

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
LABORATÓRIO DE FISIOLOGIA CARDIOVASCULAR
NÚCLEO DE PESQUISA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – NUPEB

***AVALIAÇÃO DA RESPONSABILIDADE DO REFLEXO BEZOLD-
JARISCH EM RATOS DESNUTRIDOS E SUBMETIDOS À
DESNERVAÇÃO SINO-AÓRTICA***

Ouro Preto, 2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
NÚCLEO DE PESQUISA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – NUPEB
LABORATÓRIO DE FISIOLOGIA CARDIOVASCULAR

***AVALIAÇÃO DA RESPONSABILIDADE DO REFLEXO BEZOLD-JARISCH EM RATOS
DESNUTRIDOS E SUBMETIDOS À DESNERVAÇÃO SINO-AÓRTICA***

AUTOR: Vanessa Moraes Bezerra

ORIENTADOR: Prof. Dr. Deoclécio Alves Chianca Júnior

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Luciano Gonçalves Fernandes

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, como parte integrante dos requisitos para obtenção do título de Mestre, em Ciências Biológicas, área de concentração: Bioquímica Estrutural e Fisiológica.

Ouro Preto, 2009

Este trabalho foi realizado no *Laboratório de Fisiologia Cardiovascular* do Departamento de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, com o auxílio do CNPq, FAPEMIG e UFOP.

*“Nós somos aquilo que fazemos repetidas vezes,
repetidamente. A experiência portanto não é um
feito, mas um hábito.”
(Aristóteles)*

Dedicatória

*À minha mãe, incentivo para que eu
lutasse por todos os meus sonhos.*

*Aos meus amigos, por fazer parte
desta conquista. Ao ensino público por me dar
mais essa oportunidade.*

Agradecimentos

A Deus, por sempre estar do meu lado tornando todos os meus sonhos em realidade.

Minha querida mãe, Nair Morais Bezerra, pelo apoio incondicional ao longo de todos esses anos.

Ao meu orientador Prof. Dr. Deoclécio Alves Chianca Júnior, por todas as oportunidades, ensinamentos, confiança, sinceridade, apoio e pela amizade.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Luciano Gonçalves Fernandes, pelos ensinamentos transmitidos, paciência e amizade.

Ao meu irmão, Eudes Vitor Bezerra, pelo carinho e confiança, meu irmão Igor Moraes Bezerra e meu pai José Vitor Bezerra. Demais parentes pelo apoio.

A amiga e companheira, Fabiana Aparecida Rodrigues, por todas as palavras de carinho e incentivo e pelo exemplo de pessoa e de competência.

Aos amigos que primeiramente contribuíram na minha iniciação científica: Arlete Rita Penitente e Igor de Oliveira Loss.

A todos do Laboratório de Fisiologia Cardiovascular pelo companheirismo e incentivo. A “galerinha” pelos inesquecíveis Happy Ours: Manoel, Carlito, Joelma, Fabis, João, Miriam, Fernanda e Natália.

Ao Jaci Castania, pelos importantes ensinamentos técnicos transmitidos, ao Laboratório de Fisiologia cardiovascular da USP-Ribeirão Preto.

Ao Laboratório de Hipertensão da UFMG, Prof. Dr. Marco Antônio Peliky fontes e seu aluno Carlos Henrique Xavier pela oportunidade, ensinamentos e parceria.

Ao Prof. Dr. Leonardo Máximo Cardoso (NUPEB-UFOP), pelos ensinamentos e competência.

Ao Leozinho pela curta, mais importante presença na realização deste trabalho e pela amizade.

A minha amada república Quarto Crescente, pelos belos anos vividos, obrigada meninas por todo apoio.

Aos amigos de mestrado, Ana Paula, Luiz, Bruno, Paula e Sonaly. Aos professores e colegas do NUPEB pelo convívio e auxílio.

Ao senhor Milton, pelo trabalho prestado, carinho, amizade e “pelações”.

Aos meus antigos professores e atuais colegas de trabalho do Departamento de Alimentos-DEALI da Escola de Nutrição-UFOP, meu muito obrigado pelo apoio, incentivo, e confiança; Cláudia Amaral, Maria Tereza de Freitas, Rinaldo Cardoso, Arlene Fausto e Aureliano da Cunha.

Ao Prof. Dr. Camilo Mariano (ENUT-UFOP), pelas sabias palavras e incentivo.

A Aparecida Trópia, pela assistência e disposição prestada.

Sumário

Lista de Figuras	ix
1 – INTRODUÇÃO.....	1
1.1 – Desnutrição e seus efeitos sobre o sistema fisiológico	1
1.2 – Mecanismos reflexos de controle da pressão arterial e frequência cardíaca.....	6
1.2.1 – Reflexo Bezold-Jarisch	8
2 – OBJETIVOS	11
2.1 – Objetivo Geral	11
2.2 – Objetivos Específicos.....	11
3 – MATERIAIS E MÉTODOS.....	12
3.1 – Modelo animal – desnutrição proteica	12
3.2 – Composição química das dietas	13
3.3 – Drogas utilizadas	14
3.4 – Confeção e implantação de cânulas arteriais e femorais	16
3.5 – Desnervação sino-aórtica (DSA).....	17
3.6 – Registro da pressão arterial e da frequência cardíaca	17
3.7 – Protocolo experimental para avaliação do reflexo barorreceptor e reflexo Bezold- Jarisch.....	18
3.8 – Protocolo experimental para avaliação do reflexo Bezold-Jarisch após bloqueio vagal	19
3.9 – Localização e isolamento do nervo renal	20
3.10 – Registro da atividade simpática para o nervo renal.....	21
3.11 – Análise dos dados e estatística	21
4 – RESULTADOS	24
4.1 – Efeito da desnutrição sobre o peso corporal dos ratos	24
4.2 – Valores basais de pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC).....	25
4.3 – Ativação e desativação barorreflexa	27

4.4 – Respostas cardiovasculares promovidas pela ativação do reflexo Bezold-Jarisch decorrentes de injeções endovenosas de fenilbiguanida	29
4.5 – Relação da variação de pressão arterial média em função da frequência cardíaca ..	33
4.6 – Efeitos do bloqueio vagal sobre a resposta hipotensora e bradicárdica induzida por fenilbiguanida.....	35
4.7 – Efeitos do bloqueio vagal sobre a resposta hipotensora e bradicárdica produzida pela acetilcolina.....	37
4.8 – Valores basais de pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) em ratos anestesiados.....	39
4.9 – Reatividade simpática, bradicardia e resposta hipotensiva após a ativação do reflexo Bezold-Jarisch	41
5 – DISCUSSÃO.....	43
6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52
7 – APÊNDICE	62
8 – PRODUÇÃO CIENTÍFICA.....	73

Lista de Figuras

- Figura 1** – Cronograma da metodologia de desnutrição proteica. Após o nascimento os animais foram amamentados por um período de 28 dias. Em seguida, os animais foram divididos em dois grupos: controle (que recebiam dieta com 15% de proteína) e desnutrido (dieta com 6% de proteína) por um período de 35 dias. Após esse período os animais eram utilizados para experimentação. ... 13
- Figura 2** – Protocolo de ativação do barorreflexo e reflexo Bezold-Jarisch (RBJ). Após estabilização dos parâmetros cardiovasculares os primeiros 10-20 minutos foram tomados como valores basais. Foi realizada a infusão em rampa (i.v) de fenilefrina (0,25 mM) ou nitroprussiato de sódio (0,4 mM), para ativação do barorreflexo. E ativação do RBJ foi feita através de injeções em bolus (i.v) de fenilbiguanida nas doses de 1,25; 2,5 e 5,0 µg/kg. Salina a 9% foi administrada como veículo. As drogas foram administradas aleatoriamente, respeitando intervalo mínimo de 5 minutos entre uma dose e outra para que os níveis de PA e FC voltassem aos valores basais..... 19
- Figura 3** – Esquema do protocolo experimental para avaliação do reflexo Bezold-Jarisch após bloqueio vagal. Após estabilização dos parâmetros cardiovasculares os primeiros 10-20 minutos foram tomados como valores basais. Inicialmente foi realizada a administração de Ach (26,7nmol/kg), em seguida ativação do RBJ com PBG (5,0 µg/Kg). Após os parâmetros cardiovasculares terem retornado aos seus valores basais, foi realizada a injeção de metil-atropina (106,7 nmol/kg), em seguida Ach (26,7nmol/kg), 1 minuto depois PBG (5,0 µg/Kg). Repetimos as injeções de Ach e PBG 60 minutos pós-bloqueio com metil-atropina. Ach= acetilcolina, PBG= fenilbiguanida. 20
- Figura 4** – Peso corporal (g) dos ratos ao final da desnutrição hipoproteica. *** = Diferente do grupo controle $P < 0,0001$ (teste *t-Student*). g = gramas. 24
- Figura 5** – Níveis basais de PAM (A) e FC (B) em animais controle intacto, desnutrido intacto, controle DSA e desnutrido DSA. * = diferente significativamente dos grupos controle intacto, desnutrido intacto e desnutrido DSA, $P < 0,05$. # = diferente significativamente do grupo controle intacto, $P < 0,05$ (*One way ANOVA* seguida do pós-teste de *Tukey*). PAM= pressão arterial média, FC= frequência cardíaca e DSA= desnervação sino-aórtica. 26

Figura 6 – Estimativa do índice de sensibilidade barorreflexa em animais controles e desnutridos intactos (A) e animais controles e desnutridos desnervados (B). A infusão em rampa de fenilefrina (0,25 mM) ou nitroprussiato de sódio (0,4 mM) promoveu bradicardia e taquicardia reflexa, respectivamente nos grupos intactos, não havendo diferenças significativas entre esses grupos. Nenhuma resposta reflexa na FC foi observada nos animais desnervados. PAM= pressão arterial média, FC= frequência cardíaca e DSA= desnervação sino-aórtica. 28

Figura 7 – Registros de um animal representativo do grupo controle intacto (A) e de um animal representativo do grupo desnutrido intacto (B) mostrando os efeitos das injeções i.v. fenilbiguanida nas doses de 1,25; 2,5 e 5,0 µg/kg sobre a PAP, FC, PAM em função do tempo. PAP= pressão arterial pulsátil, FC= frequência cardíaca e PAM= pressão arterial média. 30

Figura 8 – Registros de um animal representativo do grupo controle DSA (A) e de um animal representativo do grupo desnutrido DSA (B) mostrando os efeitos das injeções i.v. fenilbiguanida nas doses de 1,25; 2,5 e 5,0 µg/kg sobre a PAP, FC, PAM em função do tempo. PAP= pressão arterial pulsátil, FC= frequência cardíaca, PAM= pressão arterial média e DSA= desnervação sino-aórtica. 31

Figura 9 – Respostas hipotensoras (A) e bradicárdicas (B) à administração sistêmica de fenilbiguanida em três diferentes doses: 1,25; 2,5 e 5,0 µg/kg. * = Diferente do grupo desnutrido DSA, P< 0,001. &= diferente do grupo controle DSA, P< 0,05. # = diferente do grupo controle intacto, P< 0,05 (*Two way ANOVA*, seguida pós teste de *Bonferroni*). PAM= pressão arterial média, FC= frequência cardíaca e DSA= desnervação sino-aórtica. 32

Figura 10 – Valores de $\Delta PAM / \Delta FC$. Respostas hipotensoras sobre as respostas bradicárdicas produzidas por PBG em três diferentes doses: 1,25; 2,5 e 5,0 µg/kg. * = Diferente dos grupos: controle intacto, controle DSA e desnutrido intacto, P< 0,05. (*Two way ANOVA*, seguida pós teste de *Bonferroni*). PBG= fenilbiguanida, PAM= pressão arterial média, FC= frequência cardíaca e DSA= desnervação sino-aórtica. 34

Figura 11 – Respostas hipotensoras (A) e bradicárdicas (B) à administração sistêmica de fenilbiguanida na dose de 5 µg/Kg. * = Diferente de PBG B, p< 0,05 (*Two way ANOVA*, seguida pós teste de *Bonferroni*). PAM= pressão arterial média, FC= frequência cardíaca, PBG=

fenilbiguanida, PBG B= fenilbiguanida pós bloqueio com atropina e PBG R= fenilbiguanida 60 minutos pós bloqueio com atropina. 36

Figura 12 – Respostas hipotensoras (A) e bradicárdicas (B) à administração endovenosa de acetilcolina na dose de 26,7 nmol/kg. * = Diferente de ACh B, $p < 0,05$ (*Two way ANOVA*, seguida pós teste de *Bonferroni*). 38

Figura 13 – Níveis basais de PAM (A) e FC (B). (***) = diferente significativamente do grupo controle, $p < 0,0001$ (teste *t-Student*). PAM= pressão arterial média, FC= frequência cardíaca..... 40

Figura 14 – Valores de Δ PAM (A), Δ FC (B) e Δ ASNR (C) em resposta a administração de fenilbiguanida em diferentes três diferentes doses: 1,25; 2,5 e 5,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$. *= diferente do controle intacto, $P < 0,05$ (*Two way ANOVA*, seguida pós teste de *Bonferroni*). PAM= pressão arterial média, FC= frequência cardíaca e ASNR= atividade simpática para o nervo renal. 42

Lista de Abreviaturas

OMS	Organização Mundial de Saúde
PAM	pressão arterial média
PAP	pressão arterial pulsátil
NTS	núcleo do trato solitário
FC	frequência cardíaca
DSA	desnervação sino-aórtica
RBJ	reflexo Bezold-Jarisch
PBG	fenilbiguanida
SNA	sistema nervoso autonômo
SNC	sistema nervoso central
mmHg	milímetros de mercúrio
bpm	batimentos por minuto
µg	micrograma
Kg	quilograma
Kcal	quilocalorias
Média± Er Pd	média mais ou menos erro padrão da média
ASNR	atividade simpática para o nervo renal

Resumo

A desnutrição proteica é caracterizada como um déficit do balanço proteico, podendo afetar o funcionamento dos processos fisiológicos do organismo. Dados anteriores do nosso laboratório sugerem um comprometimento dos reflexos cardiovasculares em ratos acordados submetidos à desnutrição hipoproteica. Diversos trabalhos demonstram uma interação entre o barorreflexo e o reflexo Bezold-Jarisch, e que após a desnervação sino-aórtica (DSA), a responsividade do reflexo cardiopulmonar estaria aumentada, sugerindo um papel funcional deste reflexo na regulação cardiovascular. É possível que a participação de um destes sistemas (barorreceptores ou receptores cardiopulmonares) seja suficiente para manter os níveis da PA próximos aos valores considerados normais. Diante disso nos propusemos a avaliar a responsividade do reflexo Bezold-Jarisch na regulação da PA em animais desnutridos submetidos à DSA. Foram utilizados ratos Fisher, divididos em 4 grupos: controle intacto (n=8), controle DSA (n=8), desnutrido intacto (n=8) e desnutrido DSA (n = 8). Os animais controle receberam uma dieta contendo 15% de proteína durante 35 dias e os animais desnutridos, 6% de proteína. Um dia antes dos experimentos foi feita a cirurgia de desnervação sino-aórtica (DSA) e em seguida foram inseridos cateteres na artéria e veia femoral para avaliação dos parâmetros cardiovasculares e administração de drogas, respectivamente. Ativação do reflexo cardiopulmonar foi realizada através de injeções intravenosas em bolus de fenilbiguanida (PBG), nas concentrações de 1,25; 2,5 e 5,0 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ e para ativação do barorreflexo realizamos infusão em rampa de fenilefrina (0,25 mM) ou nitroprussiato de sódio (0,4 mM). Em resposta a ativação e desativação barorreflexa os animais desnutridos não apresentaram alterações no ganho deste reflexo quando comparado com os animais controles (-1.41 ± 0.186 vs. -1.89 ± 0.154 bpm/mmHg, respectivamente). Com relação ao reflexo cardiopulmonar os animais desnutridos desnervados apresentaram respostas hipotensoras e bradicárdicas reduzidas quando comparados aos animais controles desnervados (-37 ± 7 mmHg e -124 ± 17 bpm vs. -80 ± 7 mmHg e -414 ± 20 bpm, respectivamente). Após bloqueio vagal com atropina (106,7 nmol/kg) seguido da administração de PBG (5 $\mu\text{g}/\text{Kg}$) em dois grupos intactos: controle e

desnutrido, observamos que assim como no grupo controle a queda da PA nos animais desnutridos é decorrente da queda da frequência cardíaca. Em um grupo de animais anestesiados avaliamos a queda da atividade simpática após administração de PBG, através da atividade simpática para o nervo renal (ASNR). Observamos que os animais desnutridos apresentaram uma menor reatividade simpática após injeção de PBG nas doses de 1,25, 2,5 e 5,0 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ quando comparado ao grupo controle; (-29,8 \pm 3; -37,3 \pm 10; -53,9 \pm 9 vs. -69,2 \pm 9; -78,0 \pm 9; -84,3 \pm 7, desnutrido e controle, respectivamente).

O conjunto dos resultados sugere que a menor responsividade do RBJ nos animais desnutridos DSA, possivelmente ocorra devido a uma diferente interação central entre os reflexos barorreceptores e cardiopulmonares em animais desnutridos DSA, uma vez que, nos animais desnutridos intactos o RBJ comporta-se de maneira semelhante ao controle. Os dados encontrados indicam que os animais submetidos à desnutrição apresentam um importante desbalanço autonômico.

Abstract

Malnourishment results in a lack of energy and protein balance, affecting the normal function of physiological processes in the body. Previous data from our laboratory suggest a significant impairment of cardiovascular reflexes in rats subjected to protein restriction. Other studies have demonstrated an interaction between baroreflex and Bezold-Jarisch reflex. After the sino-aortic denervation (SAD) the responsiveness of the cardiopulmonary reflex was increased, suggesting a functional role of this reflex in cardiovascular regulation. It is therefore possible that the integrity of one of these systems is sufficient to maintain the levels of the arterial pressure (AP) close to the values considered normal. Then, we propose to assess the participation of the Bezold-Jarisch reflex in the regulation of AP in malnourished animals submitted to the SAD. Male Fisher rats were divided into 4 groups: control intact (n= 8), SAD control (n = 8), intact malnourished (n = 8) and SAD malnourished (n = 8). Control groups received a diet containing 15% of protein for 35 days while low protein (LP) groups only 6% of protein. One day before the experiments were performed the sino-aortic denervation, and then catheters were inserted in the femoral artery and vein for assessment of cardiovascular parameters and administration of drugs, respectively. Activation of the cardiopulmonary reflex was performed by intravenous bolus injections of Phenylbiguanide (PBG), in concentrations of 1.25, 2.5 and 5.0 μ g/Kg. Baroreflex activation was done using a ramp infusion of phenylephrine (0, 25 mM) or sodium nitroprusside (0.4 mM). In response to baroreflex activation and deactivation malnourished animals showed no change in gain of reflex when compared with control animals (-1.41 \pm 0.186 vs. -1.89 \pm 0.154 bpm/mmHg, respectively). On the cardiopulmonary reflex denervation malnourished animals exhibit hypotensive and bradycardic responses reduced when compared to denervation control animals (-37 \pm 7 mmHg and -124 \pm 17 bpm vs. -80 \pm 7 mmHg and -414 \pm 20 bpm, respectively). After vagal blockade with atropine (106.7 nmol /kg) followed by administration of PBG (5 μ g/Kg) in two intact groups: control and malnourished, was observed as well as in the control group that the fall of the PA in

malnourished animals is due to decrease in heart rate. The evaluation of sympathetic activity in anesthetized animals by renal sympathetic nerve activity (RSNA) showed that, malnourished rats have a lower sympathetic reactivity after intravenous infusion of PBG: 1.25, 2.5 and 5.0 mg / kg when compared to the control group; (-29,8±3; -37,3±10; -53,9±9 vs. -69,2±9; -78,0±9; -84,3±7, malnourished and control respectively).

It seems that the lower responsiveness of Bezold-Jarisch reflex in SAD malnourished animals, probably occurs due to a different central interaction between cardiopulmonary and baroreceptor reflexes, once in the malnourished intact animals Bezold-Jarisch reflex behaves in a similar manner to control. These data indicate that those animals presented an impairment of the autonomic control.

1 – INTRODUÇÃO

1.1 – Desnutrição e seus efeitos sobre o sistema fisiológico

A Organização Mundial de Saúde define desnutrição proteico-calórica como uma gama de condições patológicas decorrentes da deficiência de aporte, transporte ou utilização de nutrientes (principalmente energia e proteínas) pelas células do organismo. Portanto, a desnutrição se instala quando as necessidades de energia, proteínas ou ambas não podem ser satisfeitas pela dieta (Sawaya et al., 2003).

Em março de 2006 as Organizações das Nações Unidas (ONU) estabeleceu uma nova definição para desnutrição, sendo então caracterizada como uma condição fisiológica anormal causada por deficiência, excessos ou desequilíbrios na ingestão de calorias, proteínas ou outros nutrientes (Organização das Nações Unidas, 2006), englobando um outro problema epidemiológico: a obesidade. Mesmo com aumento significativo nos últimos anos nas taxas de obesidade infantil, o número de crianças que são afetadas pela desnutrição é de grande relevância (Sawaya et al., 1995). Sendo a desnutrição considerada como uma das principais doenças responsáveis pela alta mortalidade de crianças abaixo de cinco anos. No Brasil a prevalência de desnutrição em crianças menores de cinco anos, aferida pela proporção de crianças com déficit de crescimento, foi de 7% em 2006 (Pesquisa Nacional de Demografia e Saúde, 2009).

Dados estimados pela FAO (2008) mostram que o aumento do número de pessoas desnutridas de 2003-5 para o ano de 2007 foi de 75 milhões, sendo que no ano de 2007 existiam no mundo aproximadamente 923 milhões de indivíduos afetados pela desnutrição. E que a cada 5 segundos morre uma criança no mundo devido a alguma carência nutricional (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2008). Mostrando que em pleno século 21 a insegurança alimentar, mesmo não sendo nova, aparece como problema que assombra várias nações.

A desnutrição energético-protéica é considerada como a forma mais letal de má nutrição e tem um papel importante em pelo menos metade das mortes anuais de crianças

no mundo em desenvolvimento. Dados da Organização Mundial de Saúde (2007) reportam que esta forma de desnutrição afeta uma em cada quatro crianças em todo o mundo: 150 milhões (26,7%) estão com baixo peso e 182 milhões (32,5%) têm o desenvolvimento retardado. Relata-se que 55% das mortes infantis em países em desenvolvimento estão associadas à desnutrição, sendo que das 12,2 milhões de mortes anuais entre crianças menores de cinco anos, 6,6 milhões são causadas pela desnutrição. Ainda de acordo com a OMS, a alimentação inapropriada de recém nascidos e crianças é responsável por um terço dos casos de desnutrição (World Health Organization, 2007).

A desnutrição causada por deficiência proteica é altamente prejudicial ao organismo, uma vez que as proteínas fornecem aminoácidos que regulam e cumprem funções fisiológicas e metabólicas do organismo (Lehninger.A., 2005). Dos vinte aminoácidos que constituem as proteínas, nove são considerados essenciais, ou seja, não são sintetizados pelo organismo e devem ser adquiridos através da alimentação, sendo então a composição de proteína da dieta um fator importante a se considerar. Dessa maneira, a restrição nutricional que resulte num deficiente aporte, transporte ou utilização de nutrientes (especialmente energia e proteínas) pelas células do organismo, pode levar a uma série de disfunções.

Sabendo-se que, em humanos, estudos de uma restrição proteica são muito mais observacionais do que averiguações experimentais, portanto, tornou-se importante a avaliação através de práticas experimentais em modelo animal. A utilização animal permite um controle do tempo e dos níveis desejados da carência nutricional que se pretende estudar (Giacomelli; Marçal-Natali, 1999). O rato é o modelo animal mais utilizado nestes estudos, devido às vantagens que ele apresenta, tais como fácil manejo e alta capacidade de adaptação aos diferentes protocolos de desnutrição empregados, além de possuir metabolismo acelerado, sendo este de alta relevância, uma vez que permite investigações experimentais rápidas, principalmente daqueles distúrbios promovidos pela desnutrição apenas tardiamente no ser humano. Várias são as metodologias utilizadas com intuito de induzir a desnutrição em ratos. Em alguns estudos isto é feito durante a gestação, reduzindo o conteúdo proteico das fêmeas grávidas (Tonkiss et al., 1998; Monteiro et al., 2001), ou

após o nascimento reduzindo o conteúdo de proteínas da dieta oferecida à fêmea que está amamentando (Pedrosa; Moraes-Santos, 1987), e ainda a desnutrição pode ser imposta aumentando o número de filhotes por ninhada durante a amamentação, o que leva à competição pelo leite materno e diminuição da disponibilidade de nutrientes para cada animal individualmente (Belmar et al., 1996). Outro método utilizado, refere-se à diminuição do conteúdo proteico da dieta logo após o desmame (Ferreira et al., 2003). Este último modelo é o que tem sido adotado pelo nosso laboratório e conseqüentemente no presente estudo.

Estudos experimentais têm mostrado que a desnutrição pré ou pós-natal pode levar a diversas alterações, tais como, crescimento deficiente, alterações metabólicas, modificação na composição das gorduras sanguíneas, surgimento de diabetes, obesidade, alterações dos níveis de pressão arterial, hipertrofia glomerular, aterosclerose, e ainda do ponto de vista funcional já foi observado modificações no comportamento e aprendizagem (Lucas et al., 1997; Lucas, 1998; Monteiro et al., 2001; Silva; Almeida, 2006). Fatores como severidade, período e fase da vida na qual o indivíduo foi submetido à desnutrição, influenciam diretamente nas conseqüências clínicas que ela poderia levar.

Diminuição do metabolismo basal, diminuição da oxidação de gordura e prejuízos na secreção de insulina, vêm sendo confirmadas em ratos jovens e indivíduos que apresentaram desnutrição na infância (Agote et al., 2001; Sawaya et al., 2003; Sawaya; Roberts, 2003). Diante destas evidências, o aumento do diabetes e da obesidade podem estar relacionadas à desnutrição, além do simples comprometimento do crescimento físico, que por sua vez, também constituem fatores de risco para ocorrência de hipertensão e doenças cardiovasculares na vida adulta e mesmo no período pré e pós-puberal (Sawaya et al., 2003). Essas doenças seriam conseqüências de um quadro de “programação”, onde um estímulo ou insulto em período crítico ou sensível no início da vida, resulta em alterações fisiológicas e metabólicas em longo prazo (Barker; Clark, 1997; Plagemann et al., 2000).

Importantes alterações promovidas pela desnutrição proteica no que se diz respeito à função renal foram confirmadas em alguns trabalhos. Benabe *et al.* (1993) observaram que a quantidade de receptores do tipo AT1 está aumentada tanto no córtex quanto na medula

renal de animais desnutridos (Benabe et al., 1993). Além disso, crianças e adultos desnutridos possuem taxa de filtração glomerular, fluxo renal e plasmático diminuídos, bem como, redução da capacidade de concentração da urina (Benabe; Martinez-Maldonado, 1998). Foi demonstrado também um aumento da expressão renal dos mRNAs codificadores da renina e enzima conversora de angiotensina (ECA) em animais submetidos à dieta hipoproteica, o que pode ser responsável pelas alterações na hemodinâmica renal desses animais (Martinez-Maldonado et al., 1993). Em outro trabalho foi observada uma redução no número total de néfrons provocando uma alteração na função renal (do Carmo Pinho et al., 2003). Lucas *et. al* (1997) viram em ratos desnutridos durante a gestação, uma significativa redução do peso renal, tanto absoluto quanto relativo e prejuízo na glomerulogênese, mesmo após o nascimento (Lucas et al., 1997).

O sistema nervoso central (SNC) também é afetado diante de uma ingestão proteico-calórica insuficiente. Trabalhos desenvolvidos por Morgane *et al.* (1993), relatam sobre as alterações estruturais promovidas por uma má nutrição, sendo que as principais, referem-se ao menor número e tamanho de células cerebrais, assim como alterações na ramificação dendrítica (Morgane et al., 1993). Pesquisadores ainda mostraram que várias regiões do cérebro como o cerebelo e o sistema hipocampal, também são bastante afetadas pela desnutrição precoce, como à redução do número de sinapses no hipocampo, prejudicando substancialmente comportamentos hipocampo-dependentes. E que a desnutrição constitui o principal fator não-genético que afeta o desenvolvimento do cérebro, podendo causar déficits permanentes na aprendizagem e no comportamento (Lukoyanov; Andrade, 2000; Morgane et al., 2002).

Além disso, a desnutrição proteica pode alterar o nível de neurotransmissores o número e a afinidade de alguns receptores de vários sistemas de neurotransmissão, como o serotoninérgico, o dopaminérgico, o gabaérgico e o colinérgico (Almeida et al., 1996). Em modelos de desnutrição pós-desmame foram visto prejuízos na atividade de diversas enzimas cerebrais relacionadas ao metabolismo do glutamato, além de redução nas concentrações de diversos aminoácidos como o ácido aspártico, glutâmico e alanina no cérebro de ratos (Agarwal et al., 1981). Algumas alterações neurofisiológicas produzidas

pela desnutrição se referem essencialmente a prejuízos na plasticidade sináptica, sendo que a transmissão glutamatérgica pode ter um papel relacionado com processos de plasticidade no cérebro (Ozawa et al., 1998). Parecendo evidente a ocorrência de vários distúrbios no SNC desencadeados pela desnutrição.

Sabendo-se que o hipotálamo é uma importante região do SNC que atua principalmente na homeostasia e estando seus efeitos envolvidos na regulação central da ingestão de alimentos, peso corporal, metabolismo e atividade autônoma cardiovascular não é surpreendente, imaginar ser esta área, uma importante região do SNC afetada pela desnutrição (Douglas.C.R., 2006). Uma vez que o hipotálamo exerce seus efeitos sobre o sistema nervoso autônomo (SNA), trabalhos sugerem que alterações hipotálamicas promovidas pela desnutrição podem contribuir para o desenvolvimento da hipertensão na vida adulta. Sendo que uma dieta hipoproteica durante a gestação e a lactação foi capaz de promover em filhotes desmamados (20 dias de vida), diminuição do peso corporal, hipoglicemia, hipoinsulinemia, aumento no volume e densidade dos neurônios da região hipotalâmica ventromedialateral. Observou-se também redução na densidade de neurônios imunoreativos para Galanina e Neuropeptídeo Y no núcleo arqueado, contribuindo com possíveis alterações cardiovasculares (Plagemann et al., 2000).

Trabalhos da literatura demonstram que a desnutrição é capaz de promover alterações no sistema nervoso neurovegetativo. Leo-quinto *et al.* (1998) mostraram que o sistema nervoso simpático e/ou parassimpático de ratos parece ser afetado pela desnutrição proteica pós-desmame. Após o período de amamentação os ratos apresentaram prejuízo do potencial secretório das células β pancreáticas reduzindo, portanto, a liberação de insulina (Leon-quinto et al., 1998; Ferreira et al., 2003). Foram vistos também alterações no mecanismo de regulação da liberação central de noradrenalina, resultando em aumento da concentração deste neurotransmissor no córtex cerebral desses animais (Benabe et al., 1993; Belmar et al., 1996).

Trabalhos realizados em nosso laboratório têm demonstrado alterações nos mecanismos de controle do sistema cardiovascular, promovidas pela desnutrição proteica pós-desmame. Tropa *et al.* (2001) observaram aumento do tônus simpático vasomotor em

animais submetidos a um modelo de desnutrição proteica pós-desmame (Tropia et al., 2001). Além disso, Oliveira *et al.* (2004) observaram alterações nos valores basais de frequência cardíaca (FC) e pressão arterial média (PAM), além do aumento da variabilidade desses parâmetros quando analisados, em intervalos de noventa minutos, no domínio do tempo (Oliveira et al., 2004). Em outro trabalho, foram demonstradas modificações no ganho do barorreflexo antes e após bloqueios autonômicos além de alteração no período de latência da resposta barorreflexa, sugerindo alterações autonômicas importantes (Loss et al., 2007). Os animais submetidos à desnutrição proteica também apresentaram alteração no quimiorreflexo (Penitente et al., 2007), sendo que foi observado um aumento da responsividade deste reflexo. Dados ainda não publicados, Martins (2007) demonstrou através da análise da variabilidade da FC no domínio da frequência um aumento da atividade eferente simpática e redução da atividade eferente parassimpática após bloqueio autonômico nos ratos submetidos à dieta hipoproteica, sugerindo uma disfunção autonômica cardíaca nesses animais (Martins, 2007). E ainda, Rodrigues (2008) demonstrou através da microinjeção de L-glutamato na região rostroventrolateral do bulbo (RVLM), que a desnutrição foi capaz de promover disfunções na neurotransmissão glutamatérgica do barorreflexo (Rodrigues, 2008).

1.2 – Mecanismos reflexos de controle da pressão arterial e frequência cardíaca

Os mecanismos de controle da pressão arterial (PA) que atuam a curto prazo, detectam e corrigem mudanças da PA e volume sanguíneo momento-a-momento. Mudanças na pressão arterial ativam receptores e geram um sinal que é conduzido pelas vias aferentes até o órgão processador, o sistema nervoso central (SNC). Este por sua vez, gera uma resposta conduzida pelas vias eferentes até o órgão efector. O núcleo do trato solitário (NTS) é a primeira estação sináptica das aferências cardiovasculares no sistema nervoso central e desempenha um importante papel na modulação da atividade autonômica eferente para o sistema cardiovascular. Entre as mais importantes aferências

cardiovasculares envolvidas na regulação autonômica da pressão arterial estão as aferências dos barorreceptores aórticos e carotídeos (barorreflexo), os quimiorreceptores carotídeos (quimiorreflexo) e as fibras cardiopulmonares (reflexo Bezold-Jarisch). As diferentes informações da periferia são processadas no SNC de forma a produzir a resposta autonômica apropriada, de acordo com os ajustes requeridos para normalizar a pressão arterial (Machado et al., 1997).

Os barorreceptores são receptores de estiramento, sensíveis à deformação mecânica da parede vascular e respondem às alterações na pressão arterial. Os receptores do barorreflexo estão localizados nas paredes do seio carotídeo e do arco aórtico, cuja informação é carregada, via ramos aferentes dos nervos vago e glossofaríngeo, mielínicos (condução rápida) para o sistema nervoso central, mais precisamente no núcleo do trato solitário (Krieger, 1964). O L-glutamato parece ser o principal neurotransmissor aminoácido excitatório liberado das aferências barorreceptoras no NTS (Talman et al., 1980). Na ausência das aferências barorreceptoras, trabalhos realizados em animais experimentais (Jacob et al., 1988; Krieger et al., 2006) ou até mesmo em humanos (Timmers et al., 2003), demonstram que os precisos ajustes da atividade autonômica deixam de existir e a PA passa a apresentar uma alta labilidade. Todavia, os níveis de pressão arterial média (PAM) após alguns dias da cirurgia de desnervação não são significativamente diferentes de animais com os barorreceptores intactos (Cowley et al., 1973).

Os quimiorreceptores periféricos localizam-se no corpo carotídeo e no arco aórtico. Ajustes ventilatórios em resposta à hipoxemia, hipercapnia e quedas do pH são mediados pela interação entre os quimiorreceptores periféricos e centrais. Os quimiorreceptores ao serem ativados promovem os ajustes respiratórios necessários a normalização da pO_2 , determinando alterações apropriadas da ventilação, bem como estimulam centros cardiovasculares que irão promover ajustes autonômicos, determinando alterações na pressão arterial (Berne, 2004).

Apesar de todos os mecanismos que atuam controlando a PA no intuito de mantê-la dentro da faixa de normalidade, a elevação dos níveis de pressão arterial vêm se tornando um problema cada vez mais frequente. É possível que a desnutrição, além de comprometer

o funcionamento dos mecanismos reflexos (Tropia et al., 2001; Loss et al., 2007) e humorais (Benabe et al., 1993) de controle da PA, favoreça o aparecimento de doenças crônico-degenerativas (Barker et al., 1990; Barker; Clark, 1997; Sawaya et al., 2003; Cheema et al., 2005).

1.2.1 – Reflexo Bezold-Jarisch

Estudos realizados nas quatro últimas décadas têm mostrado que não só o barorreflexo, mas que também o reflexo cardiopulmonar exerce um papel importante no controle neural da circulação. O reflexo cardiopulmonar Bezold-Jarisch (RBJ), foi descoberto há mais de um século por Von Bezold e Hirt. A ativação de fibras C cardiopulmonares, cujas terminações receptoras estão localizadas nos grandes vasos pulmonares e nas câmaras cardíacas são estimulados por substâncias químicas como alcalóides da veratridina, capsaicina, serotonina ou fenilbiguanida e por alterações de volume (Evans et al., 1991; Verbene; Guyenet, 1992; Mark; Dunlap, 2008). A ativação destes receptores produz a tríade hipotensão, bradicardia e apneia que caracteriza o reflexo Bezold-Jarisch (Thoren, 1979). A região cardiopulmonar contém numerosos mecanorreceptores e receptores quimiossensitivos localizados nas câmaras cardíacas e pulmão, cujas fibras são em sua maioria amielinizadas (fibras C) que trafegam via nervo vago até o núcleo do trato solitário (NTS) onde fazem sua primeira sinapse (Persson et al., 1989). A ativação desses receptores exerce um controle tônico da função cardíaca e contribui para manutenção do volume fisiológico, principalmente via atividade simpática para o nervo renal (ASNR) (Veelken et al., 1993; Vasquez, 1994; Ditting et al., 2006). Quando ativado os receptores cardiopulmonares promovem um aumento da atividade parassimpática e causa uma simpato-inibição no coração e nos vasos que leva a uma redução de débito cardíaco de forma a reduzir os valores de pressão. Nos rins ao diminuir a ASNR promove aumento do débito urinário principalmente pela diminuição da resistência vascular renal (Berne, 2004).

Dados da literatura sugerem que em ratos, a queda de pressão verificada após ativação do RBJ é decorrente da bradicardia evocada pelo reflexo e indicam que o componente parassimpático é mediado por receptores NMDA no NTS (Chianca Junior et al., 1996).

É bem descrito em diferentes modelos animais experimentais uma interação entre barorreflexo arterial e cardiopulmonar (Mancia et al., 1973; Thoren, 1979; Chen, 1979; Chianca Junior; Machado, 1994; Meyrelles et al., 1997; Kashihara et al., 2003). Indicando que o reflexo cardiopulmonar produz uma influência inibitória tônica tanto no quimiorreflexo quanto no barorreflexo arterial (Koike et al., 1975; Kashihara et al., 2003). Resecção das aferências vagais cardiopulmonar modula o controle barorreflexo carotídeo da resistência vascular em cães, aumentando a resposta vasoconstritora a hipotensão carotídea (Koike et al., 1975). Bishop e Hasser (1985), em uma revisão sobre a interação entre os reflexos arteriais e cardiopulmonares sugeriram que a remoção de um dos sistemas reflexos, a contribuição do outro sistema estaria aumentada, parecendo que um reflexo compensa a ausência de outro (Bishop; Hasser, 1985). Além disso, estudos realizados em humanos e animais demonstraram que o controle da circulação não depende somente dos barorreceptores, mas também, e com grande importância, dos receptores localizados na região cardiopulmonar (Zanchetti; Mancia, 1991).

Estudos realizados por Krieger (1964) mostraram que a secção das aferências dos barorreceptores arteriais (DSA) em ratos promove uma elevação aguda da PA, a qual passou a ser conhecida como hipertensão neurogênica (Krieger, 1964). Por outro lado, outros pesquisadores demonstraram que através de análise computacional de registro da pressão arterial, que a PA dos animais submetidos à desnervação sino-aórtica, retornava a seus níveis basais dois dias após a cirurgia (Cowley et al., 1973), sugerindo que apesar da desnervação dos barorreceptores arteriais, os animais não apresentavam níveis cronicamente elevados de pressão arterial média que pudessem caracterizá-los como hipertensos. Entretanto, apesar de não serem hipertensos, esses animais apresentam uma maior labilidade da pressão arterial devido, provavelmente, à atuação fisiológica deste reflexo (Jacob et al., 1988). E ainda, Persson *et. al* (1989) demonstraram que, isoladamente,

a DSA ou a desnervação cardiopulmonar em cães não induz aumento crônico da PA, indicando uma participação importante dos dois sistemas de controle da PA (Persson et al., 1989).

Em relação à responsividade dos receptores cardiopulmonares, trabalho de Chianca *et. al* (1994) demonstraram que ratos submetidos à desnervação sino-aórtica (DSA) apresentaram tanto no 1º quanto 15º dia após cirurgia um aumento significativo na sensibilidade do RBJ, além disso, os mesmos autores explicaram que a não ocorrência da hipertensão arterial foi devido provavelmente à maior participação dos receptores cardiopulmonares quando da retirada dos barorreceptores arteriais (Chianca Junior; Machado, 1994). Em 1997 Chianca *et. al* mostraram, de maneira simples e inequívoca, que, em ratos, os receptores cardiopulmonares desempenham um importante papel na regulação da pressão arterial após a remoção dos barorreceptores arteriais (Chianca Junior et al., 1997). Parece evidente, a importância da participação dos receptores cardiopulmonares na regulação da pressão arterial.

Trabalhos anteriores e em andamento do nosso laboratório vêm demonstrando que a desnutrição proteica em ratos é capaz de promover diversas alterações no que se diz respeito principalmente ao sistema cardiovascular. E que os sistemas de controle a curto prazo da PA, o barorreflexo, parecem estar alterados neste modelo de desnutrição. Diante de tais evidências e sabendo da interação existente entre barorreflexo e reflexo cardiopulmonar, decidimos avaliar a participação do reflexo Bezold-Jarisch no controle da PA em ratos desnutridos na ausência dos barorreceptores.

2 – OBJETIVOS

2.1 – Objetivo Geral

Avaliar a participação do reflexo Bezold-Jarisch na regulação da pressão arterial em ratos submetidos a desnutrição hipoproteica.

2.2 – Objetivos Específicos

- Avaliar os níveis basais de pressão arterial média e frequência cardíaca em ratos desnutridos submetidos à desnervação sino-aórtica;
- Avaliar as alterações produzidas pela fenilbiguanida sobre a pressão arterial e frequência cardíaca em ratos desnutridos desnervados;
- Avaliar a reatividade simpática promovida pela fenilbiguanida em ratos desnutridos.

3 – MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 – Modelo animal – desnutrição proteica

Neste trabalho foram utilizados ratos Fischer, fornecidos pelo Laboratório de Nutrição Experimental, escola de nutrição, UFOP-MG. Todos os procedimentos foram cuidadosamente realizados seguindo as normas recomendadas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Foram colocadas duas fêmeas e um macho em gaiolas plásticas de 47 x 33 x 15 cm, para o acasalamento. Após dez dias, os machos foram retirados, as fêmeas colocadas em gaiolas individuais e durante o período de gestação os animais receberam ração comercial Socil[®] e água filtrada *ad libitum* à vontade. Os animais foram mantidos durante todo o experimento em um biotério com regime de temperatura controlada ($23 \pm 1^{\circ}\text{C}$) e ciclo de 12 horas de luz e 12 horas de escuro, com luz acesa a partir das 7 horas da manhã. No nascimento, as ninhadas foram manipuladas aleatoriamente de maneira tal que foram mantidos aproximadamente oito animais por mãe. As mães continuaram recebendo ração comercial e água à vontade e os ratos foram amamentados durante 28 dias.

Após o desmame os machos das ninhadas foram divididos em dois grupos: controle, que passou a receber dieta contendo 15% de proteína (dieta padrão) e desnutrido, que passou a receber dieta com 6% de proteína (dieta de desnutrição) durante 35 dias. Após 35 dias e durante os próximos sete dias, os animais foram utilizados no experimento e continuaram a receber ração experimental. Os animais foram pesados antes do início do experimento. Controle pesando aproximadamente (200g) e desnutridos (70g). O cronograma da metodologia de desnutrição proteica é apresentado na figura 1.

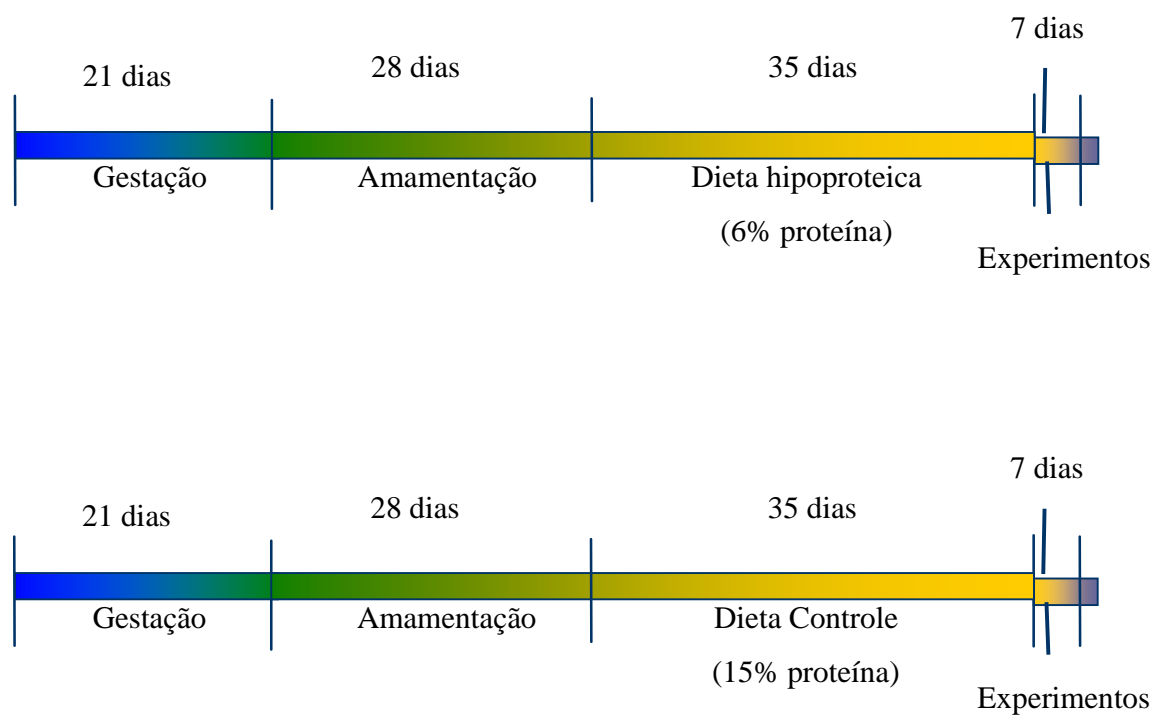


Figura 1 – Cronograma da metodologia de desnutrição proteica. Após o nascimento os animais foram amamentados por um período de 28 dias. Em seguida, os animais foram divididos em dois grupos: controle (que recebiam dieta com 15% de proteína) e desnutrido (dieta com 6% de proteína) por um período de 35 dias. Após esse período os animais eram utilizados para experimentação.

3.2 – Composição química das dietas

As dietas utilizadas nos modelos experimentais diferiram apenas quanto ao teor proteico. A dieta do grupo controle foi ração comercial Socil® que apresentava 15% de proteína. A dieta para induzir a desnutrição apresentava 6% de proteína e foi preparada com elementos semi-purificados. A composição química das dietas está representada na tabela 1.

Tabela 1 - Composição química das dietas (g/100g de ração).

	Controle	Desnutrido
Proteína (caseína)	15	6
Amido de Milho	70	79
Óleo de Soja	8	8
Mistura de Sais¹	5	5
Mistura de Vitaminas²	1	1
Fibra (Celulose)	1	1
Teor Calórico	422 Kcal	422 Kcal

¹Mistura de minerais (g/Kg de mistura): NaCl – 139,3 / KI – 0,79 / MgSO₄.7H₂O – 57,3 / CaCO₃ – 381,4 / MnSO₄.H₂O – 4,01 / FeSO₄.7H₂O – 27,0 / ZnSO₄.7H₂O – 0,548 / CuSO₄.5H₂O – 0,477 / CoCl₂.6H₂O – 0,023 / KH₂PO₄ – 389,0.

²Mistura de vitaminas (g/Kg de mistura): Acetato de retinol – 2.000.000IU / Colecalciferol – 200.000IU / Ácido p-aminobenzóico – 10,00 / I-Inositol – 10,00 / Niacina – 4,00 / Pantotenato de cálcio – 4,00 / Riboflavina – 0,80 / Tiamina HCl – 0,50 / Piridoxina HCl – 0,50 / Ácido fólico – 0,20 / Biotina – 0,04 / Vitamina B12 – 0,003 / Sacarose – q.s.p. 1000. / Colina – 200,0 / α -Tocoferol – 10.000IU.

3.3 – Drogas utilizadas

Solução Salina 0,9%: A solução veículo foi preparada dissolvendo-se 9,0 g de NaCl em q.s.p. 1000,0 mL de água destilada.

Anestésicos:

- ✓ **Ketamina+ Xilasina:** Foi realizada uma mistura de ketamina 10% (0,1 mL/100g) e xilazina 2% (0,02 mL /100 g). Essa concentração foi acondicionada em um frasco âmbar. Anestésico utilizado para experimentação em animais acordados.

- ✓ **Uretana:** foi utilizada uretana (SIGMA) na dose de 1,2 a 1,4g/kg de peso, para realização do procedimento cirúrgico e experimentação em animais anestesiados.

Agonista 5-HT3: fenilbiguanida: a solução inicial foi preparada utilizando-se 0,1531g de fenilbiguanida 98% (Aldrich Chemical Co. Milwaukee, WI, USA) diluída em 100,0 mL de salina. A fim de um melhor ajuste do volume de droga a ser injetado, foram preparadas soluções de fenilbiguanida em duas concentrações: 0,015 g/L e 0,0075 g/L. Uma vez aferidos os volumes finais, estas soluções foram alíquotadas em frações de 1,5 mL em tubos de polietileno Eppendorf e estocadas a -20°C até o momento do uso por período não maior que 45 dias.

L-fenilefrina: como agente vasopressor foi utilizado um agonista α_1 adrenérgico, a L-fenilefrina. A solução estoque foi preparada utilizando-se 0,05g cloridrato de L-fenilefrina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) diluída em 1,0 mL salina. Esta solução foi alíquotada em frações de 1,5 tubos de polietileno Eppendorf e armazenadas a -20°C até o momento do uso por período não maior que 45 dias. A solução de uso era preparada minutos antes de iniciar os experimentos, 2,0 μ L da solução estoque eram dissolvidos em 2,0 mL de salina, de modo que a concentração final foi de 0,25 mM.

Nitroprussiato de sódio: como agente hipotensor foi utilizado o doador de óxido nítrico, o nitroprussiato de sódio. A solução estoque foi preparada utilizando-se 0,001g de nitroprussiato de sódio dihidratado (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) diluída em 1,0 mL de salina. Esta solução foi protegida da luz para evitar degradação, alíquotada em frações de 1,5 tubos de polietileno Eppendorf e armazenadas a -20°C até o momento do uso por período não maior que 45 dias. Para obter a concentração final de 0,4 mM, 200,0 μ L da solução estoque eram dissolvidos em 1,8 mL de salina. Esta solução de uso era preparada minutos antes de iniciar os experimentos.

Acetilcolina: como agonista muscarínico foi utilizado a acetilcolina. Para preparação da solução estoque, utilizou-se 0,0145g de acetilcolina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) dissolvida em 1,0mL de salina. A solução foi protegida da luz para evitar degradação, acondicionada em tubos de polietileno Eppendorf e armazenadas a -20°C

até o momento do uso. A solução de uso era preparada minutos antes de iniciar os experimentos, 10,0 µL da solução estoque foram dissolvidos em 10 mL de salina, de modo que a concentração final foi de 26,7nmol/kg.

Metil-atropina: como antagonista muscarínico competitivo foi utilizado metil-atropina. A solução de estoque foi preparada dissolvendo-se 0,0614g de Brometo de metil-atropina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) em 1,0 mL de salina. A solução foi protegida da luz para evitar degradação, acondicionada em tubos de polietileno Eppendorf e armazenadas a -20°C até o momento do uso. Para obter a concentração final 106,7 nmol/kg, 20,0 µL da solução de estoque foram dissolvidos em 10,0mL de salina.

Antibiótico: Como medida profilática, era administrado após a cirurgia, 0,2 mL de pentabiótico veterinário [160.000 U.I. /rato, via i.m., (Fort-Dodge, Campinas, SP, Brasil)].

3.4 – Confeção e implantação de cânulas arteriais e femorais

Para a confecção da cânula foi utilizado tubo de polietileno PE-50 (Clay Adams, Parsipanny, NJ, EUA) previamente soldados a tubos de polietileno PE-10 (Clay Adams, Parsipanny, NJ, EUA), de dimensões ajustadas de acordo com o peso do animal. Para o devido registro da PA, as cânulas foram inseridas na artéria aorta abdominal, através da artéria femoral. Todos os animais também tiveram a veia femoral canuladas, para administração das drogas de acordo com cada protocolo experimental. Antes das implantações, a cânula foi lavada preenchida com solução fisiológica e obstruída a extremidade livre do PE-50 com pino de metal. Após implantação, essas extremidades foram dirigidas por meio de um trocater ao dorso do animal e em seguida exteriorizadas para permitir o registro da PA com livre movimento. Para os procedimentos cirúrgicos de canulação da artéria e veia femorais, os animais foram anestesiados com uma mistura de ketamina 10% (0,1 mL/ 100g) e xilazina 2% (0,02 mL /100 g).

Finalizado os procedimentos cirúrgicos os animais foram acondicionados em gaiolas individuais mantidas na sala de experimentos sob condições de temperatura, luminosidade e níveis de ruído controlados durante 24 horas para recuperação.

3.5 – Desnervação sino-aórtica (DSA)

Um dia antes dos experimentos foi realizada a desnervação dos barorreceptores aórticos e carotídeos (DSA) de acordo com a técnica descrita por Krieger (1964). Os ratos foram anestesiados com ketamina [0,1 mL/100 gramas de peso, via intra-muscular (i.m.), (Vetbrands, São Paulo, Brasil)] e xilazina [0,02 mL/100 gramas de peso, via i.m., (Agener União, São Paulo, Brasil)], e fixados na posição supina em uma mesa cirúrgica. Inicialmente foi feita uma incisão de 3,0 cm na linha mediana do pescoço, expondo-se os músculos que cobrem a traqueia e a região da bifurcação carotídea. Após dissecação e afastamento do músculo esternóideo, juntamente com o músculo esternocleidóideo, observam-se os nervos vago e laríngeo superior bem como o tronco simpático cervical, os quais foram isolados e cuidadosamente separados da artéria carótida comum. A desnervação dos barorreceptores aórticos foi realizada pela secção do nervo laríngeo superior e secção do tronco simpático caudal ao gânglio cervical superior, acompanhado da remoção deste último. Após este procedimento, os seios carotídeos foram desnervados pela remoção de todos os nervos da bifurcação das carótidas comuns. A eficácia da desnervação foi avaliada previamente aos experimentos pela ausência de alterações reflexas da FC, em resposta a variações pressoras promovidas pela injeção (i.v) de fenilefrina (0,25 mM) e nitroprussiato de sódio (0,4 mM).

3.6 – Registro da pressão arterial e da frequência cardíaca

Antes do início do registro, injetamos salina heparinizada (1:40), para evitar a formação de coágulos na extremidade das respectivas cânulas. A cânula arterial foi conectada a um transdutor de pressão MLT0699 (ADInstruments, Austrália) ligado a um amplificador de sinais ETH-400 (CB Sciences, Inc.). Esse amplificador foi conectado a um conversor analógico digital PowerLab/400 (ADInstruments, Austrália). A transferência de dados entre o conversor e o computador foi feita por intermédio de uma placa SCISI onde o

software *Chart for Windows*[®] gerava os registros de pressão arterial pulsátil (PAP) a partir dos dados enviados pelo conversor analógico digital numa frequência de amostragem de 200 Hz. Realizou-se a aquisição dos dados referentes à PAP a partir da qual foram calculadas, “*on line*” e “*off line*” a frequência cardíaca (FC) e a pressão arterial média (PAM). Após essa conexão, o animal passou um período de adaptação de 30 a 40 minutos, sendo em seguida iniciado os experimentos.

3.7 – Protocolo experimental para avaliação do reflexo barorreceptor e reflexo Bezold-Jarisch

Após serem instrumentados, os animais passaram por um período de estabilização de 30 a 45 minutos. Com os parâmetros cardiovasculares estáveis, iniciou-se o registro definitivo sendo que os primeiros 10 a 20 minutos foram tomados como parâmetros basais de PA e FC. A ativação do reflexo barorreceptor foi realizada com infusão, de fenilefrina (0,25 mM) ou nitroprussiato de sódio (0,4 mM), utilizando uma bomba de infusão (Bi 2000, Insight) na velocidade de 12 mL/h. Como veículo foi infundido salina a 9%. Os ensaios foram iniciados alternadamente com uma droga a fim de se evitar um *vieço* nos resultados.

Para estimulação do reflexo Bezold-Jarisch foram utilizadas injeções em *bolus* de fenilbiguanida nas doses de 1,25; 2,5; 5,0 µg/Kg. Estas doses foram administradas aleatoriamente, associadas a um *flush* de 0,1mL de salina, e, respeitando intervalo mínimo de 5 minutos entre uma dose e outra para que os níveis de PA e FC voltassem aos valores basais. A figura 2 representa o esquema do protocolo experimental.

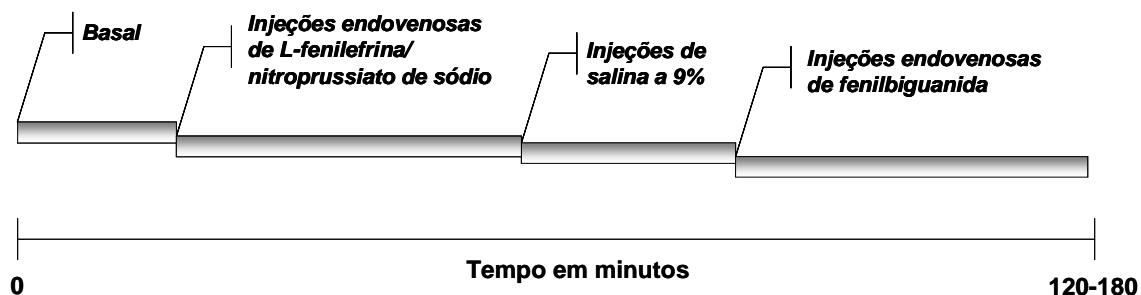


Figura 2 – Protocolo de ativação do barorreflexo e reflexo Bezold-Jarisch (RBJ). Após estabilização dos parâmetros cardiovasculares os primeiros 10-20 minutos foram tomados como valores basais. Foi realizada a infusão em rampa (i.v) de fenilefrina (0,25 mM) ou nitroprussiato de sódio (0,4 mM), para ativação do barorreflexo. E ativação do RBJ foi feita através de injeções em bolus (i.v) de fenilbiguanida nas doses de 1,25; 2,5 e 5,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Salina a 9% foi administrada como veículo. As drogas foram administradas aleatoriamente, respeitando intervalo mínimo de 5 minutos entre uma dose e outra para que os níveis de PA e FC voltassem aos valores basais.

3.8 – Protocolo experimental para avaliação do reflexo Bezold-Jarisch após bloqueio vagal

Em dois grupos de animais intactos (controle e desnutrido) foi realizado o bloqueio farmacológico de um dos componentes cardíaco, o parassimpático, com intuito de avaliar as alterações na PA e FC promovidas pela fenilbiguanida após bloqueio do componente vagal para o coração. Para efetuar o bloqueio do efeito vagal sobre coração foi utilizada metil-atropina (antagonista colinérgico, bloqueador da atividade parassimpática). Primeiramente sensibilizamos os receptores muscarínicos com administração de acetilcolina na dose de 26,7nmol/kg, em seguida ativamos o reflexo Bezold-Jarisch com a dose de 5,0 $\mu\text{g}/\text{Kg}$. Após os parâmetros cardiovasculares terem retornado aos seus valores basais, realizamos o bloqueio do braço parassimpático com metil-atropina na dose de 106,7 nmol/kg, em seguida injetamos a acetilcolina na mesma dose e 1 minuto depois administramos a fenilbiguanida (5,0 $\mu\text{g}/\text{Kg}$). Repetimos as injeções de acetilcolina e

fenilbiguanida 60 minutos pós-bloqueio com metil-atropina. Este protocolo experimental está representado na figura 3.



Figura 3 – Esquema do protocolo experimental para avaliação do reflexo Bezold-Jarisch após bloqueio vagal. Após estabilização dos parâmetros cardiovasculares os primeiros 10-20 minutos foram tomados como valores basais. Inicialmente foi realizada a administração de Ach (26,7nmol/kg), em seguida ativação do RBJ com PBG (5,0 µg/Kg). Após os parâmetros cardiovasculares terem retornado aos seus valores basais, foi realizada a injeção de metil-atropina (106,7 nmol/kg), em seguida Ach (26,7nmol/kg), 1 minuto depois PBG (5,0 µg/Kg). Repetimos as injeções de Ach e PBG 60 minutos pós-bloqueio com metil-atropina. Ach= acetilcolina, PBG= fenilbiguanida.

3.9 – Localização e isolamento do nervo renal

Animais controles e desnutridos foram anestesiados com uretana (SIGMA) na dose de 1,2 a 1,4g/kg de peso, para realização do procedimento cirúrgico e experimentação. Os animais tiveram o flanco lateral tricotomizado. Uma área delimitada entre a última costela e a pata traseira foi demarcada com caneta dermatográfica e exposta pela retirada da pele. Em seguida, foi divulsionada a musculatura paravertebral da região retroperitoneal até a localização do rim. Foram fixadas a um campo operatório as extremidades da abertura cirúrgica para visualização e acesso ao nervo renal. Com auxílio de uma lupa (Opto sm, 2002), o nervo renal foi cuidadosamente localizado e dissecado. O nervo renal foi posicionado sobre um par de eletrodos de prata aclopado a um micromanipulador, e

conectado ao sistema de aquisição e registro da atividade do nervo simpático renal (ASNR).

Dentro do campo cirúrgico foi adicionado, durante todo experimento, óleo mineral (Nujol – Schering-Plough) a 37,5° C, para evitar ressecamento, isolar a captação de sinal do nervo renal de ruídos externos e para condução da onda ultra-sônica. Toda essa preparação permaneceu em observação por cerca de 30 minutos ou até a estabilização dessas medidas para que se iniciassem os procedimentos experimentais.

3.10 – Registro da atividade simpática para o nervo renal

Os *bursts* de atividade simpática do nervo renal captados pelo eletrodo foram filtrados (100 a 1000Hz), amplificados e enviados simultaneamente a um amplificador de som e a um osciloscópio (Tektronix 546B) para visualização e identificação da frequência de descarga que caracterizam a atividade simpática. Além disso, a atividade simpática captada foi conduzida a uma placa analógica-digital e a um sistema de aquisição de dados (Power Lab 4/20 – ADInstruments). Através de um software (Chart 5.5.4 for Windows), o sinal captado foi registrado como sinal bruto, medido por unidades arbitrárias e simultaneamente convertido em sinal integrado para serem avaliados da ASNR (%) e o número de *bursts* captados por segundo (spikes/segundo).

3.11 – Análise dos dados e estatística

A análise dos dados foi realizada no software *Chart for Windows*[®] e a análise estatística no software *GraphPad Prism5.00* (Graphpad Inc.). A PAM e FC foram recalculadas “*off line*” pico-a-pico sistólico sob *smoothing* com janela de 201 pontos, para uma filtragem dos dados.

Os níveis basais de PAM e FC foram obtidos a parti dos registros de cada animal, através da média dos 10 minutos anteriores a quaisquer injeções endovenosas. Para comparação entre médias dos quatro grupos estudados controle intacto, desnutrido intacto,

controle desnervado e desnutrido desnervado utilizou-se os teste de análise de variância (ANOVA) “one way” seguida do pós-teste de *Tukey* considerando-se como diferentes significativamente apenas aqueles pares de médias cujo valor de P fosse inferior a 0,05.

Para análise do barorreflexo, valores de FC foram plotados em função de valores correspondentes de PAM a intervalos de 5 mmHg durante a infusão de fenilefrina ou nitroprussiato. Com base nestes dados, uma reta de regressão linear foi determinada com base na equação abaixo:

$$FC = FC_i - G \times PAM$$

onde,

FC = frequência cardíaca;

FC_i = valor de FC quando PAM = 0 (intercepto da reta de regressão com a ordenada);

G = ganho ou sensibilidade;

PAM = pressão arterial média.

Uma vez determinados os parâmetros da equação, o valor de G foi tomado como uma estimativa da sensibilidade do barorreflexo.

A análise do reflexo Bezold-Jarisch consistiu em medir-se a variação de PAM e FC decorrentes da administração de fenilbiguanida tomando-se a diferença entre o maior ponto imediatamente posterior à injeção da droga e o menor ponto referente ao efeito máximo da droga desconsiderando-se efeitos posteriores. A comparação entre os grupos foi feita dose a dose avaliando-se as respostas médias referentes a cada grupo utilizando-se o teste variância (ANOVA) “two way” seguida do pós-teste de *Bonferroni*, sendo considerado como diferença significativa apenas aqueles pares de médias em que o valores de P foi menor que 0,05. Foram analisadas também as alterações na PAM e FC produzidas pela fenilbiguanida e acetilcolina antes e após bloqueio vagal com atropina, utilizando o mesmo método citado anteriormente.

Para atividade simpática para o nervo renal o resgistro analisado foi a ASNR integral. O ruído residual de sistema de resgistro de ASNR obtido após o procedimento de eutanásia, foi subtraído de todos os valores de atividade simpática obtidos durante os experimentos. O resultado foi considerado o valor absoluto. A média obtida dos valores

inteiros 5 minutos antes primeira injeção de fenilbiguanida foi considerado 100%. As variações vistas após os procedimentos experimentais foram consideradas como a variação da porcentagem anteriormente citada. Assim, foi possível quantificar a amplitude das respostas provocadas pela ativação do reflexo Bezold-Jarisch. Para análise estatística desses dados foi utilizado o teste variância (ANOVA) “*two way*” seguida do pós-teste de *Bonferroni*, o nível de significância considerado foi $p < 0,05$. Todos os resultados estão apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM).

4 – RESULTADOS

4.1 – Efeito da desnutrição sobre o peso corporal dos ratos

Ao final do período de 35 dias de restrição proteica, os animais desnutridos (n=22) que receberam dieta isocalórica com 60% de redução proteica apresentaram peso significativamente menor quando comparado ao grupo (n=22) da mesma ninhada que recebeu a dieta controle (79,7±1,8g vs. 206,5±3,4g). Estes resultados são mostrados na figura 4 e tabela 2.



Figura 4 – Peso corporal (g) dos ratos ao final da desnutrição hipoproteica. *** = Diferente do grupo controle $P < 0,0001$ (teste *t-Student*). g = gramas.

4.2 – Valores basais de pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC)

Os níveis basais de PAM e FC foram avaliados por um período de 10 minutos, antes do início do experimento, em animais do grupo controle intacto, controle DSA, desnutrido intacto e desnutrido DSA. Observamos que a PAM do controle DSA foi significativamente maior quando comparada com os grupos controle intacto, desnutrido intacto e desnutrido DSA ($131,3 \pm 6$ mmHg vs. $108,2 \pm 2$; $105,9 \pm 2$; $106,1 \pm 2$ mmHg, respectivamente) figura 5A e tabela 3. Em relação aos valores basais FC observamos diferenças significativas entre o grupos intactos, onde os animais desnutridos intactos ($444,7 \pm 17$ bpm) apresentaram a FC basal significativamente maior a dos animais intactos do grupo controle ($376,4 \pm 7$ bpm). A FC basal dos animais do grupo controle submetidos à desnervação sino-aórtica (DSA) foi significativamente diferente quando comparada a FC basal dos grupos controle intacto e desnutrido DSA ($465,8 \pm 15$ bpm vs. $376,4 \pm 7$; $388,2 \pm 17$ bpm, respectivamente). Dados apresentados na Figura 5 B e tabela 4.

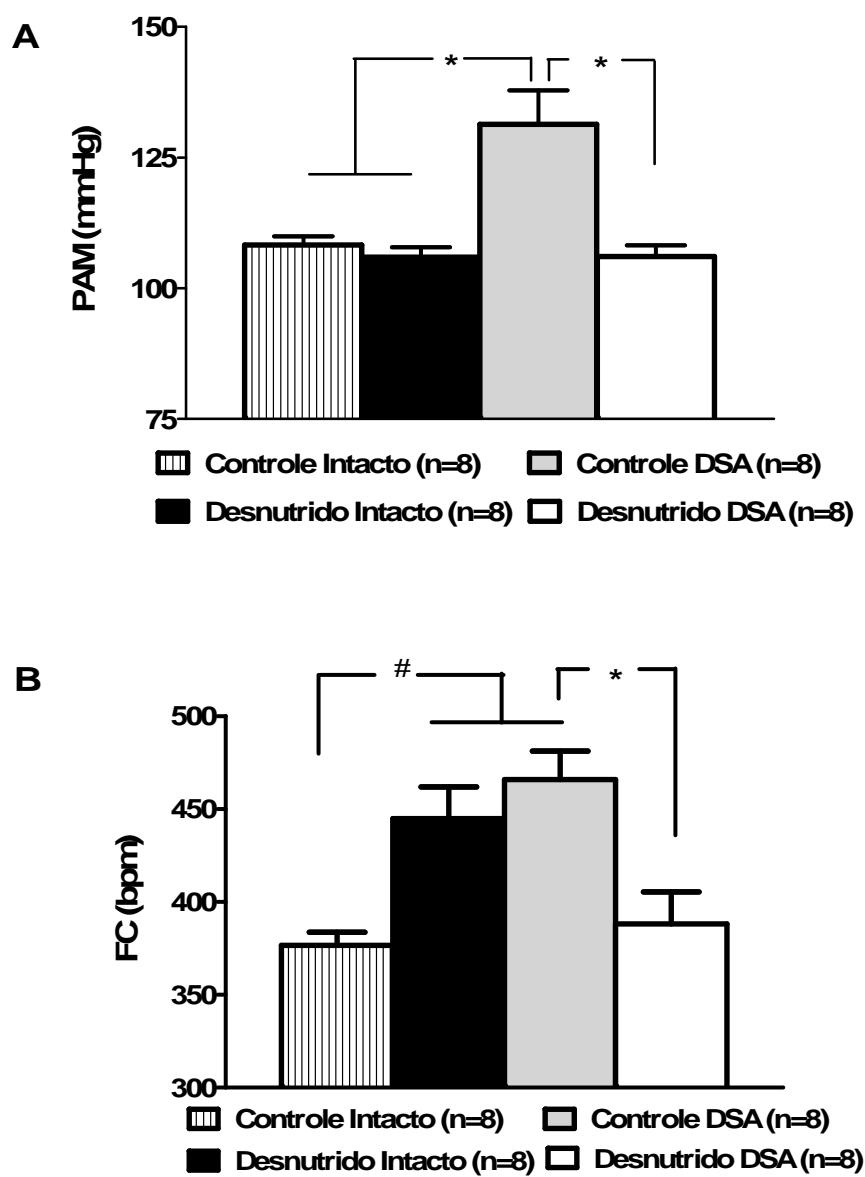


Figura 5 – Níveis basais de PAM (A) e FC (B) em animais controle intacto, desnutrido intacto, controle DSA e desnutrido DSA. * = diferente significativamente dos grupos controle intacto, desnutrido intacto e desnutrido DSA, $P < 0,05$. # = diferente significativamente do grupo controle intacto, $P < 0,05$ (*One way* ANOVA seguida do pós-teste de *Tukey*). PAM= pressão arterial média, FC= frequência cardíaca e DSA= desnervação sino-aórtica.

4.3 – Ativação e desativação barorreflexa

A figura 6 representa alterações na pressão arterial e na frequência cardíaca em resposta à infusão de fenilefrina (0,25 mM) ou nitroprussiato de sódio (0,4 mM). Tanto para ativação do barorreflexo através da infusão de fenilefrina quanto para desativação com uso de nitroprussiato de sódio não observamos diferenças significativas no ganho barorreflexo de animais desnutridos intactos quando comparados aos animais do grupo controle intacto (-1.41 ± 0.186 vs. -1.89 ± 0.154 bpm/mmHg, respectivamente), Figura 6 A. A figura 6 B confirma a eficácia da desnervação sino-aórtica, pois a infusão de fenilefrina ou nitroprussiato de sódio, não promove alterações reflexas significativas na frequência cardíaca dos grupos de animais desnervados: desnutrido e controle (-0.08 ± 0.243 vs. -0.03 ± 0.168 bpm/mmHg, respectivamente).

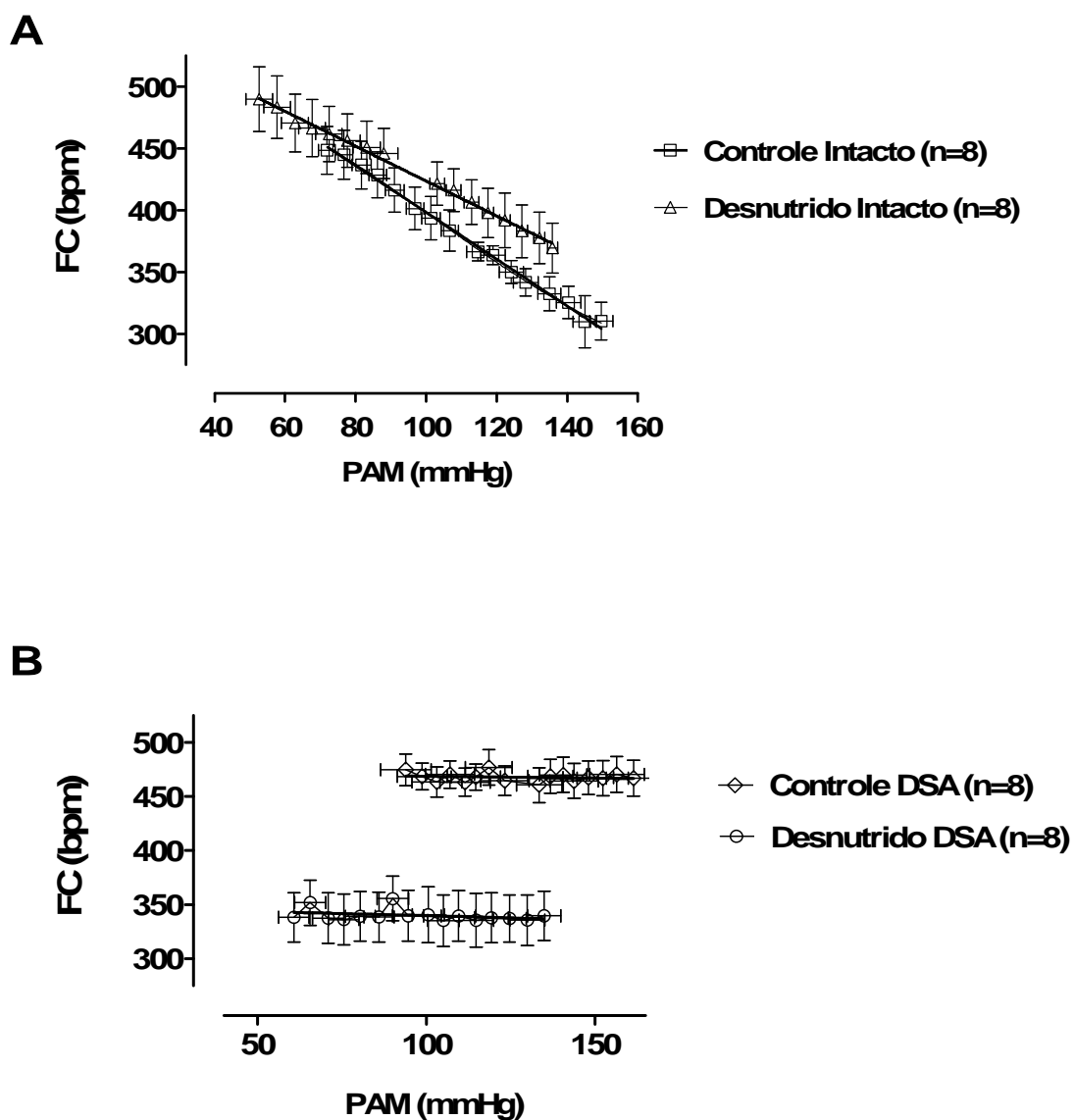


Figura 6 – Estimativa do índice de sensibilidade barorreflexa em animais controles e desnutridos intactos (A) e animais controles e desnutridos desnervados (B). A infusão em rampa de fenilefrina (0,25 mM) ou nitroprussiato de sódio (0,4 mM) promoveu bradicardia e taquicardia reflexa, respectivamente nos grupos intactos, não havendo diferenças significativas entre esses grupos. Nenhuma resposta reflexa na FC foi observada nos animais desnervados. PAM= pressão arterial média, FC= frequência cardíaca e DSA= desnervação sino-aórtica.

4.4 – Respostas cardiovasculares promovidas pela ativação do reflexo Bezold-Jarisch decorrentes de injeções endovenosas de fenilbiguanida

Alterações da PAM e FC produzidas por injeções endovenosas de fenilbiguanida. Observamos nessas análises respostas hipotensoras significativamente reduzidas dos animais desnutridos DSA quando comparado aos animais controle DSA ($-36,8 \pm 7$ vs. $-80,0 \pm 7$ mmHg, respectivamente). Ainda na respostas hipotensoras produzidas pela administração de fenilbiguanida observamos os animais do grupo controle DSA apresentam resposta significativamente diferentes dos demais grupos, controle intacto, desnutrido intacto e desnutrido DSA ($-80,0 \pm 7$ vs. $-57,3 \pm 4$; $-54,3 \pm 6$; $-36,8 \pm 7$ mmHg, respectivamente). Uma menor responsividade do reflexo Bezold-Jarisch foi observada nos animais do grupo desnutrido DSA ao avaliarmos a resposta bradicárdica e compararmos com os outros grupos (-124 ± 17 vs. $-317,3 \pm 22$; $-413,7 \pm 20$; $-371,7 \pm 16$ bpm; desnutrido DSA, controle intacto, controle DSA, desnutrido intacto, respectivamente). Assim como na resposta hipotensora, diferenças significativas na resposta bradicárdica foram observadas entre os grupos controle DSA ($-413,7 \pm 20$ bpm) e controle intacto ($-317,3 \pm 22$ bpm) na dose de $5,0 \mu\text{g/Kg}$. Aspectos qualitativos das manobras produzidas por PBG na PAM e FC são exemplificados nas figuras 7 e 8. O conjunto destes resultados é sumariado na figura 9 e tabela 5.

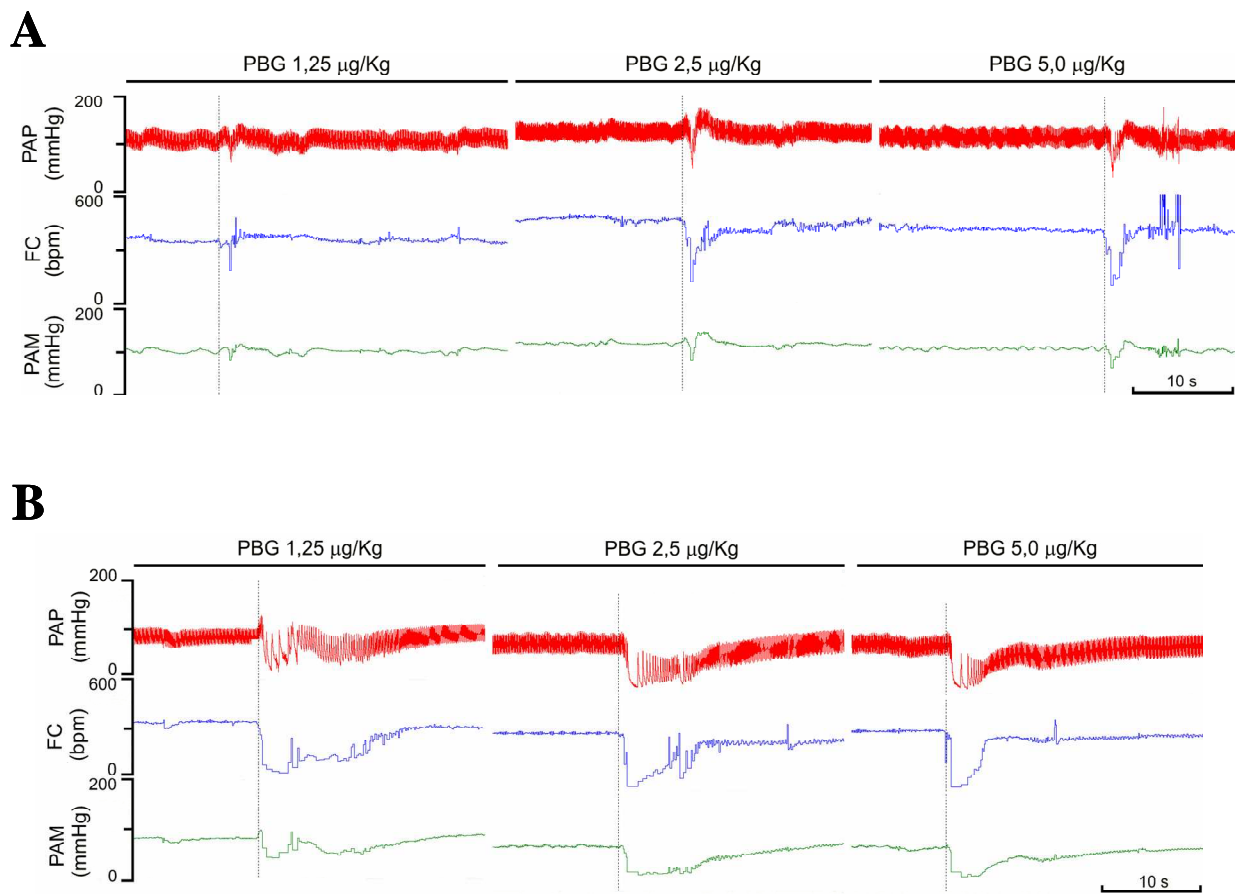


Figura 7 – Registros de um animal representativo do grupo controle intacto (A) e de um animal representativo do grupo desnutrido intacto (B) mostrando os efeitos das injeções i.v. fenilbiguanida nas doses de 1,25; 2,5 e 5,0 µg/kg sobre a PAP, FC, PAM em função do tempo. PAP= pressão arterial pulsátil, FC= frequência cardíaca e PAM= pressão arterial média.

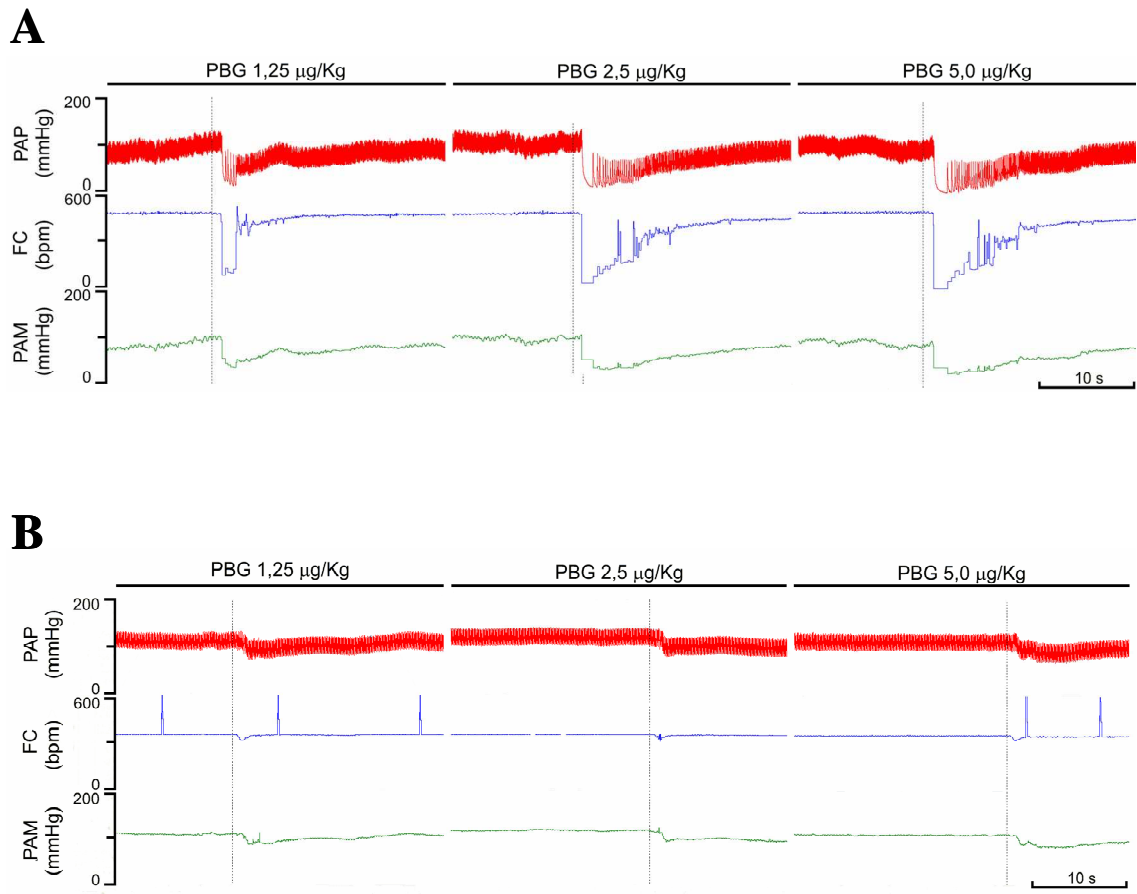


Figura 8 – Registros de um animal representativo do grupo controle DSA (A) e de um animal representativo do grupo desnutrido DSA (B) mostrando os efeitos das injeções i.v. fenilbiguanida nas doses de 1,25; 2,5 e 5,0 µg/kg sobre a PAP, FC, PAM em função do tempo. PAP= pressão arterial pulsátil, FC= frequência cardíaca, PAM= pressão arterial média e DSA= desnervação sino-aórtica.

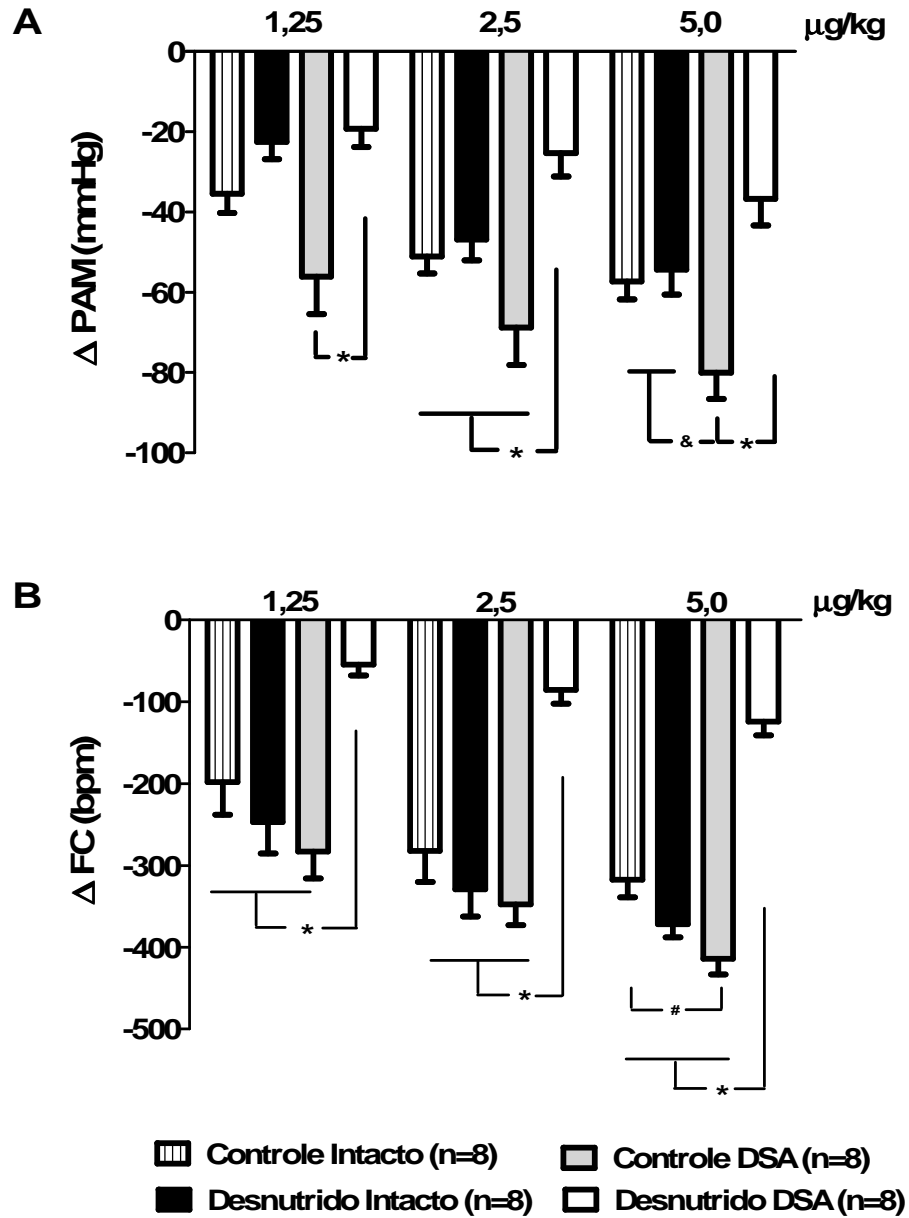


Figura 9 – Respostas hipotensoras (A) e bradicárdicas (B) à administração sistêmica de fenilbiguanida em três diferentes doses: 1,25; 2,5 e 5,0 μg/kg. * = Diferente do grupo desnutrido DSA, $P < 0,001$. & = diferente do grupo controle DSA, $P < 0,05$. # = diferente do grupo controle intacto, $P < 0,05$ (*Two way ANOVA*, seguida pós teste de *Bonferroni*). PAM= pressão arterial média, FC= frequência cardíaca e DSA= desnervação sino-aórtica.

4.5 – Relação da variação de pressão arterial média em função da frequência cardíaca

Após observarmos as respostas produzidas pela PBG na pressão arterial e frequência cardíaca nos quatro diferentes grupos estudados (figura 9), decidimos dividir os picos das respostas hipotensoras pelos picos das respostas bradicárdicas com intuito de avaliar a relação de dependência entre esses parâmetros. Observamos então que existe uma pouca relação na queda da pressão arterial pela queda da frequência cardíaca nos animais do grupo desnutrido desnervado, sendo que na dose de $1,25\mu\text{g}/\text{Kg}$ os valores de $\Delta\text{PAM}/\Delta\text{FC}$ foram significativamente diferentes dos demais grupos ($0,52\pm 0,2$ vs. $0,28\pm 0,01$; $0,19\pm 0,02$; $0,12\pm 0,04$, desnutrido DSA, controle intacto, controle DSA, desnutrido intacto, respectivamente). Esses dados estão representados na figura 10 e tabela 6.

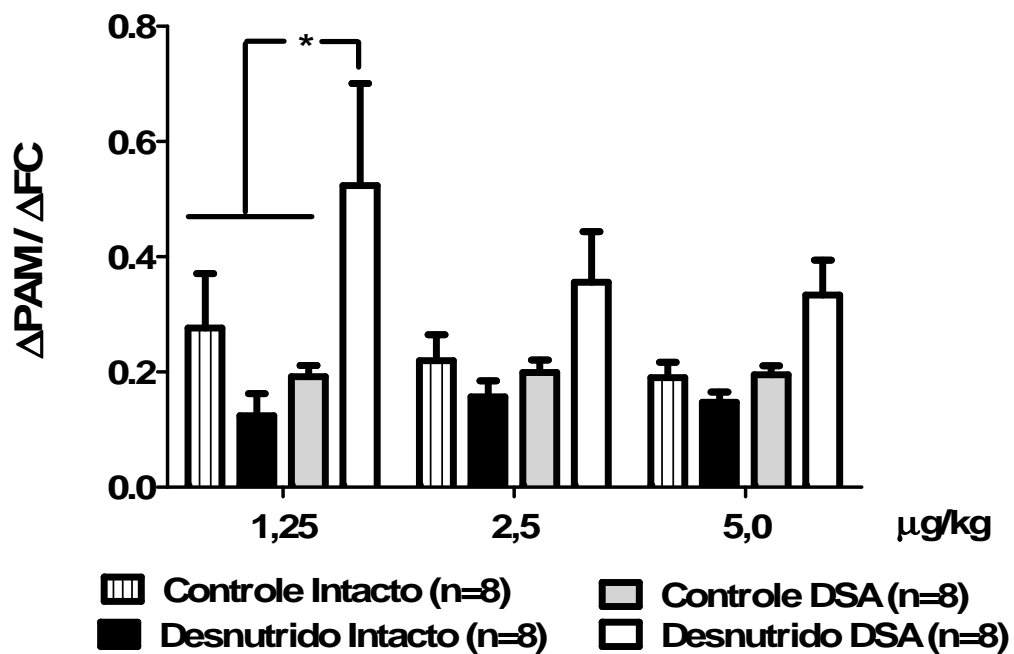


Figura 10 – Valores de $\Delta PAM / \Delta FC$. Respostas hipotensoras sobre as respostas bradicárdicas produzidas por PBG em três diferentes doses: 1,25; 2,5 e 5,0 $\mu g/kg$. * = Diferente dos grupos: controle intacto, controle DSA e desnutrido intacto, $P < 0,05$. (Two way ANOVA, seguida pós teste de *Bonferroni*). PBG= fenilbiguanida, PAM= pressão arterial média, FC= frequência cardíaca e DSA= desnervação sino-aórtica.

4.6 – Efeitos do bloqueio vagal sobre a resposta hipotensora e bradicárdica induzida por fenilbiguanida

Para testar o quanto da resposta hipotensora é dependente componente cardio-vagal do reflexo nos animais desnutridos, nós realizamos a injeção de PBG antes e após bloqueio vagal produzido por brometo de metil-atropina, um antagonista colinérgico muscarínico que não atravessa a barreira hemato-encefálica (dependendo da dose) (Takakura et al., 2003). A ativação do reflexo Bezold-Jarisch com o uso de PBG na dose de 5,0µg/Kg foi capaz de promover quedas na FC e PA, sendo que após bloqueio vagal com brometo de metil-atropina (106,7 nmol/kg) essas repostas foram abolidas (-261,2±21; -226±43 vs. -3,9±3; -9±20 bpm) (-42±4; -32,9±9 vs. -5,6±1; -5±2 mmHg) controle intacto, desnutrido intacto, respectivamente. Valores semelhantes de FC e PA aos encontrados antes do bloqueio foram observados pós bloqueio nos animais controle e desnutridos intactos (-261,2±21; -226±43 vs. -235±15; -173,5±42 bpm) (-42±4; -32,9±9 vs. -30,7±3,5; -40,3±5 mmHg) respectivamente. Não foram observadas diferenças significativas entre resultados encontrados para os grupos avaliados. Resultados explicitados na tabela 7 e figura 11.

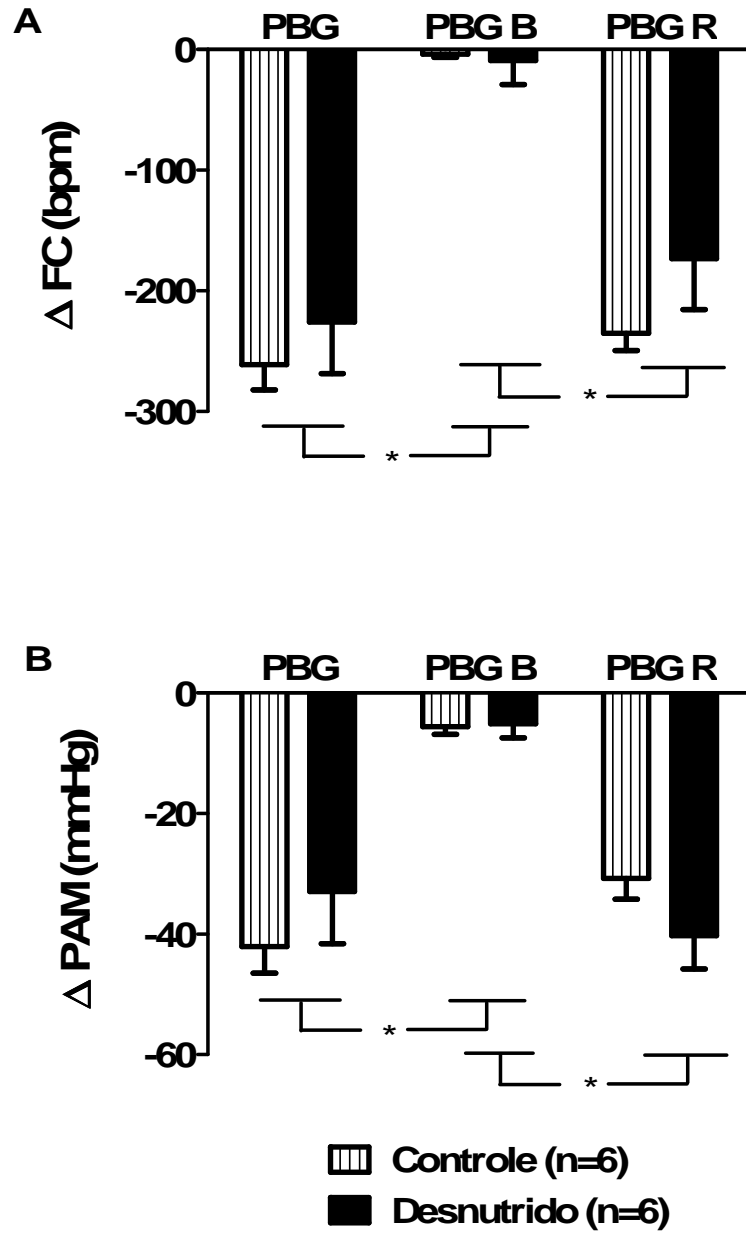


Figura 11 – Respostas hipotensoras (A) e bradicárdicas (B) à administração sistêmica de fenilbiguanida na dose de 5 $\mu\text{g}/\text{Kg}$. * = Diferente de PBG B, $p < 0,05$ (*Two way ANOVA*, seguida pós teste de *Bonferroni*). PAM= pressão arterial média, FC= frequência cardíaca, PBG= fenilbiguanida, PBG B= fenilbiguanida pós bloqueio com atropina e PBG R= fenilbiguanida 60 minutos pós bloqueio com atropina.

4.7 – Efeitos do bloqueio vagal sobre a resposta hipotensora e bradicárdica produzida pela acetilcolina

A administração intravenosa de acetilcolina (26,7 nmol/kg) promoveu queda significativa na PAM ($-46,4 \pm 3$; $-40 \pm 4,5$ mmHg), e FC ($-24,9 \pm 5$; $-27,1 \pm 5$ bpm) nos animais do grupo controle intacto e desnutrido intacto, respectivamente. Esses efeitos foram passageiros, os valores retornam aos valores basais em menos de 2 minutos. Após bloqueio vagal com brometo de metil-atropina (106,7 nmol/kg) foi observada atenuação da resposta hipotensora ($-3,5 \pm 3$; $-3,1 \pm 3$ mmHg) e bradicárdica ($-3 \pm 2,5$; $-1,4 \pm 2$ bpm) produzida pela acetilcolina, controle intacto e desnutrido intacto, respectivamente. Passado 60 minutos pós bloqueio os valores de PA e FC foram semelhantes aos encontrados antes do bloqueio (-40 ± 3 ; $-34,1 \pm 1$ vs. $-46,4 \pm 3$; $-40 \pm 4,5$ mmHg) ($-23,6 \pm 5$; $-26,2 \pm 8$ vs. $-24,9 \pm 5$; $-27,1 \pm 5$ bpm) controle intacto, desnutrido intacto, respectivamente. Não foram observadas diferenças significativas nos valores encontrados para os grupos desnutridos e controle intactos. Dados representados na figura 12 e tabela 8.

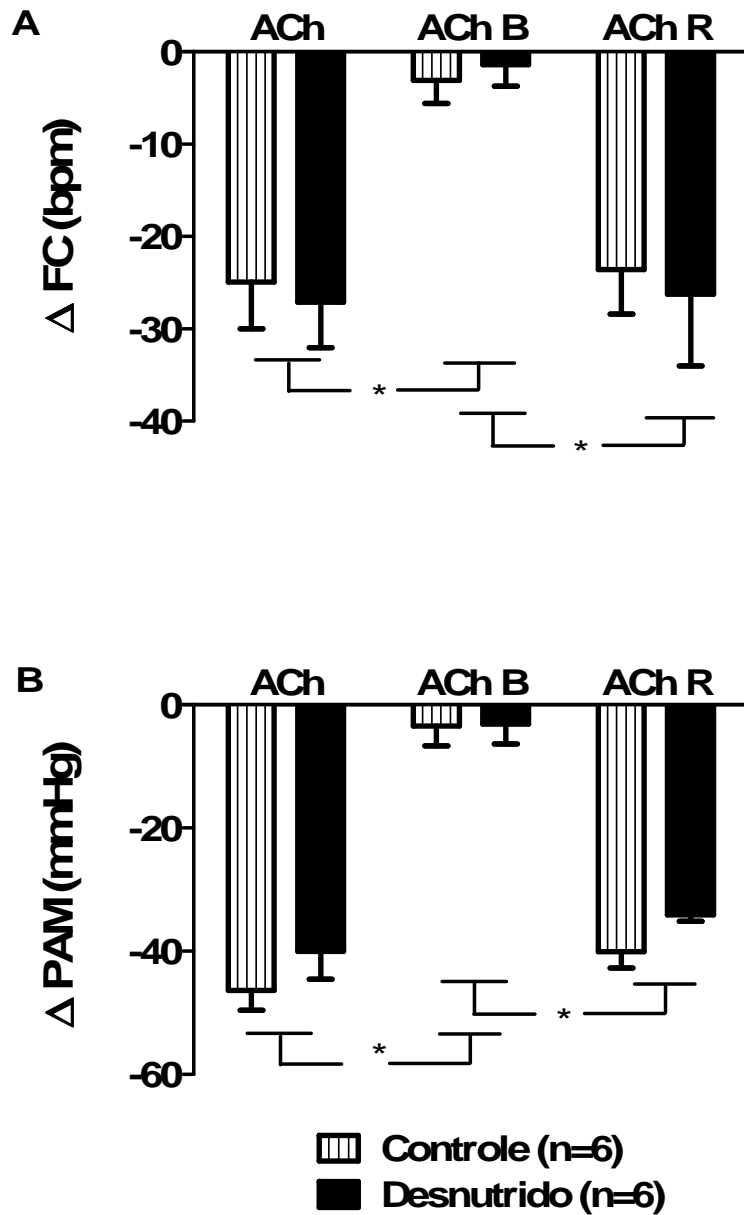


Figura 12 – Respostas hipotensoras (A) e bradicárdicas (B) à administração endovenosa de acetilcolina na dose de 26,7 nmol/kg. * = Diferente de ACh B, $p < 0,05$ (Two way ANOVA, seguida pós teste de *Bonferroni*). PAM= pressão arterial média, FC= frequência cardíaca ACh= acetilcolina, ACh B= acetilcolina pós bloqueio com atropina e ACh R= acetilcolina 60 minutos pós bloqueio com atropina.

4.8 – Valores basais de pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) em ratos anestesiados

Para os níveis basais de pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) durante a experimentação realizada em ratos anestesiados com uretana (1,2 a 1,4g/kg), foram utilizados valores médios encontrados num intervalo de 10 minutos antes de iniciarmos os experimentos. Os níveis basais de FC encontrados para os animais desnutridos ($477,7 \pm 18$ bpm) foram significativamente maiores quando comparados aos valores encontrados para os animais do grupo controle ($360,3 \pm 11$ bpm). Os níveis de PAM não foram diferentes entre os grupos desnutrido e controle ($101,9 \pm 4$ vs. $94,07 \pm 3$ mmHg). Estes resultados podem ser observados na figura 13 e tabela 8.

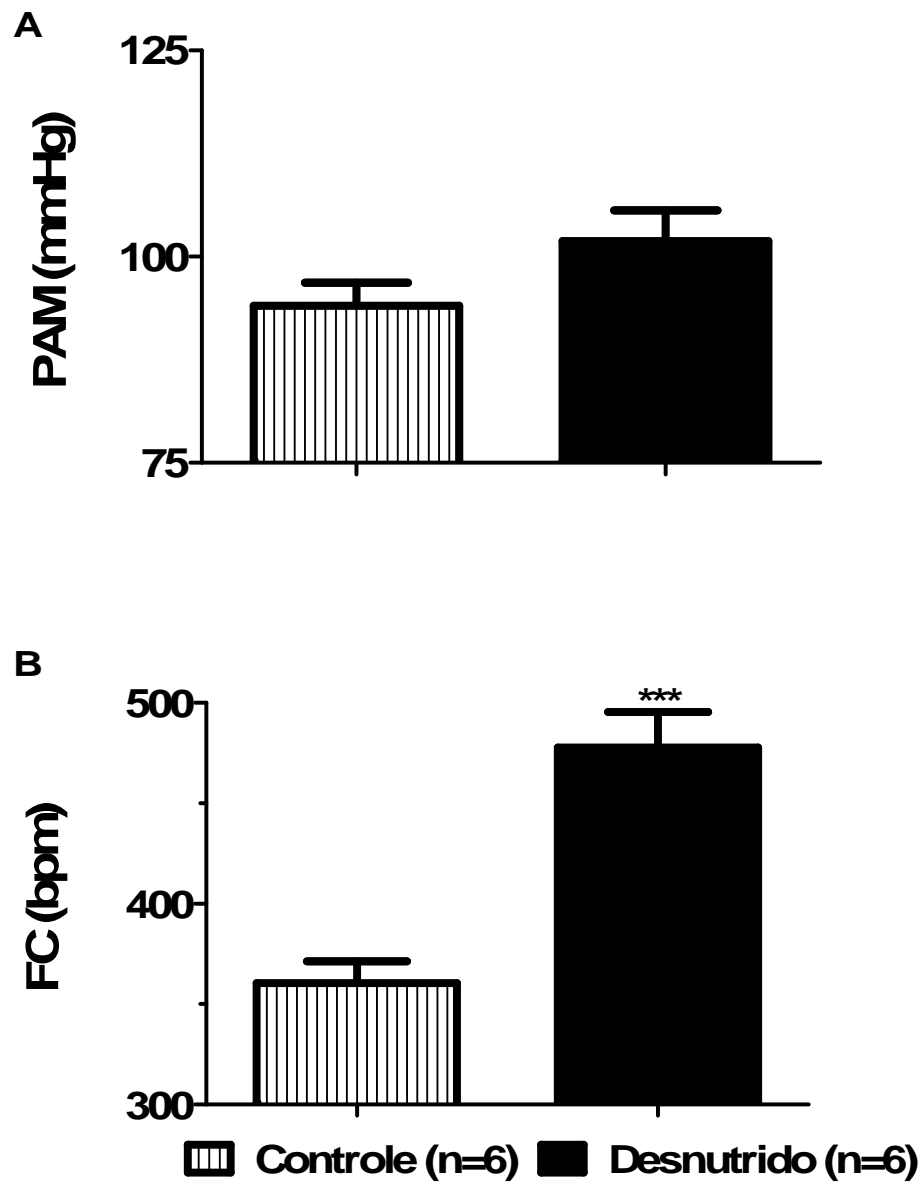


Figura 13 – Níveis basais de PAM (A) e FC (B). (***) = diferente significativamente do grupo controle, $p < 0.0001$ (teste *t-Student*). PAM= pressão arterial média, FC= frequência cardíaca.

4.9 – Reatividade simpática, bradicardia e resposta hipotensiva após a ativação do reflexo Bezold-Jarisch

Nestes experimentos avaliamos a reatividade simpática através da atividade simpática para o nervo renal (ASNR), com o uso de fenilbiguanida a qual já é sabido que estimula o reflexo Bezold-Jarisch. Observamos então, que a reatividade simpática do grupo desnutrido foi significativamente menor quando comparado ao grupo controle para todas as doses administradas; 1,25 $\mu\text{g/Kg}$, 2,5 $\mu\text{g/Kg}$ e 5,0 $\mu\text{g/Kg}$ de fenilbiguanida (-29,8 \pm 3; -37,3 \pm 10; -53,9 \pm 9 vs. -69,2 \pm 9; -78,0 \pm 9; -84,3 \pm 7, desnutrido e controle, respectivamente). Dados mostrados no painel C da figura 14 e tabela 10.

Ainda nestes experimentos avaliamos também as alterações na pressão arterial e frequência cardíaca promovidas pelas mesmas três doses de fenilbiguanida, porém não observamos diferenças significativas entre os animais do grupo desnutrido com os animais do grupo controle para as alterações na PA (-16,5 \pm 7; -15,5 \pm 5; -23,9 \pm 4 vs. -17,5 \pm 7; -20,6 \pm 7; -29,0 \pm 5 mmHg, respectivamente) e FC (-115,4 \pm 42; -165,14 \pm 51; -221,47 \pm 47 vs. -126,31 \pm 33; -153,6 \pm 32; -223,4 \pm 27, respectivamente). Resultados apresentados na figura 14 (painel A e B) e na tabela 9.

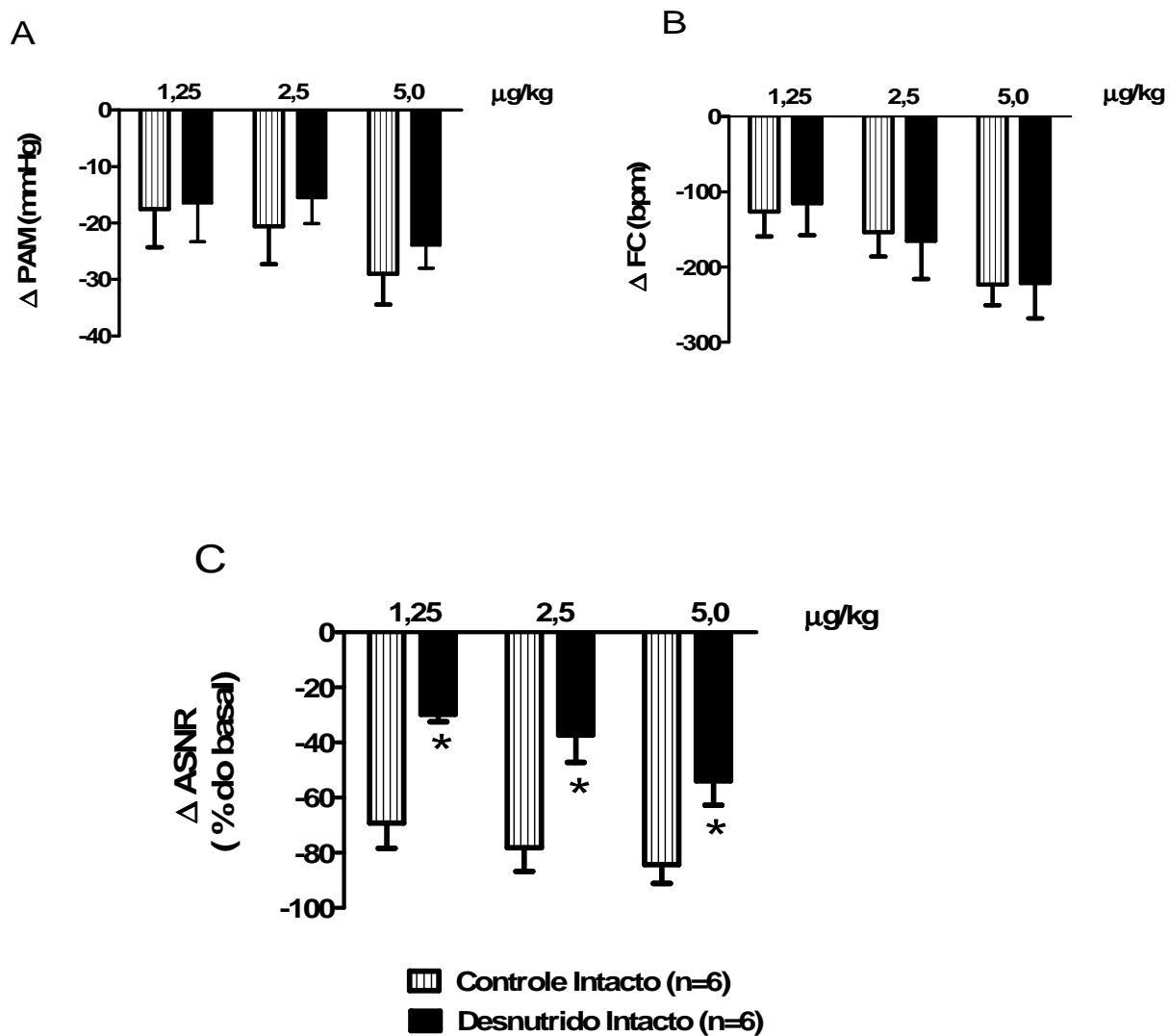


Figura 14 – Valores de Δ PAM (A), Δ FC (B) e Δ ASNR (C) em resposta a administração de fenilbiguanida em diferentes três diferentes doses: 1,25; 2,5 e 5,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$. *= diferente do controle intacto, $P < 0,05$ (*Two way* ANOVA, seguida pós teste de *Bonferroni*). PAM= pressão arterial média, FC= frequência cardíaca e ASNR= atividade simpática para o nervo renal.

5 – DISCUSSÃO

Nossos resultados demonstram que a desnutrição proteica pós-desmame em ratos promove prejuízos na regulação reflexa cardiopulmonar, com atenuação das repostas hipotensoras e bradicárdicas produzidas pela fenilbiguanida. E ainda, ratos desnutridos apresentam menor queda da atividade simpática após ativação do reflexo Bezold-Jarisch. Esses achados sugerem alterações autonômicas importantes neste modelo experimental.

Em nosso laboratório utilizamos o rato para reproduzir o quadro de desnutrição, por ele ter metabolismo acelerado e apresentar ciclo reprodutivo curto, além de ser de fácil manuseio. O modelo de desnutrição proposto neste trabalho foi baseado na redução do conteúdo proteico da dieta oferecida ao grupo desnutrido de 15% para 6%, o que representa uma redução de 60% da proteína dietética (caseína). É importante destacar que as duas dietas oferecidas aos animais apresentam a mesma quantidade de quilocalorias (Kcal), sendo, portanto, isocalóricas. Esta metodologia assemelha-se aos métodos utilizados em outros trabalhos da literatura (Agarwal et al., 1981; Lukoyanov; Andrade, 2000; Ferreira et al., 2003). Em nossos resultados observamos que os animais submetidos à desnutrição proteica apresentaram uma redução de peso de aproximadamente 61%, sendo diferente quando comparado com os animais que receberam a dieta normoproteica (figura 4). Diversos outros trabalhos que utilizaram ratos como modelo experimental de desnutrição também tem relatado o déficit no peso corporal através da depleção da massa muscular (Martinez-Maldonado et al., 1993; Benabe et al., 1993; Kim et al., 1994; Oliveira et al., 2004). De uma maneira geral, a redução de peso pode ser utilizada como um indicador básico de desnutrição (Lucas, 1998). Outros fatores característicos de um quadro de desnutrição têm sido apresentados por nosso laboratório e incluem baixos níveis de albumina plasmática e proteínas totais (Tropia et al., 2001; Oliveira et al., 2004). Diante do exposto podemos afirmar que a dieta com 6% de proteína oferecida aos animais é eficaz em promover a desnutrição experimental.

No presente estudo, os valores de FC basal dos animais desnutridos intactos foram significativamente maiores quando comparado aos animais controle intacto. Já a PAM dos

dois grupos de animais intactos (controle e desnutrido) não foram diferentes (figura 5). Trabalhos anteriores do nosso laboratório mostraram que a desnutrição proteica após a amamentação por um período de 35 dias não altera os níveis basais de PAM e FC de ratos, (Tropia et al., 2001). Neste mesmo trabalho foi observada uma maior queda da PAM decorrente da administração de prazosin, bloqueador α -adrenérgico, no grupo desnutrido quando comparado ao grupo controle, sugerindo um aumento da atividade simpática vasomotora naqueles animais (Tropia et al., 2001). Posteriormente, Oliveira *et al.* (2004) no mesmo modelo experimental, mas utilizando uma metodologia de registro e análise de um número maior de pontos, observaram níveis maiores de PAM e FC basais. Nossos dados de FC dos animais desnutridos intactos assemelham-se àqueles reportados por esses últimos autores, apesar da metodologia utilizada na coleta de dados do presente trabalho se aproximar da realizada por Tropia *et al.* (2001). Ainda em nosso laboratório Martins (2007), com a utilização de manobras farmacológicas, demonstrou um aumento no tônus simpático e diminuição da participação parassimpática nos ratos desnutridos quando comparados aos ratos controles. Neste estudo, a análise da variabilidade da FC no domínio da frequência demonstrou um predomínio do tônus simpático sobre o parassimpático, pois a relação LF/HF dos animais desnutridos se mostrou aumentada em relação ao controle. Esse desbalanço autonômico pode ser responsável por essa elevação da frequência cardíaca encontrada no presente estudo. Outros trabalhos da literatura também tem relatado que a desnutrição proteica promove aumento da atividade simpática e diminuição da atividade parassimpática (Leon-quinto et al., 1998).

A desnervação dos barorreceptores arteriais produz um grande aumento da labilidade da PA, a qual parece ser consequência de uma interação de mecanismos neurais, humorais e hemodinâmicos (Jacob et al., 1988; Krieger et al., 2006). No entanto, uma característica interessante de ratos submetidos à DSA é o nível de PAM, o qual não se apresenta significativamente elevado. Várias evidências indicam que os animais não são hipertensos (Cowley et al., 1973; Persson et al., 1989; Chianca Junior; Machado, 1994). Em nossos resultados vimos um aumento da PAM e da FC nos animais controle submetidos à desnervação quando comparado aos animais dos grupos: controle intacto, desnutrido

intacto e desnutrido desnervado (figura 5). Krieger *et al.* (2006) também observaram um aumento da PAM e FC de ratos desnervados, 6 e 24 horas após a desnervação, estes autores sugerem que o aumento agudo destes parâmetros cardiovasculares podem ser equiparados com o aumento da atividade simpática renal sem nenhuma alteração na atividade de renina no plasma (Krieger *et al.*, 2006). Contudo, outros trabalhos relatam que altos valores de PAM e FC encontrados em ratos após a desnervação retornam ao normal dentro de 48 horas, prevalecendo somente o aumento da labilidade destes parâmetros (Irigoyen; krieger, 1998). Como nossos experimentos foram realizados 24 horas após o procedimento cirúrgico podemos inferir, que o aumento encontrado na PAM dos animais controles DSA não pode ser caracterizado como hipertensão. Diferente dos animais controle DSA, os animais desnutridos DSA não apresentaram valores elevados de PAM e FC, no presente trabalho. Os valores basais de PAM e FC dos animais desnutridos DSA foram semelhantes aos valores encontrados para os animais desnutridos intactos (figura 5). Esses dados reforçam a ideia de que os animais desnutridos apresentam um desbalanço autonômico, ficando evidente nos diferentes resultados encontrados no presente estudo após a retirada do barorreflexo. Os barorreceptores foram estimulados, através da infusão em rampa de fenilefrina e nitroprussiato de sódio, onde confirmamos a eficácia da desnervação sino-aórtica, pois os animais desnervados não apresentaram alterações reflexas após realização dessas manobras farmacológicas. E ainda não observamos diferenças significativas no ganho barorreflexo entre os animais desnutridos intactos e controles intactos (figura 6).

Já está bem estabelecida a importância dos barorreceptores no controle a curto prazo da PA, todavia, estudos realizados em humanos e em modelos experimentais tem mostrado que o controle reflexo da circulação não depende somente do barorreflexo, mas também com grande importância dos receptores localizados na região cardiopulmonar (Zanchetti; Mancia, 1991). O reflexo Bezold-Jarisch é evocado por aferentes quimiossensíveis e produz como resposta apneia, bradicardia e vasodilatação (Chen, 1979; Veelken *et al.*, 1993; Chianca Junior; Machado, 1994; Meyrelles *et al.*, 1997; Kashihara *et al.*, 2003; Salo *et al.*, 2007; Mark; Dunlap, 2008). As repostas cardiovasculares como bradicardia e hipotensão ocorrem através da ativação de fibras C não mielinizadas (Thoren, 1979;

Veelken et al., 2003). Sendo que mais de 70% dessas fibras C que estão localizadas nas paredes dos átrios e ventrículos e na região pulmonar, apresentam característica bimodal, ou seja, responde tanto a alterações de volume quanto a substância química (Veelken et al., 2003). Há algumas décadas que a ação depressora de substâncias químicas, como veratridina, capsaicina e fenilbiguanida são conhecidas e é sabido também que elas ativam o RBJ, no entanto foi questionado o significado fisiológico da indução deste reflexo por essas substâncias, uma vez que elas não estão frequentemente presentes na vida dos mamíferos. Contudo PBG estimula receptores 5-hidrotriptamina-3 (5HT₃) que são uma especial subclasse de receptores da serotonina (Veelken et al., 1997), sendo importante estudar o efeito produzido por esta substância, dado que em várias situações fisiopatológicas a serotonina é liberada endogenamente no organismo (Schultz, 2001).

Em nosso trabalho ao realizarmos a ativação do RBJ como uso de PBG, observamos que os animais controles desnervados apresentaram uma maior responsividade do RBJ na dose de 5,0 µg/Kg de PBG quando comparado aos outros grupos estudados (figura 9). Trabalhos realizados por Chianca *et al.* (1994, 1997) relataram que após deaferentação dos barorreceptores arteriais em ratos, os receptores cardiopulmonares apresentaram uma participação importante no controle da pressão arterial. O reflexo Bezold-Jarisch estava mais responsivo em animais desnervados (Chianca Junior; Machado, 1994; Chianca Junior et al., 1997). Nós reproduzimos os dados de Chianca *et al.* (1994) quando observamos a dose de 5,0 µg/Kg de PBG, embora naqueles a substância utilizada foi a serotonina e neste o RBJ foi estimulado por agonista específicos da serotonina (5HT₃). Diferentes resultados foram encontrados quando avaliamos o RBJ nos animais desnutridos, que após serem submetidos à DSA demonstraram uma resposta bradicárdica e hipotensora reduzida, ou seja, após a retirada dos barorreceptores, estes animais apresentaram uma diminuição na responsividade do reflexo Bezold-Jarisch (figura 9).

Tanto em modelos experimentais de hipertensão (Widdop et al., 1990; Ugerre et al., 2000), quanto em humanos hipertensos (Grassi et al., 1988), o ganho do reflexo Bezold-Jarisch encontra-se alterado. Uggere *et al.* (2000) mostraram que o tratamento anti-hipertensivo crônico com enalapril em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) é capaz de

reduzir a hipertensão e a hipertrofia cardíaca e normalizar a sensibilidade do reflexo cardiopulmonar e seu controle na atividade simpática via atividade simpática para o nervo renal. Posteriormente, estes mesmo autores observaram que o prejuízo da responsividade do reflexo Bezold-Jarisch no controle da atividade simpática para o nervo renal em ratos SHR se correlaciona melhor com a magnitude da hipertrofia cardíaca do que com os níveis de pressão arterial (Ugerre et al., 2008).

Assim como as alterações no RBJ em animais submetidos a uma dieta hipoproteica encontradas no presente estudo, pacientes com cardiopatia chagásica e função ventricular preservada, também apresentaram deficiência no reflexo cardiopulmonar (Consolim-Colombo et al., 2000). Em um modelo de diabete experimental, foi observado também um prejuízo do RBJ em exercer o controle da circulação (Oliveira et al., 1999). Neste trabalho através da análise da atividade simpática para o nervo renal (ASNR), foi observada ausência de modulação da atividade simpática via reflexo cardiopulmonar. A expansão do volume plasmático com aumento da pressão diastólica final do ventrículo esquerdo não modificou a resposta da atividade simpática renal, diferentemente da inibição observada em indivíduos normais. Segundo os autores, essa ausência de modulação pode estar associada à disfunção do balanço entre a ingestão e a excreção de sódio e água, modificando as respostas natriurética e diurética no estado diabético (Oliveira et al., 1999). Esses achados demonstram que diversas patologias são capazes de prejudicar as respostas produzidas pelo reflexo Bezold-Jarisch, contribuindo para a perda da homeostase fisiológica.

Trabalhos da literatura relatam que a resposta hipotensiva observada em ratos após ativação do RBJ é completamente dependente da bradicardia observada (Chianca Junior; Machado, 1996; Machado et al., 1997; Leal et al., 2000). Chianca e Machado (1996) observaram que a administração de metil-atropina (anticolinérgico antimuscarínico) praticamente aboliu a bradicardia induzida pela serotonina, o mesmo ocorrendo com a resposta hipotensora, indicando que o componente autonômico parassimpático parece ser relativamente o mais importante na resposta cardiovascular do reflexo Bezol-Jarisch. Em nosso estudo ao dividirmos os picos das respostas hipotensoras pelos picos das respostas bradicárdicas, encontradas após estimulação do RBJ com fenilbiguanida (figura 10),

observamos uma pouca relação entre a queda da PA com a queda da FC nos animais desnutridos desnervados. Levantamos a hipótese de que talvez a resposta eferente do RBJ em animais desnutridos ocorresse de maneira diferente aos animais controles. Decidimos então, avaliar as repostas produzidas pela fenilbiguanida após bloqueio com metil-atropina em animais desnutridos intactos, na tentativa de observar se a queda da PA é decorrente da queda da FC como visto anteriormente em animais controle. Os dados encontrados indicam que as repostas hipotensivas após administração de PBG são dependentes da queda FC, metil-atropina aboliu a bradicardia assim como a queda PA (figura 11). Esses resultados sugerem que as repostas periféricas produzidas pela estimulação do RBJ em animais desnutridos intactos são semelhantes às repostas encontradas para os animais controle intacto. O que nos leva a imaginar que essa menor responsividade do RBJ encontrada nos animais desnutridos desnervados possivelmente ocorra devido a uma diferente interação central entre os reflexos barorreceptores e cardiopulmonares, uma vez que, nos animais desnutridos intactos o RBJ comporta-se de maneira semelhante aos animais controle quando as variáveis avaliadas são PA e FC.

Embora a bradicardia reflexa dada pela ativação dos barorreceptores e de receptores cardiopulmonares sejam de natureza diferentes, mecanismos de integração centrais envolvidos no desencadeamento da resposta são semelhantes (Lee et al., 1972). Trabalhos anteriores sugerem que o reflexo Bezold-Jarisch e o barorreflexo podem compartilhar vias centrais, Pires *et al.* (1998) reportam que a bradicardia e hipotensão induzida por PBG foi significativamente atenuada pela microinjeção bilateral de ganisetron (antagonista de receptores 5HT₃) no NTS, sugerindo a participação do NTS nas vias centrais do RBJ (Pires et al., 1998). A interação entre barorreflexo e reflexo cardiopulmonar também foi relatada quando a injeção de PBG inibiu neurônios sensíveis ao barorreflexo localizados na RVLM (Verbene; Guyenet, 1992). Considerando que a queda da PA é decorrente da queda da FC, Leal *et al.* (2000) sugere que a ativação do RBJ ocorre principalmente devido a excitação da via parassimpática, na qual, é inibida pela ativação de receptores 5HT₃ localizados no NTS, provavelmente esta inibição ocorre pela interação com mecanismo gabaérgicos (Leal

et al., 2000). Estes autores relatam que os receptores 5HT₃ no NTS exercem um papel neuromodulador inibitório no componente parassimpático do RBJ.

A desnutrição durante o período crítico de desenvolvimento pode levar ao desbalanço autonômico através de alterações morfológicas em várias áreas do sistema nervoso central (Plagemann et al., 2000). Embora seja conhecido haver dissociação entre as projeções autonômicas simpáticas e parassimpáticas no NTS, conforme demonstrado através de microinjeções de L-glutamato no NTS de ratos não anestesiados (Machado et al. 1997), poderiam ser esperadas similaridades na ativação destes mecanismos reflexos barorreceptor e cardiopulmonar quanto às descargas vagais e simpatoinibições, tendo em vista a utilização de neurocircuitarias aferentes semelhantes em ambos os reflexos. Diante do exposto, remetemos a razão dos distúrbios observados no presente estudo, às regiões comuns da integração de ambos os reflexos cardíacos no SNA. Sabendo que tanto o reflexo barorreceptor quanto o cardiopulmonar (Bezold-Jarisch) utilizam mecanismos similares em suas vias de neurotransmissão (Verbene; Guyenet, 1992; Chianca Junior et al., 1997) e dados ainda não publicados do nosso laboratório demonstram que o protocolo de desnutrição proteica pós-desmame foi capaz de promover disfunções na neurotransmissão glutamatérgica do barorreflexo (Rodrigues, 2008). Nós inferimos que a desnutrição pode levar a uma diferente interação entre barorreflexo e reflexo Bezold-Jarisch de ratos, que possivelmente prejudicaria os processos de plasticidade existentes, pelo menos no que diz respeito a estes dois reflexos.

O sistema nervoso simpático tem um papel importante no controle circulatório e na homeostase do volume (Veelken et al., 1997; Ditting et al., 2006). O reflexo cardiopulmonar com seus aferentes vagais participam no controle homeostático do volume ao influenciar na atividade para o nervo simpático renal (Veelken et al., 1993; Ugerre et al., 2008). No presente estudo, avaliamos a reatividade simpática em animais anestesiados com o uso de fenilbiguanida, através da atividade simpática para o nervo renal (ASNR). Vimos que a atenuação da atividade simpática para o nervo renal produzida pela fenilbiguanida é menor nos animais desnutridos quando comparada aos animais controles, ou seja, os animais desnutridos anestesiados apresentam uma menor reatividade simpática após

estimulação do RBJ quando comparado aos animais controle anestesiado. Porém não foram observadas diferenças entre os grupos controle e desnutrido na queda da PA e FC após ativação do RBJ (figura 12).

Alguns estudos indicam que o reflexo Bezold-Jarisch controla diferencialmente órgãos específicos de atividade dos nervos simpáticos. Prolongado estímulo de receptores 5-HT₃ causa supressão sustentada na ASNR, demonstrando que a ativação do RBJ exerce um controle específico no nervo renal, uma vez que a ativação reflexa ou por estimulação de receptores 5-HT₃, ou pela expansão do volume não influenciou a atividade do nervo simpático lombar (Veelken et al., 1993). Diferentes respostas também foram encontradas na atividade simpática do nervo adrenal, dependendo da forma de estímulo (químico ou mecânico) e do tempo de duração deste estímulo (curto ou longo), sendo que quando avaliado a ASNR ambas as formas de estímulos do RBJ e períodos de duração foram capazes de diminuir a atividade simpática no leito renal (Ditting et al., 2006). E ainda, uma não uniformidade deste reflexo foi vista quando atividade simpática para o nervo cardíaco foi avaliada após a estimulação do RBJ, onde um grupo de animais apresentou resposta inibitória enquanto outro respostas excitatórias (Salo et al., 2007).

A modulação simpática mediada pelos receptores cardiopulmonares é especialmente importante na regulação da resistência vascular renal. Em algumas situações, os aferentes vagais não-mielinizados podem reforçar (na hemorragia) ou se opor (na insuficiência cardíaca) a ação dos mecanorreceptores arteriais (Ditting et al., 2006; Lacerda et al., 2007). Já foi descrito na literatura a ocorrência de falência cardíaca em consequência de uma desnutrição proteica (Cheema et al., 2005). Embora a metodologia de desnutrição utilizada por aqueles autores é gestacional e difere da empregada em nossos trabalhos, especialmente, pela reversibilidade dos danos promovidos no organismo dos animais. Estudos preliminares do nosso laboratório vêm demonstrando um prejuízo da função cardíaca nos animais anestesiados submetidos à desnutrição proteica pós-desmame, sendo que neste estudo os autores têm observado que os animais desnutridos apresentam uma diminuição da dP/dT ventricular esquerda máxima e mínima, sugerindo uma diminuição da atividade cardíaca (Alves et al., 2009).

Tem sido sugerido que o RBJ é ativado por metabólitos isquêmicos durante a isquemia e infarto do miocárdio, e que este reflexo exerce um papel cardioprotetor ao reduzir a sobrecarga para o coração nestes estados fisiopatológicos (Schultz, 2001). Lacerda *et al.* (2007) observaram uma influência predominante do reflexo cardiopulmonar no controle neurogênico da circulação na fase aguda do infarto do miocárdio, onde eles relatam que a inibição tônica da atividade simpática para o nervo renal durante o infarto agudo poderia ser explicada em partes por uma aumento da sensibilidade do RBJ (Lacerda *et al.*, 2007). Estes mesmos autores durante o infarto crônico observaram uma menor atenuação da ASNR após administração de serotonina o que sugere uma redução da sensibilidade de receptores cardiopulmonar no período crônico deste estado fisiopatológico. Nossos resultados se assemelham a estes últimos achados, onde observamos um prejuízo do RBJ em controlar a ASNR nos animais desnutridos anestesiados. Torna-se necessário, considerar o impacto da deficiência nutricional no que se diz respeito à função cardíaca neste modelo experimental, levando em consideração que animais desnutridos possivelmente apresentam um prejuízo da atividade cardíaca (Cheema *et al.*, 2005) e podem estar em algum estado de falência cardíaca. Sabendo-se ainda que disfunções do controle reflexo cardiovascular, associam-se à maior incidência de morte súbita e à maior mortalidade cardiovascular global (La Rovere *et al.*, 1998).

O prejuízo do componente eferente vagal e evidências de aumento na atividade simpática (Martins, 2007), aliados as alterações na regulação reflexa observadas no presente estudo, aproximam com as disfunções autonômicas encontradas na desnutrição, não apenas aquelas apontadas na hipertensão arterial, mas também ao quadro autonômico encontrado na insuficiência cardíaca.

Nossos dados revelam que a desnutrição proteica pós-desmame promove importantes alterações na regulação reflexa cardiopulmonar, possivelmente alterando processos de plasticidade central, gerando um desbalanço autonômico que interfere negativamente sobre a homeostase cardiovascular. Os mecanismos responsáveis por tais alterações permanecem por ser elucidados em estudos posteriores.

6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGARWAL, K. N.; PRASAD, C.;TANEJA, V. Protein deprivation and the brain: effect on enzymes and free amino acids related to glutamate metabolism in rats. **Ann.Nutr.Metab**, v. 25, n. 4, p. 228-233, 1981.
- AGOTE, M.; GOYA, L.; RAMOS, S.; ALVAREZ, C.; GAVETE, L. M.; PASCUAL-LEONE, M. A. et al. Glucose up take and glucose transporter proteinsin skeletal muscle from undernourished rats. **Am.J.Physiol.Endocrinol.Metab**, v. 281, p. E1101-E1109, 2001.
- ALMEIDA, S. S.; TONKISS, J.;GALLER, J. R. Malnutrition and reactivity to drugs acting in the central nervous system. **Neurosci.Biobehav.Rev.**, v. 20, n. 3, p. 389-402, 1996.
- Alves, A. M., Silva, L. M. P., Silva, M. E., Moraes, M. F. D., Fernandes, L. G., & Chianca Jr, D. A. Avaliação da dP/dT ventricular esquerda em ratos anesteriados submetidos à dieta hipoprotéica. 2009 (Generic) .Ref Type: Unpublished Work
- BARKER, D. J.; BULL, A. R.; OSMOND, C.;SIMMONDS, S. J. Fetal and placental size and risk of hypertension in adult life. **BMJ**, v. 301, n. 6746, p. 259-262, 1990.
- BARKER, D. J.; CLARK, P. M. Fetal undernutrition and disease in later life. **Rev.Reprod.**, v. 2, n. 2, p. 105-112, 1997.
- BELMAR, J.; CARRENO, P.; HERNANDEZ, A.; SOTOMOYANO, R. Malnutrition early in life impairs alpha-2 adrenoreceptor regulation of noradrenaline release in the rat cerebral cortex. **Nutrition Research**, v. 16, n. 10, p. 1727-1734, 1996.
- BENABE, J. E.; MARTINEZ-MALDONADO, M. The impact of malnutrition on kidney function. **Miner.Electrolyte Metab**, v. 24, n. 1, p. 20-26, 1998.
- BENABE, J. E.; WANG, S.; WILCOX, J. N.; MARTINEZ-MALDONADO, M. Modulation of ANG II receptor and its mRNA in normal rat by low-protein feeding. **Am J Physiol**, v. 265, n. 5 Pt 2, p. F660-F669, 1993.

- BERNE, R. M. **Fisiologia**. Elsevier. 5ª Ed. Rio de Janeiro:2004.
- BISHOP, V. S.; HASSER, E. M. Arterial and cardiopulmonary reflexes in the regulation of the neurohumoral drive to the circulation. **Fed.Proc.**, v. 44, n. 8, p. 2377-2381, 1985.
- CHEEMA, K. K.; DENT, M. R.; SAINI, H. K.; AROUTIOUNOVA, N.; TAPPIA, P. S. Prenatal exposure to maternal undernutrition induces adult cardiac dysfunction. **Br.J.Nutr.**, v. 93, n. 4, p. 471-477, 2005.
- CHEN, I. H. Interaction between the baroreceptor and Bezold-Jarisch reflex. **Am J Physiol Heart Circ.Physiol**, p. H655-H661, 1979.
- CHIANCA JUNIOR, D. A.; BONAGAMBA, H. G. L.; MACHADO, B. H. Neurotransmission of the Bezold-Jarisch reflex in the nucleus tractus solitarii of sino-aortic deafferentated rats. **BrainResearch**, v. 756, p. 46-51, 1997.
- CHIANCA JUNIOR, D. A.; MACHADO, B. H. The sensitivity of the Bezold-Jarisch reflex is increased in rats with sinoaortic deafferentation. **Braz.J.Med.Biol.Res.**, v. 27, p. 775-781, 1994.
- CHIANCA JUNIOR, D. A.; MACHADO, B. H. Microinjection of NMDA antagonist into the NTS of conscious rats blocks the Bezold-Jarisch reflex. **Brain Res.**, v. 718, p. 185-188, 1996.
- CONSOLIM-COLOMBO, F.; FILHO, B. A. J.; LOPES, F. H.; SOBRINHO, R. R. C.; OTTO, E. M.; RICCIO, G. M. G. et al. Decreased cardiopulmonary barorreflex sensitivity in chagas' heart disease. **Hypertension**, v. 36, p. 1035-1039, 2000.
- COWLEY, A. W.; LIARD, J. F.; GUYTON, A. C. Role of the baroreceptor reflex in daily control of arterial blood pressure and other variables in dogs. **Circulation Research**, v. 22, p. 564-576, 1973.
- DITTING, T.; HILGERS, K. F.; SCROGIN, K. E.; LINZ, P.; VEELKEN, R. Influence of short-term versus prolonged cardiopulmonary receptor stimulation on renal and preganglionic adrenal sympathetic nerve activity in rats. **Basic Res.Cardiol.**, v. 101, n. 3, p. 223-234, 2006.

DO CARMO PINHO, F. M.; NIGRO, D.; FORTES, Z. B.; TOSTES, R. C.; CARVALHO, M. H.; LUCAS, S. R. et al. Intrauterine undernutrition--renal and vascular origin of hypertension. **Cardiovasc.Res.**, v. 60, n. 2, p. 228-234, 2003.

DOUGLAS.C.R. **Fisiologia aplicada à nutrição**. Guanabara. 2ª ed. Rio de Janeiro: 2006.

EVANS, R. G.; LUDBROOK, J.;MICHALICEK, J. Use de nicotine, bradykinin and veratridine to elicit cardiovascular chemoreflexes in unanaesthetized rabbits. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 18, p. 245-254, 1991.

FERREIRA, F.; FILIPUTTI, E.; ARANTES, V. C.; STOPPIGLIA, L. F.; ARAUJO, E. P.; DELGHINGARO-AUGUSTO, V. et al. Decreased cholinergic stimulation of insulin secretion by islets from rats fed a low protein diet is associated with reduced protein kinase calpha expression. **J.Nutr.**, v. 133, n. 3, p. 695-699, 2003.

Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2008). **The State of Food Insecurity in the World 2008**. p.1-59.

GIACOMELLI, F. R. B.; MARÇAL-NATALI, M. R. A utilização de ratos em modelos em modelos experimentais de carências nutricionais. **Arq.Ciênc.Saúde Unipar**, v. 3, p. 239-249, 1999.

GRASSI, G.; GIANNATTASIO, C.; CLÉROUX, J. Cardiopulmonary reflex before and after regression of left ventricular hypertrophy in essential hypertension. **Hypertension**, v. 12, p. 227-237, 1988.

IRIGOYEN, M. C. C.; KRIEGER, E. M. Barorreflex control of sympathetic activity in experimental hypertension. **Braz.J Med.Biol.Res.**, v. 31, p. 1213-1220, 1998.

JACOB, H. J.; BARRES, C. P.; MACHADO, B. H.;BRODY, M. J. Studies on neural and humoral contributions to arterial pressure lability. **Am.J.Med.Sci.**, v. 31, p. 341-345, 1988.

KASHIHARA, K.; KAWADA, T.; YANAGIYA, Y.; UEMURA, K.; INAGAKI, M.; TAKAKI, H. et al. Bezold-Jarisch reflex attenuates dynamic gain of baroreflex neural arc. **Am J Physiol Heart Circ.Physiol**, v. 285, n. 2, p. H833-H840, 2003.

KIM, S. W.; YU, B. P.; SANDERFORD, M.;HERLIHY, J. T. Dietary restriction modulates the norepinephrine content and uptake of the heart and cardiac synaptosomes. **Proc.Soc.Exp.Biol.Med.**, v. 207, n. 1, p. 43-47, 1994.

KOIKE, H.; MARK, L. A.; HEISTAD, D. D.;SCHMID, G. P. Influence of cardiopulmonary vagal afferent activity on carotid chemoreceptor and baroreceptor reflexes in the dog. **Circulation Research**, v. 37, p. 422-429, 1975.

KRIEGER, E. M. Neurogenic hypertension in the rat. **Circ.Res.**, v. 15, p. 511-521, 1964.

KRIEGER, M. H.; MOREIRA, E. D.; OLIVEIRA, E. M.; OLIVEIRA, V. LL.; KRIEGER, E. M.;KRIEGER, J. E. Dissociation of blood pressure and sympathetic activation of renin release in sinoartical-denervated rats. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 33, p. 471-476, 2006.

LA ROVERE, M. T.; BIGGER JR, J. T.; MARCUS, F. I.; MORTARA, A.;SCHWARTZ, P. J. Baroreflex sensitivity and heart-rate variability in prediction of total cardiac mortality after myocardial infarction. ATRAMI (Autonomic Tone and Reflexes After Myocardial Infarction) Investigators. **Lancet**, v. 351, n. 9101, p. 478-484, 1998.

LACERDA, J. E. C.; CONSOLIM-COLOMBO, F. M.; MOREIRA, E. D.; IDA, F.; SILVA, G. J. J.; IRIGOYEN, M. C. et al. Influence of cardiopulmonary reflex on the sympathetic activity during myocardial infarction. **Autonomic Neuroscience:Basic and Clinical**, v. 133, p. 128-135, 2007.

LEAL, D. M.; CALLERA, J. C.; BONAGAMBA, L. G.; NOSJEAN, A.; LAGUZZI, R.;MACHADO, B. H. Microinjection of a 5-HT₃ receptor agonist into the NTS of awake rats inhibits the bradycardic response to activation of the von Bezold-Jarisch reflex. **BrainResearch**, v. 54, p. 7-11, 2000.

LEE, T. M.; KUO, J. S.;CHAI, C. Y. Central integrating mechanism of the Bezold-Jarisch and baroreceptor reflexes. **Am J Physiol**, v. 3, p. 713-720, 1972.

LEHNINGER.A. **Principles of Biochemistry**. Sarvier. 4^a ed. São Paulo: 2005.

- LEON-QUINTO, T.; MAGNAN, C.; PORTHA, B. Altered activity of the autonomous nervous system as a determinant of the impaired beta-cell secretory response after protein-energy restriction in the rat. **Endocrinology**, v. 139, n. 8, p. 3382-3389, 1998.
- LOSS, I. O.; FERNANDES, L. G.; MARTINS, C. D.; CARDOSO, L. M.; SILVA, M. E.; DIAS-DA-SILVA, V. J. et al. Baroreflex dysfunction in rats submitted to protein restriction. **Life Sci.**, v. 81, n. 11, p. 944-950, 2007.
- LUCAS, A. Programming by early nutrition: an experimental approach. **J.Nutr.**, v. 128, n. 2 Suppl, p. 401S-406S, 1998.
- LUCAS, S. R.; COSTA, S., V; MIRAGLIA, S. M.; ZALADEK, G. F. Functional and morphometric evaluation of offspring kidney after intrauterine undernutrition. **Pediatr.Nephrol.**, v. 11, n. 6, p. 719-723, 1997.
- LUKOYANOV, N. V.; ANDRADE, J. P. Behavioral effects of protein deprivation and rehabilitation in adult rats: relevance to morphological alterations in the hippocampal formation. **Behavioural Brain Research**, v. 112, n. 1-2, p. 85-97, 2000.
- MACHADO, B. H.; MAUAD, H.; CHIANCA JUNIOR, D. A.; HAIBARA, A. S.; COLOMBARI, E. Autonomic processing of the cardiovascular reflexes in the nucleus tractus solitarii. **Braz.J.Med.Biol.Res.**, v. 30, n. 4, p. 533-543, 1997.
- MANCIA, G.; DONALD, D. E.; SHEPHERD, J. T. Inhibition of adrenergic outflow to peripheral blood vessels by vagal afferents from the cardiopulmonary region in the dog. **Circ.Res.**, v. 33, n. 6, p. 713-721, 1973.
- Mark, E. & Dunlap, M. D. Cardiopulmonary baroreflexes. **Hypertension primer** A39, 123-125, 2008.
- MARTINEZ-MALDONADO, M.; BENABE, J. E.; WILCOX, J. N.; WANG, S.; LUO, C. Renal renin, angiotensinogen, and ANG I-converting-enzyme gene expression: influence of dietary protein. **Am.J.Physiol**, v. 264, n. 6 Pt 2, p. F981-F988, 1993.

- MARTINS, C. D. D. Avaliação do balanço autonômico cardíaco de ratos submetidos a uma dieta hipoprotéica. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto, 2007.
- MEYRELLES, S. S.; BERNARDES, C. F.; MODOLO, R. P.; MILL, J. G.; VASQUEZ, E. C. Bezold-Jarisch reflex in myocardial infarcted rats. **J Auton.Nerv.Syst.**, v. 63, n. 3, p. 144-152, 1997.
- MONTEIRO, F. M. F.; LAHLOU, S.; ALBUQUERQUE, J. A.; CABRAL, A. M. S. Influence of a multideficient diet from northeastern Brazil on resting blood pressure and baroreflex sensitivity in conscious, freely moving rats. **Braz.J.Med.Biol.Res.**, v. 34, p. 271-280, 2001.
- MORGANE, P. J.; MOKLER, D. J.; GALLER, J. R. Effects of prenatal protein malnutrition on the hippocampal formation. **Neurosci.Biobehav.Rev.**, v. 26, n. 4, p. 471-483, 2002.
- MORGANE, P. J.; USTIN-LAFRANCE, R.; BRONZINO, J.; TONKISS, J.; AZ-CINTRA, S.; CINTRA, L. et al. Prenatal malnutrition and development of the brain. **Neurosci.Biobehav.Rev.**, v. 17, n. 1, p. 91-128, 1993.
- OLIVEIRA, E. L.; CARDOSO, L. M.; PEDROSA, M. L.; SILVA, M. E.; DUN, N. J.; COLOMBARI, E. et al. A low protein diet causes an increase in the basal levels and variability of mean arterial pressure and heart rate in Fisher rats. **Nutr.Neurosci.**, v. 7, n. 4, p. 201-205, 2004.
- OLIVEIRA, V. L. L.; MOREIRA, E. D.; FARAH, V. M.; CONSOLIM-COLOMBO, F.; KRIEGER, E. M.; IRIGOYEN, M. C. Cardiopulmonary reflex impairment in experimental diabetes in rats. **Hypertension**, v. 34, p. 813-817, 1999.
- Organização das Nações Unidas (2006). Comitê Permanente de Nutrição-Catherini Bertini.
- OZAWA, S.; KAMIYA, H.; TSUZUKI, K. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. **Progress in neurobiology**, v. 54, p. 581-618, 1998.

- PEDROSA, M. L.; MORAES-SANTOS, T. Neuronal protein biosynthesis by neonatally malnourished and nutritionally recovered rats. **Braz.J.Med.Biol.Res.**, v. 20, n. 3-4, p. 331-338, 1987.
- PENITENTE, A. R.; FERNANDES, L. G.; CARDOSO, L. M.; SILVA, M. E.; PEDROSA, M. L.; SILVA, L. A. et al. Malnutrition enhances cardiovascular responses to chemoreflex activation in awake rats. **Life Sciences**, v. 81, p. 609-614, 2007.
- PERSSON, P. B.; EHMKE, H.; KIRCHEIM, H. R. Cardiopulmonary-arterial baroreceptor interaction in control of blood pressure. **Am J Physiol**, v. 4, n. 56, p. 59, 1989.
- PESQUISA NACIONAL DE DEMOGRAFIA E SAÚDE (2006). Saúde e estado nutricional de crianças menores de cinco anos. **Ministério da Saúde**. Acesso em <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/pnds/saude_nutricional.php> 15-04-2009.
- PIRES, J. G.; SILVA, S. R.; RAMAGE, A. G.; FUTURO-NETO, H. A. Evidence that 5-HT3 receptors in the nucleus tractus solitarius and other brainstem areas modulate the vagal bradycardia evoked by activation of the von Bezold-Jarisch reflex in the anesthetized rat. **Brain Res.**, v. 791, n. 1-2, p. 229-234, 1998.
- PLAGEMANN, A.; HARDER, T.; RAKE, A.; MELCHIOR, K.; ROHDE, W.; DORNER, G. Hypothalamic nuclei are malformed in weanling offspring of low protein malnourished rat dams. **J.Nutr.**, v. 130, n. 10, p. 2582-2589, 2000.
- RODRIGUES, F. A. Reposta pressora à microinjeção de L-glutamato no bulbo rostroventrolateral de ratos submetidos à desnutrição protéica. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto, 2008.
- SALO, L. M.; WOODS, R. L.; ANDERSON, C. R.; MCALLEN, R. M. Nonuniformity in the Bezold-Jarisch reflex. **Am J Physiol**, v. 293, p. R714-R720, 2007.
- SAWAYA, A. L.; DALLAL, G.; SOLYMOS, G.; DE SOUSA, M. H.; VENTURA, M. L.; ROBERTS, S. B. et al. Obesity and malnutrition in a Shantytown population in the city of Sao Paulo, Brazil. **Obes.Res.**, v. 3 Suppl 2, p. 107s-115s, 1995.

- SAWAYA, A. L.; MARTINS, P.; HOFFMAN, D.;ROBERTS, S. B. The link between childhood undernutrition and risk of chronic diseases in adulthood: a case study of Brazil. **Nutr.Rev.**, v. 61, n. 5 Pt 1, p. 168-175, 2003.
- SAWAYA, A. L.; ROBERTS, S. Stunting and future risk of obesity: principal physiological mechanisms. **Cad.Saude Publica**, v. 19 Suppl 1, p. S21-S28, 2003.
- SCHULTZ, H. D. Cardiac vagal chemosensory afferents. Function in pathophysiological states. **Ann NY Acad Sci**, v. 59, p. 59-73, 2001.
- SILVA, V. C.; ALMEIDA, S. S. Early protein malnutrition impairs social memory in adult rats. **Nutr.Rev.**, v. 19, p. 195-201, 2006.
- TAKAKURA, A. C. T.; MOREIRA, T. S.; LAITANO, S. C.; DE LUCA, Jr. L. A.; RENZI, A.;MENANI, V. J. Central muscarinic receptors signal pilocarpine-induced salivation. **J Dent Res**, v. 82, p. 993-997, 2003.
- TALMAN, W. T.; PERRONE, M. H.; REIS, D. J. Evidence for L-glutamate as the neurotransmitter of baroreceptor afferent nerve fibers. **Science**, v. 209, p. 813-815, 1980.
- THOREN, P. Role of cardiac C-fibers in cardiovascular Control. **Physiol Biochem.Pharmacol**, v. 86, p. 1-94, 1979.
- TIMMERS, H. J. L. M.; WIELING, W.; KAREMAKER, J. M.;LENDERS, J. W. M. Denervation of carotid baro-and chemoreceptor in humans. **J.Physiol**, v. 533.1, p. 3-11, 2003.
- TONKISS, J.; TRZCINSKA, M.; GALLER, J. R.; RUIZ-OPAZO, N.;HERRERA, V. L. Prenatal malnutrition-induced changes in blood pressure: dissociation of stress and nonstress responses using radiotelemetry. **Hypertension**, v. 32, n. 1, p. 108-114, 1998.
- TROPIA, F. C.; CARDOSO, L. M.; PEDROSA, M. L.; SILVA, M. E.; HAIBARA, A. S.; MORAES, M. F. et al. Effects of low-protein diet on the baroreflex and Bezold-Jarisch reflex in conscious rats. **Nutr.Neurosci.**, v. 4, n. 2, p. 99-107, 2001.

- UGERRE, T. A.; ABREU, G. R.; MOYSÉS, M. R.; CABRAL, A. M.;BISSOLI, N. S. Role of cardiac hypertrophy in reducing the sensitivity of cardiopulmonary reflex control of renal sympathetic nerve activity in spontaneously hypertensive rats. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 35, p. 1104-1108, 2008.
- UGERRE, T. A.; ABREU, G. R.; SAMPAIO, K. N.; CABRAL, A. M.;BISSOLI, N. S. The cardiopulmonary reflexes of spontaneously hypertensive rats are normalized after regression of ventricular hypertrophy and hypertension. **Braz.J Med.Biol.Res.**, v. 33, p. 589-594, 2000.
- VASQUEZ, E. C. Contribution of the cardiopulmonary reflex to the cardiovascular regulation in normal and pathophysiological states. **Braz.J Med.Biol.Res.**, v. 27, n. 4, p. 1049-1064, 1994.
- VEELKEN, R.; HILGERS, K. F.; LEONARD, M.; SCROGIN, K.; RUHE, J.; MANN, J. F. et al. A highly selective cardiorenal serotonergic 5-HT₃-mediated reflex in rats. **Am J Physiol**, v. 264, n. 6 Pt 2, p. H1871-H1877, 1993.
- VEELKEN, R.; LEONARD, M.; STETTER, A.; HILGERS, F. K.; MANN, J. F.; REEH, W. P. et al. Pulmonary serotonin 5-HT₃-sensitive afferent fibers modulate renal sympathetic nerve activity in rats. **Am J Physiol**, v. 41, p. H979-H986, 1997.
- VEELKEN, R.; STETTER, A.; DICKEL, T.;HILGERS, K. F. Bimodality of cardiac vagal afferent C-fibres in the rat. **Eur J Physiol**, v. 446, p. 516-522, 2003.
- VERBENE, A. J. M.; GUYENET, P. G. Medullary pathway of the Bezold-Jarisch reflex in the rat. **Am J Physiol Regul.Integr.Comp Physiol**, v. 263, p. R1195-R1202, 1992.
- WIDDOP, R. E.; VERBENE, A. J. M.; JARROTT, B.;LOUIS, W. J. Impaired arterial baroreceptor reflex and cardiopulmonary vagal reflex in conscious spontaneously hypertensive rats. **Hypertension**, v. 8, p. 269-275, 1990.
- World Health Organization (2007). Nutrition. Acesso em <<http://www.who.int/nutrition/em/>> 10-01-2009.

ZANCHETTI, A.; MANCIA, G. Cardiovascular reflexes and hypertension. **Hypertension**,
v. 18, p. III-13-III-21, 1991.

7 – APÊNDICE

Tabela 2 – Efeito da restrição proteica sobre o peso corporal (g) de ratos que receberam dieta controle (15% de proteína) e dieta hipoproteica (6% de proteína) 35 dias após o desmame.

CONTROLE		DESNUTRIDO	
ANIMAL	PESO (g)	ANIMAL	PESO (g)
1	224	1	88
2	200	2	82
3	184	3	90
4	194	4	70
5	205	5	65
6	200	6	70
7	195	7	81
8	200	8	70
9	196	9	93
10	210	10	83
11	185	11	83
12	196	12	83
13	210	13	88
14	200	14	71
15	196	15	90
16	185	16	69
17	234	17	75
18	230	18	88
19	227	19	85
20	226	20	81
21	216	21	75
22	230	22	74
Média± Er Pd	206,5±3,4	Média± Er Pd	79,7±1,8***

*** Diferença significativa comparado ao grupo controle; $P < 0,05$ (*test t de Student*).

Tabela 3 – Níveis basais de pressão arterial média (mmHg) dos grupos; controle e desnutrido intactos, controle e desnutrido desnervados.

Pressão arterial média (mmHg)				
Animal	Controle intacto	Desnutrido intacto	Controle DSA	Desnutrido DSA
1	110,58	104,00	157,00	100,00
2	115,00	107,00	123,32	101,00
3	105,00	115,00	112,61	108,21
4	110,00	100,00	108,85	113,39
5	105,00	102,00	122,00	100,00
6	101,00	103,00	128,00	102,00
7	107,00	103,00	147,00	110,00
8	112,42	113,39	152,00	113,94
Média± Er Pd	108,2±1,62	105,9±1,94	131,3±6,48*	106,1±2,12

* Diferença significativa comparado ao grupo controle intacto, desnutrido intacto e desnutrido DSA; $P < 0,05$ (*One way ANOVA* seguida do pós-teste de *Tukey*). DSA= desnervação sino-aórtica

Tabela 4 – Níveis basais de frequência cardíaca (bpm) dos grupos; controle e desnutrido intacto, controle e desnutrido desnervados.

Frequência cardíaca (bpm)				
Animal	Controle intacto	Desnutrido intacto	Controle DSA	Desnutrido DSA
1	398,54	462,00	454,00	387,10
2	361,06	520,00	436,57	321,81
3	375,00	492,00	385,00	356,10
4	400,00	380,32	496,00	347,00
5	372,00	408,68	480,00	402,00
6	348,00	403,65	530,50	440,00
7	360,00	423,66	460,087	384,00
8	396,83	467,50	483,97	467,32
Média± Er Pd	376,4±7,07	444,7±17,06[#]	465,8±15,34*	388,2±17,05

* Diferença significativa comparado ao grupo controle intacto, desnutrido intacto e desnutrido DSA. [#] Diferença significativa do grupo controle intacto; P<0,05 (*One way* ANOVA seguida do pós-teste de *Tukey*). DSA= desnervação sino-aórtica

Tabela 5 – Bradicardias (Δ FC) e hipotensões (Δ PAM) decorrentes da ativação do reflexo Bezold-Jarisch por fenilbiguanida em animais dos grupos controle intacto, desnutrido intacto, controle desnervado e desnutrido desnervado.

Grupo	Fenilbiguanida					
	1,25 μ g/Kg		2,5 μ g/Kg		5,0 μ g/Kg	
	Δ FC	Δ PAM	Δ FC	Δ PAM	Δ FC	Δ PAM
Controle intacto	-52,11	-16,94	-383,07	-60,70	-369,97	-78,21
Controle intacto	-169,77	-49,74	-195,52	-58,55	-201,80	-73,54
Controle intacto	-36,92	-33,57	-64,25	-32,37	-264,01	-45,08
Controle intacto	-170,47	-21,89	-295,30	-37,13	-316,09	-43,95
Controle intacto	-268,45	-40,92	-328,14	-66,36	-332,44	-56,60
Controle intacto	-346,37	-47,55	-354,10	-50,40	-378,60	-48,02
Controle intacto	-227,89	-23,41	-277,30	-45,91	-302,79	-56,30
Controle intacto	-309,94	-49,87	-362,45	-57,83	-372,60	-57,02
Média\pm Er Pd	-197,7\pm40*	-35,5\pm5	-282,6\pm4*	-51,2\pm4*	-317,3\pm2*	-57,3\pm5*$\&$
Desnutrido intacto	-55,85	-18,90	-134,55	-44,98	-398,70	-61,49
Desnutrido intacto	-176,55	-40,98	-402,83	-61,81	-344,07	-75,39
Desnutrido intacto	-133,08	-10,44	-450,64	-54,79	-464,55	-67,27
Desnutrido intacto	-308,82	-39,54	-314,61	-39,43	-326,94	-50,62
Desnutrido intacto	-337,51	-23,81	-379,30	-58,45	-385,96	-53,45
Desnutrido intacto	-317,94	-22,77	-322,16	-58,78	-326,02	-60,99
Desnutrido intacto	-328,77	-8,34	-317,98	-18,41	-363,52	-16,29
Desnutrido intacto	-316,51	-15,90	-312,48	-38,48	-364,11	-49,3041
Média\pm Er Pd	-246,9\pm4*	-22,6\pm4*	-329,3\pm3*	-46,9\pm5*	-371,7\pm16*	-54,4\pm6*$\&$
Controle DSA	-121,72	-16,94	-250,40	-51,47	-378,22	-62,70
Controle DSA	-279,09	-73,26	-327,46	-80,99	-392,07	-103,19
Controle DSA	-253,35	-58,15	-294,76	-69,94	-308,34	-72,53
Controle DSA	-386,91	-57,45	-422,05	-58,45	-460,54	-65,87
Controle DSA	-213,61	-21,50	-340,70	-25,12	-461,70	-79,61

Continuação na página seguinte

Grupo	Fenilbiguanida					
	1,25 µg/Kg		2,5 µg/Kg		5,0 µg/Kg	
	ΔFC	ΔPAM	ΔFC	ΔPAM	ΔFC	ΔPAM
Controle DSA	-252,30	-49,77	-278,93	-59,92	-397,73	-56,36
Controle DSA	-404,80	-91,10	-445,16	-100,46	-469,25	-100,29
Controle DSA	-348,70	-80,58	-418,00	-104,47	-442,05	-99,55
Média± Er Pd	-282,6±3*	-56,1±9*	-347,2±*	-68,9±9*	-413,7±20*	-80,0±7*#
Desnutrido DSA	-24,40	-33,22	-33,76	-28,36	-64,45	-37,23
Desnutrido DSA	-26,00	-30,91	-114,43	-27,90	-125,48	-37,95
Desnutrido DSA	-33,43	-14,62	-40,38	-22,92	-131,96	-24,62
Desnutrido DSA	-27,66	-2,99	-30,07	-6,26	-52,76	-29,75
Desnutrido DSA	-124,36	-7,14	-129,96	-6,57	-158,98	-13,48
Desnutrido DSA	-65,04	-8,36	-74,89	-14,84	-99,45	-24,19
Desnutrido DSA	-44,85	-21,79	-146,55	-51,63	-181,67	-69,31
Desnutrido DSA	-91,52	-35,36	-114,16	-44,15	-177,10	-57,58
Média± Er Pd	-54,66±13	-19,30±5	-85,52±16	-25,33±6	-123,98±17	-36,76±7

* = Diferente do desnutrido DSA, P< 0,001. &= diferente do grupo controle DSA, P< 0,05. # = diferente do controle intacto, P< 0,05 (*Two way ANOVA*, seguida pós teste de *Bonferroni*). PAM= pressão arterial média (mmHg), FC= frequência cardíaca (bpm) e DSA= desnervação sino-aórtica.

Tabela 6 – Valores de pressão arterial média sobre os valores de frequência cardíaca

Animal	Controle intacto			Desnutrido intacto		
	ΔPAM/ ΔFC			ΔPAM/ ΔFC		
	1,25 μg/Kg	2,5 μg/Kg	5,0 μg/Kg	1,25 μg/Kg	2,5 μg/Kg	5,0 μg/Kg
1	0,325	0,158	0,211	0,338	0,334	0,154
2	0,293	0,299	0,364	0,232	0,153	0,219
3	0,909	0,504	0,171	0,078	0,122	0,145
4	0,128	0,126	0,139	0,128	0,125	0,155
5	0,152	0,202	0,170	0,071	0,154	0,138
6	0,137	0,142	0,127	0,072	0,182	0,187
7	0,103	0,165	0,186	0,025	0,058	0,045
8	0,161	0,160	0,153	0,050	0,123	0,135
Média± Er Pd	0,28±0,09*	0,22±0,04	0,19±0,03	0,12±0,04*	0,16±0,03	0,15±0,02
Animal	Controle desnervado			Desnutrido desnervado		
	ΔPAM/ ΔFC			ΔPAM/ ΔFC		
	1,25 μg/Kg	2,5 μg/Kg	5,0 μg/Kg	1,25 μg/Kg	2,5 μg/Kg	5,0 μg/Kg
1	0,139	0,205	0,166	1,361	0,840	0,578
2	0,262	0,247	0,263	1,222	0,244	0,302
3	0,229	0,237	0,235	0,438	0,567	0,186
4	0,148	0,138	0,143	0,108	0,208	0,564
5	0,101	0,074	0,172	0,057	0,050	0,085
6	0,197	0,215	0,142	0,128	0,198	0,243
7	0,225	0,226	0,214	0,486	0,352	0,381
8	0,231	0,250	0,225	0,387	0,387	0,325
Média± Er Pd	0,19±0,02*	0,2±0,02	0,19±0,02	0,52±0,18	0,36±0,09	0,33±0,06

* = Diferente do desnutrido DSA, P< 0,05. (Two way ANOVA, seguida pós teste de *Bonferroni*). PAM= pressão arterial média (mmHg) e FC= frequência cardíaca (bpm).

Tabela 7 – Respostas hipotensoras e bradicárdicas a estimulação de fenilbiguanida antes e após bloqueio vagal com atropina

Animal	Controle			Desnutrido		
	ΔPAM					
	PBG	PBG B	PBG R	PBG	PBG B	PBG R
1	-46,96	-10,33	-46,25	-11,97	-7,51	-39,34
2	-30,43	-4,20	-28,25	-26,30	-4,38	-48,30
3	-49,82	-8,49	-23,75	-21,85	-5,59	-38,56
4	-32,75	-2,42	-24,84	-29,64	2,43	-45,19
5	-56,99	-5,17	-34,52	-34,14	-1,13	-54,57
6	-35,64	-2,80	-26,93	-73,53	-14,25	-15,68
Média± Er Pd	-42,10±4*	-5,57±1	-30,76±3*	-32,9±9*	-5,07±2	-40,27±5*

Animal	Controle			Desnutrido		
	ΔFC (bpm)					
	PBG	PBG B	PBG R	PBG	PBG B	PBG R
1	-291,64	0,73	-304,77	-107,90	-22,10	-231,72
2	-261,91	-2,19	-212,84	-195,03	73,52	-98,86
3	-299,51	2,92	-217,44	-103,05	-71,46	-103,28
4	-225,78	-12,99	-223,70	-322,80	-37,98	-336,96
5	-312,52	-10,80	-240,36	-317,79	9,50	-204,95
6	-175,64	-1,17	-211,46	-309,38	-5,76	-65,06
Média± Er Pd	-261,2±21*	-3,92±3	-235,1±15*	-226,0±43*	-9,05±20	-173,5±42*

* = Diferente de PBG B, $p < 0,05$ (*Two way ANOVA*, seguida pós teste de *Bonferroni*). PAM= pressão arterial média (mmHg), FC= frequência cardíaca (bpm), PBG= fenilbiguanida, PBG B= fenilbiguanida pós bloqueio com atropina e PBG R= fenilbiguanida 60 minutos pós bloqueio com atropina.

Tabela 8 – Respostas hipotensoras e bradicárdicas a estimulação de acetilcolina antes e após bloqueio vagal com atropina

Animal	Controle			Desnutrido		
	ΔPAM					
	Ach	Ach B	Ach R	Ach	Ach B	Ach R
1	-49,01	0,15	-35,48	-29,68	-6,87	-35,15
2	-34,97	-3,26	-35,72	-40,33	-14,30	-32,72
3	-58,75	8,92	-50,39	-42,27	1,18	-29,92
4	-43,79	-11,24	-43,90	-37,98	-1,49	-34,17
5	-47,79	-2,12	-41,93	-29,97	8,00	-37,78
6	-43,86	-13,18	-32,97	-60,01	-6,32	-34,99
Média± Er Pd	-46,36±3*	-3,45±3	-40±3*	-40±4,5*	-3,1±3	-34,11±1*

Animal	Controle			Desnutrido		
	ΔFC (bpm)					
	Ach	Ach B	Ach R	Ach	Ach B	Ach R
1	-27,63	-6,69	-10,17	-14,16	0,27	-54,18
2	-20,64	-4,21	-39,22	-30,20	-4,85	-25,68
3	-44,76	-12,2	-27,34	-11,45	5,93	-1,71
4	-6,35	4,32	-33,05	-30,81	0,61	-21,98
5	-26,24	2,86	-10,83	-33,06	-10,72	-41,38
6	-24,06	-2,51	-20,82	-42,95	0,26	-12,48
Média± Er Pd	-24,9±5*	-3,0±2,5	-23,6±5*	-27,1±5*	-1,4±2	-26,2±8*

* = Diferente de Ach B, $p < 0,05$ (*Two way* ANOVA, seguida pós teste de *Bonferroni*). PAM= pressão arterial média (mmHg), FC= frequência cardíaca (bpm), Ach = acetilcolina, Ach B= acetilcolina pós bloqueio com atropina e Ach R= acetilcolina 60 minutos pós bloqueio com atropina.

Tabela 9 – Níveis basais de FC e PAM dos grupos controle e desnutrido anestesiados

Animal	Controle		Desnutrido	
	FC basal (bpm)	PAM basal (mmHg)	FC basal (bpm)	PAM basal (mmHg)
1	344,00	97,00	444,00	88,18
2	333,00	86,00	417,93	102,18
3	361,00	99,40	490,83	106,16
4	339,00	85,00	481,26	107,34
5	389,00	99,00	543,26	94,53
6	396,00	98,00	489,00	112,91
Média ± Er Pd	360.3 ± 11	94.07 ± 3	477.7 ± 18***	101.9 ± 4

*** = diferente significativamente do grupo controle, $p < 0.0001$ (teste t-Student). PAM= pressão arterial média, FC= frequência cardíaca.

Tabela 10 – Bradicardias (Δ FC) e hipotensões (Δ PAM) decorrentes da ativação do reflexo Bezold-Jarisch por fenilbiguanida em animais anestesiados

	Fenilbiguanida					
	1,25 μ g/Kg		2,5 μ g/Kg		5,0 μ g/Kg	
Controle	Δ FC	Δ PAM	Δ FC	Δ PAM	Δ FC	Δ PAM
1	-287,52	-48,45	-285,07	-47,42	-277,14	-35,05
2	-116,95	-23,25	-181,18	-32,56	-270,60	-36,05
3	-118,33	-8,05	-164,78	-8,05	-124,80	-38,23
4	-85,03	-8,24	-122,09	-8,23	-177,85	-11,76
5	-88,50	-4,04	-118,10	-8,08	-294,01	-12,12
6	-61,52	-13,26	-49,95	-19,39	-195,97	-40,82
Média\pm Er Pd	-126,3\pm33	-17,55 \pm7	-153,5\pm32	-20,62 \pm7	-223,40\pm27	-29,0 \pm5

	Fenilbiguanida					
	1,25 μ g/Kg		2,5 μ g/Kg		5,0 μ g/Kg	
Desnutrido	Δ FC	Δ PAM	Δ FC	Δ PAM	Δ FC	Δ PAM
1	-314,16	-50,000	-378,29	-36,53846	-355,46	-40,38462
2	-118,56	-8,163265	-126,83	-11,22449	-133,33	-20,40816
3	-88,02	-10,37736	-240,43	-18,86792	-381,76	-30,18868
4	-100,6	-13,76147	-129,30	-6,422019	-152,50	-22,93578
5	-48,20	-11,2069	-80,50	-12,93103	-150,20	-13,7931
6	-23,09	-5,263158	-35,52	-7,017544	-155,59	-15,78947
Média\pm Er Pd	-115,4\pm42	-16,46\pm7	-165,1\pm50	-15,5\pm5	-221,47\pm47	-23,92\pm4

PAM= pressão arterial média, FC= frequência cardíaca.

Tabela 11 – Reatividade simpática para o nervo renal após estimulação do reflexo Bezold-Jarisch com fenilbiguanida

	Controle			Desnutrido		
	1,25 µg/Kg	2,5 µg/Kg	5,0 µg/Kg	1,25 µg/Kg	2,5 µg/Kg	5,0 µg/Kg
Animal	ΔASNR	ΔASNR	ΔASNR	ΔASNR	ΔASNR	ΔASNR
1	-62,15	-53,9	-65,50	-17,55	-11,32	-31,38
2	-88,17	-98,43	-95,13	-33,64	-31,39	-36,60
3	-38,65	-51,5	-63,26	-26,69	-21,46	-38,85
4	-50,00	-90,39	-100,00	-31,25	-24,33	-64,48
5	-80,20	-75,95	-82,44	-36,60	-63,14	-84,93
6	-95,91	-98,40	-99,61	-32,77	-71,88	-67,34
Média± Er Pd	-69,2±9	-78,1±9	-84,3±7	-29,75±3*	-37,2±10*	-53,9±9*

*= diferente do controle intacto nas doses de 1,25 µg/Kg, 2,5 µg/Kg e 5,0 µg/Kg , P< 0,05 (*Two way* ANOVA, seguida pós teste de *Bonferroni*). PAM= pressão arterial média, FC= frequência cardíaca e ASNR= atividade simpática para o nervo renal.

8 – PRODUÇÃO CIENTÍFICA

1. BEZERRA, V. M.; FERNANDES. L. G.; CHIANCA JUNIOR, D. A.; Avaliação da responsividade do reflexo Bezold-Jarisch em ratos desnutridos e submetidos à desnervação sino-aórtica. **In: Curso de Verão de Fisiologia FMRP-USP, 2007, Ribeirão Preto -SP. Apresentação em forma de pôster.**

2. BEZERRA, V. M.; CHIANCA JUNIOR, D. A.; FERNANDES. L. G.; Avaliação da responsividade do reflexo Bezold-Jarisch em ratos desnutridos e submetidos à desnervação sino-aórtica. **In: XI Simpósio Brasileiro de Fisiologia Cardiovascular, 2007, São Paulo-SP. Apresentação Oral.**

3. BEZERRA, V. M.; CHIANCA JUNIOR, D. A.; FERNANDES. L. G.; Avaliação da responsividade do reflexo Bezold-Jarisch em ratos desnutridos e submetidos à desnervação sino-aórtica. **In: XXII Reunião anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental- FeSBE, 2007, Águas de Lindóia-SP. Apresentação em forma de Pôster.**

4. BEZERRA, V. M.; CHIANCA JUNIOR, D. A.; FERNANDES. L. G.; Avaliação da responsividade do reflexo Bezold-Jarisch em ratos desnutridos e submetidos à desnervação sino-aórtica. **In: XV seminário de iniciação científica da UFOP, 2007. Apresentação Oral.**

5. BEZERRA, V. M.; CHIANCA JUNIOR, D. A.; FERNANDES. L. G.; Avaliação da responsividade do reflexo Bezold-Jarisch em ratos desnutridos e submetidos à desnervação sino-aórtica. **PRÊMIO DE MELHOR TRABALHO, XV seminário de iniciação científica da UFOP, 2007.**

6. BEZERRA, V. M.; SOUZA, A. M. A; CHIANCA JUNIOR, D. A.; FERNANDES. L. G.; Avaliação da responsividade do reflexo Bezold-Jarisch em ratos desnutridos e submetidos à desnervação sino-aórtica. **In: XVI seminário de iniciação científica da UFOP, 2008. Apresentação Oral.**

7. BEZERRA, V. M.; CHIANCA JUNIOR, D. A.; FERNANDES. L. G.; CARDOSO, M. L.; Avaliação da responsividade do reflexo Bezold-Jarisch em ratos desnutridos e submetidos à desnervação sino-aórtica. **In: XIII Simpósio Brasileiro de Fisiologia Cardiovascular, 2009, Ouro Preto-MG. Apresentação Oral.**

