOBRE, F. (Ed.). **Hipertensão**. 2 ed. Elsevier Editora Ltda, 2012. cap. 4, p. 29-39.

EASTON, J.; HOWE, A. The distribution of thoracic glomus tissue (aortic bodies) in the rat. **Cell and Tissue Research**, v. 232, n. 2, p. 349-356, 1983.

ELIAS, J. M.; MARGIOTTA, M.; GABORC, D. Sensitivity and detection efficiency of the peroxidase antiperoxidase (PAP), avidin-biotin peroxidase complex (ABC), and peroxidase-labeled avidin-biotin (LAB) methods. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 92, n. 1, p. 62-67, 1989.

EPSTEIN, S. E. et al. Circulatory effects of electrical stimulation of the carotid sinus nerves in man. **Circulation**, v. 40, n. 3, p. 269-276, 1969.



---

ERHARDT, W. et al. A comparative study with various anesthetics in mice (pentobarbitone, ketamine-xylazine, carfentanyl-etomidate). **Research in Experimental Medicine**, v. 184, n. 3, p. 159-169, 1984.

FACTOR, E. M.; HART, R. P.; JONAKAIT GM. Neurochemical development of the raphe after continuous prenatal cocaine exposure. **Brain Research Bulletin**, v. 31, n. 1-2, p. 49-56, 1993.

FADEL, P. J. Arterial baroreflex control of the peripheral vasculature in humans: rest and exercise. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 40, n. 12, p. 2055-2062, 2008.

FAN, W.; ANDRESEN, M. C. Differential frequency-dependent reflex integration of myelinated and nonmyelinated rat aortic baroreceptors. **The American Journal of Physiology**, v. 275, n. 2 Pt 2, p. H632-H640, 1998.

FAZAN, V. P. et al. Ultrastructural morphology and morphometry of phrenic nerve in rats. **Anatomical Record**, v. 292, n. 4, p. 513-517, 2009.

FAZAN, V. P. S. et al. Morphology of aortic depressor nerve myelinated fibers in normotensive Wistar-Kyoto and spontaneously hypertensive rats. **Journal of the Autonomic Nervous System**, v. 77, n. 2-3, p. 133-139, 1999.

FAZAN, V. P. S.; SALGADO, H. C.; BARREIRA, A. A. A descriptive and quantitative light and electron microscopy study of the aortic depressor nerve in normotensive rats. **Hypertension**, v. 30, n. 3 Pt 2, p. 693-698, 1997.

FAZAN, V. P.; SALGADO, H. C.; BARREIRA, A. A. Aortic depressor nerve unmyelinated fibers in spontaneously hypertensive rats. **American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology**, v. 280, n. 4, H1560-H1564, 2001.

FAZAN, V. P.; SALGADO, H. C.; BARREIRA, A. A. Relation between myelin area and axon diameter in the aortic depressor nerve of spontaneously hypertensive rats. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 148, n. 2, p. 130-136, 2005.

FERGUSON, D. W.; ABOUD, F. M.; MARK, A. L. Relative contribution of aortic and carotid baroreflexes to heart rate control in man during steady state and dynamic increases in arterial pressure. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 76, n. 6, p. 2265-2274, 1985.

---

FINLEY, J. C.; KATZ, D.M. The central organization of carotid body afferent projections to the brainstem of the rat. **Brain Research**, v. 572, n. 1-2, p. 108-116, 1992.

FIX, A. S.; GARMAN, R. H. Practical aspects of neuropathology: a technical guide for working with the nervous system. **Toxicologic Pathology**, v. 28, n. 1, p. 122-131, 2000.

FOLLE, L. E.; LEVESQUE, R. I. Circulatory, respiratory and acid-base balance changes produced by anesthetics in the rat. **Acta Biologica et Medica Germanica**, v. 35, n. 5, p. 605-612, 1976.

FRAHER, J. P. Myelin-axon relationships in the rat phrenic nerve: Longitudinal variation and lateral asymmetry. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 323, p. 551-557, 1992.

FRIED, K.; BRODIN, E.; THEODORSSON, E. Substance P-, CGRP-and NPY-immunoreactive nerve fibers in rat sciatic nerve-end neuromas. **Regulatory Peptides**, v. 25, n. 1, p. 11-24, 1989.

FURNESS, J. B.; HEATH, J. W.; COSTA, M. Aqueous aldehyde (Faglu) methods for the fluorescence histochemical localization of catecholamines and dor ultrastructural studies of central nervous tissue. **Histochemistry**, v. 57, n. 4, p. 285-295, 1978.

GADDUM, J. H.; SCHILD, H. O. Depressor substance in extracts of intestine. **The Journal of Physiology**, v. 83, n. 1, p. 1-14, 1934.

GAMBOA-ESTEVEZ, F. O.; MCWILLIAM, P.N.; BATTEN, T. F. Substance P (NK1) and somatostatin (sst2A) receptor immunoreactivity in NTS-projecting rat dorsal horn neurons activated by nociceptive afferent input. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, v. 27, n. 4, p. 251-266, 2004.

GAMSE, R.; LEMBECK, F.; CUELLO, A. C. Substance P in vagus nerve. Immunochemical and immunohistochemical evidence for axoplasmic transport. **Naunyn-Schmiedebergs Archives of Pharmacology**, v. 306, n. 1, p. 37-44, 1979.

GARLAND, A. M. et al. Agonist-induced internalization of the substance P (NK1) receptor expressed in epithelial cells. **Biochemistry Journal**, v. 303, p. 177-186, 1994.

---

GARTNER, L. P.; HIATT, J. L. Tratado de histologia em cores. In: \_\_\_\_\_. **Tecido nervoso**. 3. ed. Elsevier: Saunders, 2007. cap. 9, p. 211.

GILBEY, M. P.; MCKENNA, K. E.; SCHRAMM, L. P. Effects of substance P on sympathetic preganglionic neurones. **Neuroscience Letters**, v. 41, n. 1-2, p. 157-159, 1983.

GILLIS, R. A. et al. Evidence that substance P is a neurotransmitter of baro- and chemoreceptor afferents in nucleus tractus solitarius. **Brain Research**, v. 181, n. 2, p. 476-481, 1980.

GOIT, R. K.; ANSARI, A. H. Reduced parasympathetic tone in newly diagnosed essential hypertension. **Indian Heart Journal**, v. 68, n. 2, p. 153-157, 2016.

GOLD, P. E. Acetylcholine modulation of neural systems involved in learning and memory. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 80, n. 3, p. 194-210, 2003.

GORDON, F. J.; SVED, A. F. Neurotransmitters in central cardiovascular regulation: glutamate and gaba. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 29, n. 5-6, p. 522-524, 2002.

GOTTSCHALL, J. The diaphragm of the rat and its innervation. Muscle fiber composition; perikarya and axons of efferent and afferent neurons. **Anatomy and Embryology**, v. 161, n. 4, p. 405-417, 1981.

GOTTSCHALL, J.; GRUBER, H. The accessory phrenic nerve in the rat. **Anatomy and Embryology**, v. 151, n. 1, p. 63-69, 1977.

GRAHAM, J. B. et al. Chondroitinase applied to peripheral nerve repair averts retrograde axonal regeneration. **Experimental Neurology**, v. 203, n. 1, p. 185-195, 2007.

GRAHAM, R. C. Jr; KARNOVSKY, M. J. The early stages of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney: ultrastructural cytochemistry by a new technique. **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 14, n. 4, p. 291-302, 1966.

GRANATA, A. R. et al. A1 noradrenergic neurons tonically inhibit sympathoexcitatory neurons of C1 area in rat brainstem. **Brain Research**, v. 377, n. 1, p. 127-146, 1986.

---

GRANATA, A. R.; KUMADA, M.; REIS, D. J. Sympathoinhibition by A1-noradrenergic neurons is mediated by neurons in the C1 area of the rostral medulla. **Journal of the Autonomic Nervous System**, v. 14, n. 4, p. 387-395, 1985.

GRUBE, D. Immunoperoxidase methods: increased efficiency using fluorescence microscopy for 3,3-diaminobenzidine (DAB) stained semithin sections. **Histochemistry**, v. 70, n. 1, p. 19-22, 1980.

GUARD, S.; WATSON, S. P. Tachykinin receptor types: Classification and membrane signaling mechanisms. **Neurochemistry International**, v. 18, n. 2, p. 149-165, 1991.

GUYENET, P. G. et al. C1 neurons: the body's EMTs. **American Journal of Physiology. Regulatory, integrative and Comparative Physiology**, v. 305, n. 3, p. R187-R204, 2013.

GUYENET, P. G. Role of ventral medulla oblongata in blood pressure regulation. In LOEWY, A. D.; SPYER, K. M. (Ed.). **Central regulation of autonomic functions**. 1rd ed. New York: Oxford University Press, 1990. cap. 9, p. 145-167.

GUYENET, P.G. The sympathetic control of blood pressure. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 7, n. 5, p. 335-346, 2006.

HABEEB, A. F. S. A.; HIRAMOTO, R. Reaction of proteins with glutaraldehyde. **Archives of Biochemistry and Biophysic**, v. 126, n. 1, p. 16-26, 1968.

HAEUSLER, G.; OSTERWALDER, R. Evidence suggesting a transmitter or neuromodulatory role for substance P at the first synapse of the baroreceptor reflex. **Naunyn Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 314, n. 2, p. 111-121, 1980.

HALL, M. E.; MILEY, F. B.; STEWART, J. M. Cardiovascular effects of substance P peptides in the nucleus of the solitary tract. **Brain Research**, v. 497, n. 2, p. 280-290, 1989.

HANCOCK, M. B. Visualization of peptide-immunoreactive processes on serotonin-immunoreactive cells using two-color immunoperoxidase staining. **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 32, n. 3, p. 311-314, 1984.

---

HANSEN, J. T. Innervation of the rat aortic (subclavian) body: an ultrastructural study following axonal degeneration. **Journal of Ultrastructure Research**, v. 74, n. 1, p. 83-94, 1981.

HANWELL, M. D. et al. Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. **Journal of Cheminformatics**, v. 4, n. 1, p. 1-17, 2012.

HARRISON, S.; GEPETTI, P. Substance P. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 33, n. 6, p. 555-576, 2001.

HEBB, C. O.; KRNJEVIC, K.; SILVER, A. Acetylcholine and choline acetyltransferase in the diaphragm of the rat. **The Journal of Physiology**, v. 171, n. 3, p. 504-513, 1964.

HEIDENREICH, P. A. et al. Forecasting the future of cardiovascular disease in the United States: a policy statement from the American Heart Association. **Circulation**, v. 123, n. 8, p. 933-944, 2011.

HELKE, C. J. et al. Autoradiographic localization of substance P receptors in rat medulla: effect of vagotomy and nodose ganglionectomy. **Neuroscience**, v. 12, n. 1, p. 215-223, 1984.

HELKE, C. J. et al. Substance P neurons project from the ventral medulla to the intermediolateral cell column and ventral horn in the rat. **Brain Research**, v. 243, n. 1, p. 147-152, 1982.

HELKE, C. J.; CHARLTON, C. G.; KEELER, J. R. Bulbosplinal substance P and sympathetic regulation of cardiovascular system: a review. **Peptides**, v. 6, n. 2, p. 69-74. 1985.

HELKE, C. J.; GOLDMAN, W.; JACOBOWITZ, D. M. Demonstration of substance P in aortic nerve afferent fibers by combined use of fluorescent retrograde neuronal labeling and immunocytochemistry. **Peptides**, v. 1, n. 4, p. 359-364, 1980.

HELKE, C. J.; NIEDERER, A. J. Studies on the coexistence of substance P with other putative transmitters in the nodose and petrosal ganglia. **Synapse**, v. 5, n. 2, p. 144-151, 1990.

---

HELKE, C. J.; O'DONOHUE, T. L.; JACOBOWITZ, D. M. Substance P as a baro- and chemoreceptor afferent neurotransmitter: immunocytochemical and neurochemical evidence in the rat. **Peptides**, v. 1, n. 1, p. 1-9, 1980.

HELKE, C. J.; SEAGARD, J. L. Substance P in the baroreceptor reflex: 25 years. **Peptides**, v. 25, n. 3, p. 413-423, 2004.

HEUSSER, K. et al. Carotid baroreceptor stimulation, sympathetic activity, baroreflex function, and blood pressure in hypertensive patients. **Hypertension**, v. 55, n. 3, p. 619-626, 2010.

HEYDERMAN, E. Immunoperoxidase technique in histopathology: applications, methods, and controls. **Journal of Clinical Pathology**, v. 32, n. 10, p. 971-978, 1979.

HOITSMA, E. et al. Small fiber neuropathy: a common and important clinical disorder. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 227, n. 1, p. 119-130, 2004.

HÖKFELT, T. et al. Substance P: localization in the central nervous system and in some primary sensory neurons. **Science**, v. 190, n. 4217, p. 889-890, 1975.

HOPWOOD, D. Theoretical and practical aspects of glutaraldehyde fixation. **The Histochemical Journal**, v. 4, n. 4, p. 267-303, 1972.

HOPWOOD, D.; CALLEN, C. R.; MCCABE, M. The reactions between glutaraldehyde and various proteins. An investigation of their kinetics. **The Histochemical Journal**, v. 2, n. 2, p. 137-150, 1970.

HOUSER, C. R. et al. Organization and morphological characteristics of cholinergic neurons: an immunocytochemical study with a monoclonal antibody to choline acetyltransferase. **Brain Research**, v. 266, n. 1, p. 97-119, 1983.

HOUSLEY, G. D. et al. Brain stem projections of the glossopharyngeal nerve and its carotid sinus branch in the rat. **Neuroscience**, v. 22, n. 1, p. 237-250, 1987.

HYDE, T. M.; MISELIS, R. R. Subnuclear organization of the human caudal nucleus of the solitary tract. **Brain Research Bulletin**, v. 29, n. 1, p. 95-109, 1992.

---

INAGAKI, S. et al. Ontogeny of substance P-containing neuron system of the rat: immunohistochemical analysis-I. Forebrain and upper brain stem. **Neuroscience**, v. 7, n. 1, p. 251-277, 1982.

JACOBOWITZ, D. M.; HELKE, C. J. Localization of substance P immunoreactive nerves in the carotid body. **Brain Research Bulletin**, v. 5, n. 2, p. 195-197, 1980.

JARARI, N. et al. A review on prescribing patterns of antihypertensive drugs. **Clinical Hypertension**, v. 22, n. 7, p. 1-8, 2016.

JENSEN, A. A. et al. Neuronal nicotinic acetylcholine receptors: structural revelations, target identifications, and therapeutic inspirations. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 48, n. 15, p. 4705-4745, 2005.

JONAKAIT, G. M.; WALKER, P.D.; HART, R. P. Development of substance P (SP) containing cells in the central nervous system: consequences of neurotransmitter co-localization. **Progress in Neurobiology**, v. 36, n. 1, p. 1-21, 1991.

JORTNER, B. S. Preparation and analysis of the peripheral nervous system. **Toxicologic Pathology**, v. 39, n. 1, p. 66-72, 2011.

KALIA, M.; WELLES, R. V. Brain stem projections of the aortic nerve in the cat: a study using tetramethyl benzidine as the substrate for horseradish peroxidase. **Brain Research**, v. 188, n. 1, p. 23-32, 1980.

KARDON, M. B.; PETERSON, D. F.; BISHOP, V. S. Reflex heart rate control via specific aortic nerve afferents in the rabbit. **Circulation Research**, v. 37, n. 1, p. 41-47, 1975.

KARIM, F. et al. Responses of the heart to stimulation of aortic body chemoreceptors in dogs. **Circulation Research**, v. 46, n. 1, p. 77-83, 1980.

KARNOVSKY, M. J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **The Journal of Cell Biology**, v. 27, n. 2, p. 1A-149A, 1965.

KASUKURTHI, R. et al. Transcardial perfusion versus immersion fixation for assessment of peripheral nerve regeneration. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 184, n. 2, p. 303-309, 2009.

---

KAWANO, H.; MASUKO, S. Synaptic contacts of substance P-immunoreactive axon terminals in the nucleus tractus solitaries onto neurons projecting to the caudal ventrolateral medulla oblongata in the rat. **Brain Research**, v. 754, n. 1-2, p. 315-320, 1997.

KNIGHT, D. S. et al. Substance P-immunoreactive nerves in the rat kidney. **Journal of the Autonomic Nervous System**, v. 21, n. 2-3, p. 145-155, 1987.

KOBAYASHI, M. et al. Is the aortic depressor nerve involved in arterial chemoreflexes in rats? **Journal of the Autonomic Nervous System**, v. 78, n. 1, p. 38-48, 1999.

KORNELIUSSEN, H.; WAERHAUG, O. Three morphological types of motor nerve terminals in the rat diaphragm, and their possible innervation of different muscle fiber types. **Zeitschrift fur Anatomie und Entwicklungsgeschichte**, v. 140, n. 1, p. 73-84, 1973.

KOSAKA, T. et al. Use of high concentrations of glutaraldehyde for immunocytochemistry of transmitter-synthesizing enzymes in the central nervous system. **Neuroscience**, v. 18, n. 4, p. 975-990, 1986.

KOVELL, L. C. et al. US hypertension management guidelines: a review of recent past and recommendations for the future. **Journal of American Heart Association**, v. 4, n. 12, p. e002315, 2015.

KRAUHS, J. M. Structure of rat aortic baroreceptors and their relationship to connective tissue. **Journal of Neurocytology**, v. 8, n. 4, p. 401-414, 1979.

KRAUSE, J. E. et al. Three rat preprotachykinin mRNAs encode the neuropeptides substance P and neurokinin A. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 84, n. 3, p. 881-885, 1987.

KRIEGER, E. M.; MARSEILLAN, R. F. Aortic depressor fibers in rat: an electrophysiological study. **The American Journal of Physiology**, v. 205, p. 771-774, 1963.

KUBO, T.; KIHARA, M. Blood pressure modulation by substance P in the rat nucleus tractus solitarius. **Brain Research**, v. 413, n. 2, p. 379-383, 1987.

KUMAR, P.; PRABHAKAR, N. R. Peripheral chemoreceptors: function and plasticity of the carotid body. **Comprehensive Physiology**, v. 2, n. 1, p. 141-219, 2012.

---



---

KURTZ, M. M. Identification, localization and receptor characterization of novel mammalian substance P-like peptides. **Gene**, v. 296, n. 1-2, p. 205-212, 2002.

LA ROVERE, M. T.; CHRISTENSEN, J. H. The autonomic nervous system and cardiovascular disease: role of n-3 PUFAs. **Vascular Pharmacology**, v. 71, p. 1-10, 2015.

LANDAU, B. R.; AKERT, K.; ROBERTS, T. S. Studies on the innervation of the diaphragm. **Journal of Comparative Neurology**, v. 119, n. 1, p. 1-10, 1962.

LANGFORD, L. A.; SCHMIDT, R. F. An electron microscopic analysis of the left phrenic nerve in the rat. **The Anatomical Record**, v. 205, n. 2, p. 207-213, 1983.

LAWSON, S. N. et al. Primary sensory neurons: neurofilament, neuropeptides, and conduction velocity. **Brain Research Bulletin**, v. 30, n. 3-4, p. 239-243, 1993.

LEE, Y. et al. Distribution of calcitonin gene-related peptide in the rat peripheral nervous system with reference to its coexistence with substance P. **Neuroscience**, v. 15, n. 1227-1237, 1985.

LEEMAN, S. E.; GAMSE, R. Substance P in sensory neurons. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 2, p. 119-121, 1981.

LEMBECK, F.; GAMSE, R. Substance P in peripheral sensory processes. **Ciba Foundation Symposium**, v. 91, p. 35-54, 1982.

LEVEY, A. L. et al. A light and electron microscopic procedure for sequential double antigen localization using diaminobenzidine and benzidine dihydrochloride. **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 34, n. 11, p. 1449-1457, 1986.

LI, C. L.; BAK, A. Excitability characteristics of the A- and C-fibers in a peripheral nerve. **Experimental Neurology**, v. 50, n. 1, p. 67-79, 1976.

LI, Y. W.; GUYENET, P. G. Effect of substance P on C1 and other bulbospinal cells of the RVLM in neonatal rats. **The American Journal of Physiology**, v. 273, n. 2 Pt 2, p. R805-R813, 1997.

LLEWELLYN-SMITH, I. J.; MINSON, J. B. Complete penetration of antibodies into vibratome sections after glutaraldehyde fixation and ethanol treatment: light and

---

---

electron microscopy for neuropeptides. **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 40, n. 11, p. 1741-1749, 1992.

LLEWELLYN-SMITH, I. J.; PILOWSKY, P.; MINSON, J. B. The tungstate-stabilized tetramethylbenzidine reaction for light and electron microscopic immunocytochemistry and for revealing biocytin-filled neurons. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 46, n.1, p. 27-40, 1993.

LOHMEIER, T. E. The sympathetic nervous system and long-term blood pressure regulation. **American Journal of Hypertension**, v. 14, n. 6 Pt 2, p. 147S-154S, 2001.

LOREZ, H. P.; HAEUSLER, G.; AEPPLI, L. Substance P neurones in medullary baroreflex areas and baroreflex function of capsaicin-treated rats. Comparison with other primary afferent systems. **Neuroscience**, v. 8, n. 3, p. 507-523, 1983.

LUKOVIC, L.; DE JONG, W.; DE WIED, D. Cardiovascular effects of substance P and capsaicin microinjected into the nucleus tractus solitarii of the rat. **Brain Research**, v. 422, n. 2, p. 312-318, 1987.

MADDEN, C. J.; SVED, A. F. Cardiovascular regulation after destruction of the C1 cell group of the rostral ventrolateral medulla in rats. **American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology**, v. 285, n. 6, p. H2734-H2748, 2003.

MAENO, H.; KIYAMA, H.; TOHYAMA, M. Distribution of the substance P receptor (NK-1 receptor) in the central nervous system. **Brain Research. Molecular Brain Research**, v. 18, n. 1-2, p. 43-58, 1993.

MAGGI, C. A. The mammalian tachykinin receptors. **General Pharmacological**, v. 26, n. 5, p. 911-944, 1995.

MAISH, M. M. The diaphragm. **Surgical Clinics of North America**, v. 90, n. 5, p. 955-968, 2010.

MALEY, B. E.; SASEK, C. A.; SEYBOLD, V. S. Substance P binding sites in the nucleus tractus solitarii of the cat. **Peptides**, v. 9, n. 6, p. 1301-1306, 1988.

MALTHE-SØRENSEN, D.; ØKTEDALEN, O. Substance P-like immunoreactivity in the phrenic nerve and diaphragm: Axonal transport of substance P in the phrenic nerve. **Neuroscience Letters**, v. 28, p. 269-274, 1982.

---

---

MANCIA, G. et al. Control of blood pressure by carotid sinus baroreceptors in human beings. **The American Journal of Cardiology**, v. 44, n. 5, p. 895-902, 1979.

MAZZONE, S. B.; GERAGHTY, D. P. Altered respiratory response to substance P and reduced NK1 receptor binding in the nucleus of the solitary tract of aged rats. **Brain Research**, v. 826, n. 1, p. 139-142, 1999.

MCCARTHY, P. W.; LAWSON, S. N. Cell type and conduction velocity of rat primary sensory neurons with substance P-like immunoreactivity. **Neuroscience**, v. 28, n. 3, p. 745-753, 1989.

MCCUBBIN, J. W.; MASSON, G. M. C.; PAGE, I. H. Aortic depressor nerve of the rat. **Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Thérapie**, v. 114, p. 303-306, 1958.

MCGEER, P. L. et al. Choline acetyltransferase localization in the central nervous system by immunohistochemistry. **Brain Research**, v. 81, n. 2, p. 373-379, 1974.

MENDELOWITZ, D. Localization and retention in vitro of fluorescently labeled aortic baroreceptor terminals on neurons from the nucleus tractus solitarius. **Brain Research**, v. 581, n. 2, p. 339-343, 1992.

MILNER, T. A. et al. Ultrastructural characterization of substance P-like immunoreactive neurons in the rostral ventrolateral medulla in relation to neurons containing catecholamine-synthesizing enzymes. **Journal of Comparative Neurology**, v. 270, n. 3, p. 427-445, 1988.

MISTROVA, E.; KRUZLIAK, P.; CHOTTOVA DVORAKOVA, M. Role of substance P in the cardiovascular system. **Neuropeptides**, v. 15, p. S0143-S4179, 2015. doi:10.1016/j.npep.2015.12.005.

MIURA, M.; REIS, D. J. The role of the solitary and paramedian reticular nuclei in mediating cardiovascular reflex responses from carotid baro- and chemoreceptors. **The Journal of Physiology**, v. 223, n. 2, p. 525-548, 1972.

MORÉLOT-PANZINI, C. et al. Conduction velocity of the human phrenic nerve in the neck. **Journal of Electromyography and Kinesiology**, v. 19, n. 1, p. 122-130, 2009.

MORILAK, D. A.; MORRIS, M.; CHALMERS, J. Release of substance P in the nucleus tractus solitarius measured by in vivo microdialysis: response to stimulation

---

---

of the aortic depressor nerve in rabbit. **Neuroscience Letters**, v. 94, n. 1-2, p. 131-137, 1988.

MORRIS, J. L. et al. Innervation of the large arteries and heart of toad (*Bufo marinus*) by adrenergic and peptide-containing neurons. **Cell and Tissue Research**, v. 243, n. 1, p. 171-184, 1986.

MORTEAU, O. et al. Hemokinin 1 is a full agonist at the substance P receptor. **Nature Immunology**, v. 2, n. 12, p. 1088, 2001.

MOZAFFARIAN, D. et al. Heart disease and stroke statistics 2015 update: a report from the American Heart Association. **Circulation**, v. 131, n. 4, p. e29-e322, 2015.

MRINI, A. et al. Efficient immunodetection of various protein antigens in glutaraldehyde-fixed brain tissue. **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 43, n. 12, p. 1285-1291, 1995.

MULLER BOTHA, G. S. The anatomy of phrenic nerve termination and the motor innervation of the diaphragm. **Thorax**, v. 12, n. 1, p. 50-56, 1957.

MURTHY, V. S. et al. Pentobarbital-induced changes in vagal tone and reflex vagal activity in rabbits. **European Journal of Pharmacology**, v. 84, n. 1-2, p. 41-50, 1982.

NAKANE, P. K.; PIERCE, G. B. Jr. Enzyme-labeled antibodies for the light and electron microscopy localization of tissue antigens. **The Journal of Cell Biology**, v. 33, n. 2, p. 307-318, 1967.

NAKAYA, Y. et al. Immunohistochemical localization of substance P receptor in the central nervous system of the adult rat. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 347, n. 2, p. 249-274, 1994.

NAVE, K. A.; WERNER, H. B. Myelination of the nervous system: mechanisms and functions. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 30, p. 503-533, 2014.

NAWA, H.; KOTANI, H.; NAKANISHI, S. Tissue-specific generation of two preprotachykinin mRNAs from one gene by alternative RNA splicing. **Nature**, v. 312, n. 5996, p. 729-734, 1984.

---

NGUYEN, Q. T. et al. Managing hypertension in the elderly: a common chronic disease with increasing age. **American Health and Drug Benefits**, v. 5, n. 3, p. 146-153, 2012.

OBBERG, B. Reflex cardiovascular responses to graded stimulations of medullated and non-medullated afferents in the carotid sinus and aortic nerves in the cat. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 113, n. 2, p. 129-137, 1981.

ODA, Y. Choline acetyltransferase: the structure, distribution and pathologic changes in the central nervous system. **Pathology International**, v. 49, n. 11, p. 921-937, 1999.

OHNISHI, A.; OFFORD, K.; DYCK, P. J. Studies to improve fixation of human nerves: Part 1. Effect of duration of glutaraldehyde fixation on peripheral nerve morphometry. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 23, n. 2, p. 223-226, 1974.

OLIVEIRA, F. S. et al. Ultrastructural and morphometric alterations in the aortic depressor nerve of rats due to long term experimental diabetes: effects of insulin treatment. **Brain Research**, v. 1491, p. 197-203, 2013.

OLSHANSKY, B. et al. Parasympathetic nervous system and heart failure: pathophysiology and potential implications for therapy. **Circulation**, v. 118, n. 8, p. 863-871, 2008.

PAGE, N. M. et al. Characterization of the endokinins: human tachykinins with cardiovascular activity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 10, p. 6245-6250, 2003.

PAGE, N. M. Hemokinins and endokinins. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 61, n. 13, p. 1652-1663, 2004.

PALKOVITS, M.; ZABORSZKY, L. Neuroanatomy of central cardiovascular control. Nucleus tractus solitarii: afferent and efferent neuronal connections in relation to the baroreceptor reflex arch. **Progress in Brain Research**, v. 47, p. 9-34, 1977.

PANNETON, W. M.; LOEWY, A. D. Projections of the carotid sinus nerve to the nucleus of the solitary tract in the cat. **Brain Research**, v. 191, n. 1, p. 239-244, 1980.

PAULIS, L.; UNGER T. Novel therapeutic targets for hypertension. **Nature Reviews Cardiology**, v. 7, n. 8, p. 431-441, 2010.

---

PELLETIER, C. L.; SHEPHERD, J. T. Circulatory reflexes from mechanoreceptors in the cardio-aortic area. **Circulation Research**, v. 33, p. 131-138, 1973.

PENNEFATHER, J. N. et al. Tachykinins and tachykinin receptors: a growing family. **Life Sciences**, v. 74, n. 12, p. 1445-1463, 2004.

PEREIRA, J. R. et al. Análise das demanda judiciais para o fornecimento de medicamentos pela Secretaria de Estado da Saúde de Santa Catarina nos anos de 2003 e 2004. **Ciência e Saúde Coletiva**, v. 15, p. 3551-3560, 2010.

PESQUISA NACIONAL DE SAÚDE (PNS). Percepção do estado de saúde, estilos de vida e doenças crônicas: Brasil, grandes regiões e unidades da Federação. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). In:\_\_\_\_\_. **Diagnóstico médico de hipertensão arterial**. Rio de Janeiro, 2013. Disponível em: <ftp://ftp.ibge.gov.br/PNS/2013/pns2013.pdf>. Acesso em: 22 mar. 2016.

PILOWSKY, P. M. et al. Inhibition of vasodepressor neurons in the caudal ventrolateral medulla of the rabbit increases both arterial pressure and the release of neuropeptide Y-like immunoreactivity from the spinal cord. **Brain Research**, v. 420, n. 2, p. 380-384, 1987.

PINTO, T. O. et al. Electrical stimulation of the aortic depressor nerve in conscious rats overcomes the attenuation of the baroreflex in chronic heart failure. **American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 310, n. 7, p. R612-R618, 2016.

PURVES, D. et al. **Neurociências**. Porto Alegre: Artmed. 2005. 127-128 p.

QUARLES, R. H.; MACKLIN, W. B.; MORELL, P. Myelin formation, structure, and biochemistry. In: SIEGEL, G.; ALBERS, R. W.; BRADY, S.; PRICE, S. (Ed.). **Basic neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects**. 7rd ed. Elsevier Academic Press, 2006. Cap. 4, p. 51-70.

QUERRY R. G. et al. Anatomical and functional characteristics of carotid sinus stimulation in humans. **American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology**, v. 280, n. 5, p. H2390-H2398, 2001.

RAMOS-VARA, J. A. Technical aspects of immunohistochemistry. **Veterinary Pathology**, v. 42, n. 4, p. 405-426, 2005.

---

REA, R. F.; ECKBERG, D. L. Carotid baroreceptor-muscle sympathetic relation in humans. **The American Journal of Physiology**, v. 253, n. 6 Pt 2, p. R929-R934, 1987.

REGOLI, D.; BOUDON, A.; FAUCHÈRE, J. L. Receptors and antagonists for substance P and related peptides. **Pharmacological Reviews**, v. 46, n. 4, p. 551-599, 1994.

REYES DEL PASO, G. A. et al. The effect of baroreceptor stimulation on pain perception depends on the elicitation of the reflex cardiovascular response: Evidence of the interplay between the two branches of the baroreceptor system. **Biological Psychology**, v. 101, p. 82-90, 2014.

RIBEIRO DA SILVA, A.; HÖKFELT, T. Neuroanatomical localisation of substance in the CNS and sensory neurons. **Neuropeptides**, v. 34, n. 5, p. 256-271, 2000.

RIKARD-BELL, G. C.; BYSTRZYCKA, E. K. Localization of phrenic motor nucleus in the cat and rabbit studied with horseradish peroxidase. **Brain Research**, v. 194, n. 2, p. 479-483, 1980.

RODRIGUES FILHO, O. A.; FAZAN, V. P. Streptozotocin induced diabetes as a model of phrenic nerve neuropathy in rats. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 151, n. 2, p. 131-138, 2006.

RODRIGUES, A. R. et al. Morphometric analysis of the phrenic nerve in male and female Wistar-Kyoto (WKY) and spontaneously hypertensive rats (SHR). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 44, n. 6, p. 583-591, 2011.

ROGER V. L. et al. Heart disease and stroke statistics-2012 update. A report from the American Heart Association. **Circulation**, v. 125, n.1, e2-e220, 2012.

ROSS, C. A.; RUGGIERO, D. A.; REIS, D. J. Projections from the nucleus tractus solitarius to the rostral ventrolateral medulla. **The Journal of the Comparative Neurology**, v. 242, n. 4, p. 511-534, 1985.

RUDAS, L. et al. Human sympathetic and vagal baroreflex responses to sequential nitroprusside and phenylephrine. **The American Journal of Physiology**, v. 276, n. 5 Pt 2, p. H1691-H1698, 1999.

---

SABATINI, D. S.; BENSCH, K.; BARNETT, R.J. Cytochemistry and electron microscopy. The preservation of cellular ultrastructure and enzymatic activity by aldehyde fixation. **The Journal of Cell Biology**, v. 17, p. 19-58, 1963.

SANDERS, J. S.; FERGUSON, D. W.; MARK, A. L. Arterial baroreflex control of sympathetic nerve activity during elevation of blood pressure in normal man: dominance of aortic baroreflexes. **Circulation**, v. 77, n. 2, p. 279-288, 1988.

SANT'AMBROGIO, G. et al. Motor innervation and pattern of activity of cat diaphragm. **Journal of Applied Physiology**, v. 18, n. 43, p. 43-46, 1963.

SAPRU, H. N.; GONZALEZ, E.; KRIEGER, A. J. Aortic nerve stimulation in the rat: cardiovascular and respiratory responses. **Brain Research Bulletin**, v. 6, p. 393-398, 1981.

SAPRU, H. N.; KRIEGER, A. J. Carotid and aortic chemoreceptor function in the rat. **Journal of Applied Physiology: Respiratory, Environmental and Exercise Physiology**, v. 42, n. 3, p. 344-348, 1977.

SARKAR, B. B. The depressor nerve of the rabbit. **Proceedings of the Royal Society of London**, v. 93, n. 651, p. 230-235, 1922.

SARTER, M.; PARIKH, V. Choline transporters, cholinergic transmission and cognition. **Nature Review. Neuroscience**, v. 6, n. 1, p. 48-56, 2005.

SCHMIDT, E. M.; STROMBERG, M. W. The myelinated fibers in the aortic nerve of swine. **The Anatomical Record**, v. 159, n. 1, p. 41-46, 1967.

SCHREIHOFFER, A. M.; GUYENET, P. G. The baroreflex and beyond: control of sympathetic vasomotor tone by GABAergic neurons in the ventrolateral medulla. **Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology**, v. 29, n. 5-6, p. 514-521, 2002.

SEAGARD, J. L.; DEAN, C.; HOPP, F. A. Modulation of the carotid baroreceptor reflex by substance P in the nucleus tractus solitarius. **Journal of the Autonomic Nervous System**, v. 78, n. 2-3, p. 77-85, 2000.

SHULTS, C. W. et al. A comparison of the anatomical distribution of substance P and substance P receptors in the rat central nervous system. **Peptides**, v. 5, n. 6, p. 1097-1128, 1984.

---



---

SILVANI, A. et al. Bidirectional interactions between the baroreceptor reflex and arousal: an update. **Sleep Medicine**, v. 16, n. 2, p. 210-216, 2015.

SIMANSKY, D. A. et al. Diaphragm plication following phrenic nerve injury: a comparison of paediatric and adult patients. **Thorax**, v. 57, p. 613-616, 2002.

SMITH, S. et al. Neural modulation for hypertension and heart failure. **International Journal of Cardiology**, v. 214, p. 320-330, 2016.

SPURGEON, D. NIH promotes use of lower cost drugs for hypertension. **The BMJ Clinical Research**, v. 328, n. 7439, p. 539, 2004.

STOLL, G. et al. Wallerian degeneration in the peripheral nervous system: participation of both Schwann cells and macrophages in myelin degradation. **Journal of Neurocytology**, v. 18, n. 5, p. 671-683, 1989.

STREEFLAND, C.; JANSEN, K. Intramedullary projections of the rostral nucleus of the solitary tract in the rat: Gustatory influences on autonomic output. **Chemical Senses**, v. 24, n. 6, p. 655-664, 1999.

SUMAL, K. K. et al. Synaptic interaction of vagal afferents and catecholaminergic neurons in the rat nucleus tractus solitarius. **Brain Research**, v. 277, n.1, p. 31-40, 1983.

SVED, A. F.; ITO, S.; MADDEN, C. J. Baroreflex dependent and independent roles of the caudal ventrolateral medulla in cardiovascular regulation. **Brain Research Bulletin**, v. 51, n. 2, p. 129-133, 2000.

TAKANO, Y.; LOEWY, A. D. [3H] substance P binding in the intermediolateral cell column and striatum of the rat. **Brain Research**, v. 311, n. 1, p. 144-147, 1984.

TALMAN, W. T.; PERRONE, M. H.; REIS, D.J. Evidence for L-glutamate as the neurotransmitter of baroreceptor afferent nerve fibers. **Science**, v. 209, n. 4458, p. 813-815, 1980.

TANIUCHI, M. et al. Expression of nerve growth factor receptors by Schwann cells of axotomized peripheral nerves: ultrstructural location, suppression by axonal contact, and binding properties. **The Journal of the Neuroscience**, v. 8, n. 2, p. 664-681, 1988.

---

TEIXEIRA, F. J.; ARANDA, F.; BECKER, L. E. Postnatal maturation of phrenic nerve in children. **Pediatric Neurology**, v. 8, n. 6, p. 450-454, 1992.

THE ACCORD STUDY GROUP. Effects of intensive blood pressure control in type 2 diabetes. **The New England Journal of Medicine**, v. 362, n. 17, p. 1575-1585, 2010.

THOMAS, G. D. Neural control of the circulation. **Advanced of Physiology Education**, v. 35, n. 1, p. 28-32, 2011.

THORÉN, P.; ANDRESEN, M. C.; BROWN, A. M. Resetting of aortic baroreceptors with non-myelinated afferent fibers in spontaneously hypertensive rats. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 117, n. 1, p. 91-97, 1983.

THORÉN, P.; SAUM, W. R.; BROWN, A. M. Characteristics of rat aortic baroreceptors with nonmedullated afferent nerve fibers. **Circulation Research**, v. 40, n. 3, p. 231-237, 1977.

TIMMERS, H. J. L. M. et al. Denervation of carotid baro-and chemoreceptors in humans. **The Journal of Physiology**, v. 553, n. 1, p. 3-11, 2003.

TIWARI, P. et al. Basic and modern concepts on cholinergic receptor: A review. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 3, n. 5, p. 413-420, 2013.

TUMA, R. F. et al. Age-related changes in regional blood flow in the rat. **The American Journal of Physiology**, v. 249, n. 3 Pt 2, p. H485-H491, 1985.

TURNER, M. J. et al. Open-loop characteristics of the arterial baroreflex after blockade of unmyelinated baroreceptors with resiniferatoxin. **Autonomic Neuroscience: Basic & Clinical**, v. 193, p. 38-43, 2015.

TURNER, M. J. et al. Sustained reduction in blood pressure from electrical activation of the baroreflex is mediated via the central pathway of unmyelinated baroreceptors. **Life Sciences**, v. 106, n. 1-2, p. 40-49, 2014.

UNGER, T. et al. Central blood pressure effects of substance P and angiotensin II: role of the sympathetic nervous system and vasopressin. **European Journal of Pharmacology**, v. 71, n. 1, p. 33-42, 1981.

---

USDIN, T. B. et al. Molecular biology of the vesicular Ach transporter. **Trends in Neurosciences**, v. 18, n. 5, p. 218-224, 1995.

VALENTI, V. E. et al. Regulação neural do Sistema cardiovascular: centros bulbares. **Revista Neurociências**, v. 15, n. 4, p. 317-320, 2007.

VAN GIERSBERGEN, P. L.; PALKOVITS, M.; DE JONG, W. Involvement of neurotransmitters in the nucleus tractus solitarii in cardiovascular regulation. **Physiological Review**, v. 72, n. 3, p. 789-824, 1992.

VANDESANDE, F. A critical review of immunocytochemical methods for light microscopy. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 1, n. 1, p. 3-23, 1979.

VEITCH, N. C. Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. **Phytochemistry**, v. 65, n. 3, p. 249-259, 2004.

VON EULER, U. S. Substance P in subcellular particles in peripheral nerves. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 104, p. 449-463, 1963.

VON EULER, U. S.; GADDUM, J. H. An unidentified depressor substance in certain tissue extracts. **The Journal of Physiology**, v. 72, n. 1, p. 74-87, 1931.

WALKER, P. D. et al. A comparison of substance P peptide and preprotachykinin mRNA levels during development of rat medullary raphe and neostriatum. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 9, n. 1, p. 41-55, 1991.

WALLACH, J. H.; LOEWY, A. D. Projections of the aortic nerve to nucleus tractus solitaries in the rabbit. **Brain Research**, v. 188, n. 1, p. 247-251, 1980.

WANG, J. et al. Synaptic and neurotransmitter activation of cardiac vagal neurons in the nucleus ambiguus. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 940, p. 237-246, 2001.

WEBSTER, H.; COLLINS, G.H. Comparison of osmium tetroxide and glutaraldehyde perfusion fixation for the electron microscopy study of the normal rat peripheral nervous system. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**, v. 23, p. 109-126, 1964.

---

WEIR, E. E. et al. A more sensitive and specific histochemical peroxidase stain for the localization of cellular antigen by the enzyme-antibody conjugate method. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 22, n. 12, p. 1135-1140, 1974.

WEYER, G. W.; DUNLAP, B.; SHAH, S. D. Hypertension in women: Evaluation and management. **Obstetrics and Gynecology Clinics of North America**, v. 43, n. 2, p. 287-306, 2016.

WHITE, D. M. Release of substance P from peripheral sensory nerve terminals. **Journal of the Peripheral Nervous System**, v. 2, n. 3, p. 191-201, 1997.

WHITE, D. M.; HELME, R. D. Release of substance P from peripheral nerve terminals following electrical stimulation of the sciatic nerve. **Brain Research**, v. 336, n. 1, p. 27-31, 1985.

WHITWAM, J. G. Classification of peripheral nerve fibre. An historical perspective. **Anaesthesia**, v. 31, n. 4, p. 494-503, 1976.

WIDIMSKÝ, J. The role of arterial hypertension in the primary prevention of stroke. **Cor et Vasa**, v. 58, n. 2, p. e279-e286, 2015.

WILCOX, P. et al. Phrenic nerve palsies an persistent respiratory acidosis in a patient with diabetes mellitus. **Chest**, v. 93, n. 4, p. 693-698, 1988.

WIXSON, S. K. et al. The effects of pentobarbital, fentanyl, droperidol, ketamine-xylazine and ketamine-diazepam on arterial blood pH, blood gases, mean arterial blood pressure and heart rate in adult male rats. **Laboratory Animal Science**, v. 37, n. 6, p. 736-742, 1987.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. A global brief on hypertension. In: \_\_\_\_\_. **Hypertension: the basic facts**. Suíça, 2013. p.17. Disponível em: <[http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/79059/1/WHO\\_DCO\\_WHD\\_2013.2\\_eng.pdf?ua=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/79059/1/WHO_DCO_WHD_2013.2_eng.pdf?ua=1)>. Acesso em: 15 abr. 2016.

YAKSH, T. L. et al. Intrathecal morphine inhibits substance P release from mammalian spinal cord in vivo. **Nature**, v. 286, n. 5769, p. 155-157, 1980.

YU, D.; GORDON, F. J. Anatomical evidence for a bi-neuronal pathway connecting the nucleus tractus solitarius to caudal ventrolateral medulla to rostral ventrolateral medulla in the rat. **Neuroscience Letters**, v. 205, n. 1, p. 21-24, 1996.

---

ZANUTTO, B. S.; VALENTINUZZI, M. E.; SEGURA, E. T. Neural set point for the control of arterial pressure: role of the nucleus tractus solitarius. **Biomedical Engineering Online**, v. 9, n. 4, p. 1-13, 2010.

ZHANG, Y. et al. Hemokinin is a hematopoietic-specific tachykinin that regulates B lymphopoiesis. **Nature Immunology**, v. 1, n. 5, p. 392-397, 2000.



## 8. ANEXOS

### 8.1. Comitê de ética em pesquisa



## 8.2. Artigo e trabalhos publicados em anais de congresso



### Ultrastructural Morphometry of the Aortic Depressor Nerves and Extrinsic Renal Nerves: Similarities and Differences between Mice and Rats

da Silva Carvalho C<sup>1</sup>, Sato KL<sup>2,3</sup>, Castania JA<sup>4</sup>, Salgado HC<sup>4</sup>, Nessler RA<sup>3</sup> and Fazan VPS<sup>1,3,5\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Neuroscience and Behavioral Neurosciences, School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil

<sup>2</sup>Department of Physical Therapy, Federal University of Sergipe, Sergipe, SP, Brazil

<sup>3</sup>Central Microscopy Research Facility, The University of Iowa, Iowa City, IA, USA

<sup>4</sup>Department of Physiology, School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil

<sup>5</sup>Department of Surgery and Anatomy, School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil

\*Corresponding author: Valeria Paula Sassoli Fazan, M.D., Ph.D., Associate Professor, Department of Surgery and Anatomy, School of Medicine of Ribeirão Preto, USP, Av. Bandeirantes 3900, Ribeirão Preto, SP, Brazil, 14049-900, Tel: +55 16 3602-4634; Fax: +55 16 3633-0017; E-mail: [vpsfazan@yahoo.com.br](mailto:vpsfazan@yahoo.com.br); [vpsfazan@gmail.com](mailto:vpsfazan@gmail.com)

Rec date: Apr 14, 2014, Acc date: May 23, 2014, Pub date: May 25, 2014

Copyright: © 2014 da Silva Carvalho, et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

#### Abstract

Anatomical and physiological aspects involving rats and mice have shown similarities and differences between these experimental animal models. In cardiovascular physiology research, rats are being substituted by mice since mice are more susceptible to genetic manipulation. Nevertheless, little is known about mice normal anatomy and/or physiology to allow the correct interpretation of altered responses on genetically manipulated animals. We compared morphometric ultrastructural parameters of the aortic depressor nerve (ADN) and extrinsic renal nerve (SRN) between Wistar rats and C57BL/6J mice. After spontaneous activity recordings together with the arterial pressure pulse, ADN and SRN were dissected and prepared for light and transmission electron microscopy. Morphometry was performed with an image analysis software and took into consideration the fascicle area and diameter, myelinated and unmyelinated fiber number, density, area and diameter, myelin sheath area and the g-ratio. Comparisons were made for the same nerve between mice and rats and differences were considered significant when  $p < 0.05$ . Both nerves were large in rats compared to mice, as were the myelinated fibers. On the other hand, unmyelinated fibers density, size and distributions were not different between species. These results suggest physiological differences on the fast conduction fibers between species, with possible different functional role. Morphological comparisons of the quantitative composition of peripheral nerves in different species and strains are very rare. Our study contributes to a morphological understanding of important nerves related to cardiovascular reflexes in two animal models. It also presents, for the first time, ultrastructural morphometric characteristics of the ADN in mice. This data provide a morphological basis for further studies involving functional investigations for reflex regulation of circulation in experimental model of hypertension and to improved cardiovascular system knowledge.







## The Journal of Pain

Available online 1 July 2016

In Press, Accepted Manuscript — Note to users



## Resident macrophages in muscle contribute to development of hyperalgesia in a mouse model of non-inflammatory muscle pain

Wei-Yi Gong, MD, PhD<sup>a, b, \*</sup>, Ramy E. Abdelhamid, PhD<sup>b, \*</sup>, Carolina S. Carvalho<sup>b</sup>, Kathleen A. Sluka, PhD, PT<sup>b</sup>  

[+ Show more](#)

doi:10.1016/j.jpain.2016.06.010

[Get rights and content](#)

### Accepted Manuscript

Resident macrophages in muscle contribute to development of hyperalgesia in a mouse model of non-inflammatory muscle pain

Wei-Yi Gong, MD, PhD, Ramy E. Abdelhamid, PhD, Carolina S. Carvalho, Kathleen A. Sluka, PhD, PT



PII: S1526-5900(16)30111-0

DOI: [10.1016/j.jpain.2016.06.010](https://doi.org/10.1016/j.jpain.2016.06.010)

Reference: YJPAI 3271

To appear in: *Journal of Pain*

Received Date: 27 October 2014

Revised Date: 4 April 2016

Accepted Date: 21 June 2016

Please cite this article as: Gong W-Y, Abdelhamid RE, Carvalho CS, Sluka KA, Resident macrophages in muscle contribute to development of hyperalgesia in a mouse model of non-inflammatory muscle pain, *Journal of Pain* (2016), doi: 10.1016/j.jpain.2016.06.010.

User Name

Password


LOG-IN

Go

Advanced >

## Identification of Substance P Immunoreactive Axons in the Aortic Depressor Nerve (ADN) of Normotensive Wistar Rats

Carolina Carvalho<sup>1</sup>, Jaci Castania<sup>2</sup>, Helio Salgado<sup>2</sup>, Ida Llewellyn-Smith<sup>3</sup> and Valéria Paula Fazan<sup>1</sup>

 Author Affiliations

### Abstract

The ADN conveys baroreceptor afferent input to the nucleus tractus solitarius (NTS) and contains unmyelinated and small myelinated fibers at a ratio of 4:1, respectively [1]. The consensus is that myelinated fibers provide rapid baroreflex control while unmyelinated fibers mainly inhibit vasomotor centers. Substance P (SP) is a primary neurotransmitter of the baroreflex. Nerve terminals with SP immunoreactivity occur in the aortic arch, nodose ganglia and NTS [2] but SP has not been demonstrated in the ADN. Twenty 20-week old Wistar rats (10 male, 10 female) were anesthetized and had their left ADN isolated for recording spontaneous activity. ADN and phrenic nerves (positive controls) were removed, fixed in 2.5% glutaraldehyde to optimize preservation of axonal morphology and cryosectioned transversely (18  $\mu$ m) or longitudinally (16  $\mu$ m). Slide-mounted sections were incubated in rabbit anti-substance P (1:10,000), biotinylated donkey anti-rabbit IgG (1:500) and finally Extravidin-HRP (1:1,500), all for 24hr. A nickel-intensified diaminobenzidine reaction [3] revealed immunoreactivity. Small SP-positive axons, mainly unmyelinated, were present in all sections. These results show that SP can be detected in nerves that have been immersion-fixed in a high concentration of glutaraldehyde. This method will allow quantification of ADN axons with a specific physiological role in the baroreflex. [1]Fazan et al, 1997, Hypertension, 30:693 [2]Gillis et al, 1980, Brain Res 181, 476 [3]Llewellyn-Smith et al, 2005, J Comp Neurol 488:278 **Support:** FAPESP, CNPq, CAPES

< Previous | Next Article >  
Table of Contents

### This Article

April 2015  
*The FASEB Journal*  
vol. 29 no. 1 Supplement  
704.5

> Abstract

Article Usage Stats

Article Usage Statistics

Classifications


Services

Email this article to a  
colleague

Alert me when this article is  
cited

Alert me if a correction is  
posted

Similar articles in this journal  
Download to citation  
manager

 Get Permissions

Citing Articles

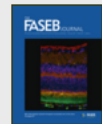
Google Scholar

PubMed

Sharing

### Current Issue

February 2016, 30 (2)



Alert me to new issues of The  
FASEB Journal

Submit Manuscripts to  
The FASEB Journal

Press Room

Information for Authors

Information for Reviewers

Editorial Board

Editorial Policies

Subscriptions

Librarian's Resource

Activate Online

View Collected Papers

Breakthroughs in Bioscience



THE  
**FASEB** JOURNAL  
The Official Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology

User Name

Password

---

HOME | CURRENT ISSUE | NEW ARTICLES | ARCHIVE | ALERTS | RSS | SUBMIT | HELP

Institution: CAPES

Advanced >

---

## An Immunohistochemistry Protocol to Identify Substance P Neurons ➔

**Ana Leda Simões<sup>1</sup>, Carolina Carvalho<sup>1</sup>, Luciana Sanada<sup>1</sup>, Nathalia Leilane Machado<sup>1</sup>, Elisabete Carmo<sup>1</sup>, Ida Llewellyn-Smith<sup>2</sup> and Valeria Paula Fazan<sup>1</sup>**

Author Affiliations

### Abstract

Substance P (SP), calcitonin gene-related peptide (CGRP) and isolectin B4 (IB4) are markers for peripheral sensory neurons with unmyelinated axons. It is important to understand plasticity in peripheral pain pathways, particularly in neonates when noxious stimuli are processed by pathways that are still maturing. Our laboratory [1] has shown that, in rats experiencing painful stimuli as neonates changes in nociception-related cortical motor, sensory and limbic areas persist for up to 180 day. This study aimed to validate an immunohistochemistry (IHC) method for dorsal root ganglion (DRG) neurons to further investigate the effects of neonatal pain on these cells. Six male Wistar rats aged 15 and 180 days were anesthetized and perfused with 4% buffered paraformaldehyde. L6 DRG were removed and frozen. Cryosections (16 µm) were incubated in rabbit anti-substance P (1:1.000; 24hs), biotinylated anti-rabbit IgG (1:500; 24hs) and finally Extravidin-HRP (1:1.500; 24hs). A nickel-intensified diaminobenzidine reaction revealed immunoreactivity [2]. Small SP-containing neurons were stained in all of the 15- and 180-day DRG. This method is reliable, reproducible and effective in identifying substance P in small DRG neurons. Future studies will use the technique to localize CGRP immunoreactivity and IB4 binding in DRG neurons from the same animals. [1] Sanada et al, 2014, Int J Dev Neurosci, 35:55. [2] Llewellyn-Smith et al, 2005, J Comp Neurol 488:278.

« Previous | Next Article »  
Table of Contents

#### This Article

April 2015  
*The FASEB Journal*  
vol. 29 no. 1 Supplement  
704.4

» Abstract

Article Usage Stats

Article Usage Statistics

Classifications

Services

Email this article to a colleague  
Alert me when this article is cited  
Alert me if a correction is posted  
Similar articles in this journal  
Download to citation manager

Citing Articles

Google Scholar

PubMed

Sharing

#### Current Issue

February 2016, 30 (2)



Alert me to new issues of The FASEB Journal

---



**THE FASEB JOURNAL**  
The Official Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology

User Name

Password

HOME | CURRENT ISSUE | NEW ARTICLES | ARCHIVE | ALERTS | RSS | SUBMIT | HELP

Advanced »

## Immunohistochemical staining for neurotransmitter-related antigens in nerves fixed with high concentrations of glutaraldehyde (726.7)

Carolina Carvalho<sup>1</sup>, Jaci Castania<sup>2</sup>, Helio Salgado<sup>2</sup>, Valéria Paula Fazan<sup>1</sup> and Ida Llewellyn-Smith<sup>3</sup>

Author Affiliations

### Abstract

Immunohistochemistry (IHC) demonstrates specific antigens within tissues or cells and is usually done on formaldehyde-fixed tissues. However, for a detailed quantification of axons within nerve bundles, glutaraldehyde fixation is mandatory. We aimed to develop an IHC technique for nerves fixed with high concentrations of glutaraldehyde. Phrenic nerves from 8 male Wistar rats were removed, fixed in phosphate-buffered 2.5% glutaraldehyde and cryoprotected in 30% sucrose. Slide-mounted cryostat sections (16 µm thick) were incubated for 24 hr in goat polyclonal anti-choline acetyltransferase (ChAT; 1:1,000) or rabbit polyclonal anti-substance P (SP; 1:10,000) then transferred to biotinylated donkey anti-goat or donkey anti-rabbit immunoglobulin (1:500; 24 hr) before immersion in Extravidin-HRP (1:1,500; 24 hr). Immunoreactivity in axons was revealed with a nickel-intensified diaminobenzidine reaction. This method reproducibly revealed individual axons that contained immunoreactivity for ChAT or SP within the phrenic nerve. These results show that peptides and large proteins can be detected by IHC in nerves that have been immersion-fixed in a high concentration of glutaraldehyde. This method is reliable for identifying neurotransmitter-related antigens and will allow quantification of axons with specific physiological roles, which can be inferred from their neurochemical phenotypes.

*Grant Funding Source:* FAPESP, CAPES, CNPq and FAEPA

[« Previous](#) | [Next Article »](#)  
Table of Contents

#### This Article

April 2014  
*The FASEB Journal*  
vol. 28 no. 1 Supplement  
726.7

» [Abstract](#)

[Article Usage Stats](#)

Article Usage Statistics

[Classifications](#)

[Services](#)

Email this article to a colleague

Alert me when this article is cited

Alert me if a correction is posted

Similar articles in this journal

Download to citation manager

[Citing Articles](#)

[Google Scholar](#)

[PubMed](#)

[Sharing](#)

#### Current Issue

February 2016, 30 (2)



Alert me to new issues of The FASEB Journal

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

User Name

User Name

Password

\*\*\*\*\*

LOG-IN

Advanced »

Go

(The FASEB Journal. 2013;27:748.3)

© 2013 FASEB

748.3

## Sympathetic renal nerve ultrastructure: Comparative analysis between adult mice and rats.

Carolina Silva Carvalho<sup>1</sup>, Karina Laurenti Sato<sup>1,3</sup>, Jacy Airton Castania<sup>2</sup>, Randy Alan Nessler<sup>3</sup>, Helio Cesar Salgado<sup>2</sup> and Valéria Paula Sassoli Fazan<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Neurosciences and Behavioral Neurosciences, School of Medicine of Ribeirao Preto, Ribeirao Preto, Brazil

<sup>2</sup> Physiology, School of Medicine of Ribeirao Preto, Ribeirao Preto, Brazil

<sup>3</sup> Central Microscopy Research Facility, The University of Iowa, Iowa City, IA

The renal nerves exhibit efferent and afferent sympathetic fibers, crucial for regulation of renal function and input of sensory information from the kidneys to the central nervous system. The intrinsic renal innervation was widely described in rats. However, few reports deal with renal extrinsic innervation in rats and mice, and comparative studies between species have not been reported. We aimed to compare the ultrastructural and morphometric characteristics of the extrinsic renal nerves of adult rats and mice. A total of 15 left renal nerves, 5 from adult male C57BL/6 mice and 10 from adult male Wistar rats were used. The renal nerves were dissected and prepared for light and electron microscopy morphometry. As expected, the difference of the fascicular area and diameter was significant, being the nerves of mice smaller than rats. The myelinated fibers of rats were larger (diameter and area) compared to mice, but the number and density of these fibers were not different between species. No morphological differences were observed (number, area, diameter, and size distribution) on the unmyelinated fibers between species. Our results indicate that fascicle and myelinated fibers sizes accompany the animal size. The unmyelinated fibers, mainly responsible for the sympathetic functions of the renal nerve, do not differ between species in size and number, suggesting the absence of functional differences.

### Table of Contents

#### This Article

FASEB J.  
April 2013  
27 (Meeting Abstract  
Supplement) 748.3

#### ? Meeting Abstract

#### - Classifications

Anatomy: Neural

#### - Services

Alert me when this article is cited

Alert me if a correction is posted

Similar articles in this journal

© Get Permissions

+ Google Scholar

+ PubMed

+ Social Bookmarking

### Current Issue

February 2016, 30 (2)



Alert me to new issues of The FASEB Journal

Submit Manuscripts to The FASEB Journal

Press Room

Information for Authors

Information for Reviewers

Editorial Board

Editorial Policies

Subscriptions

Librarian's Resource

Activate Online

View Collected Papers

Breakthroughs in Bioscience

