

# Modulação Serotoninérgica de Respostas Cardiovasculares Basais e Induzidas pela Expansão Isotônica do Volume Extracelular em Ratos

*Serotonergic Modulation of Basal Cardiovascular Responses and Responses Induced by Isotonic Extracellular Volume Expansion in Rats*

Isadora Ferraz Semionatto,<sup>1</sup> Adrieli Oliveira Raminelli,<sup>1</sup> Angelica Cristina Alves,<sup>1</sup> Caroline Santos Capitelli,<sup>1</sup> Rosângela Soares Chriguer<sup>2</sup>

Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM),<sup>1</sup> Uberaba, MG; Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP),<sup>2</sup> São Paulo, SP - Brasil

## Resumo

**Fundamento:** Expansão de volume extracelular (EVEC) promove alterações da atividade simpática e parassimpática no coração e vasos sanguíneos, os quais podem ser moduladas por vias serotoninérgicas.

**Objetivo:** Avaliar o efeito da administração de salina ou agonista serotoninérgico (DOI) nos núcleos paraventriculares hipotalâmico (NPV) sobre respostas cardiovasculares após EVEC.

**Métodos:** Foram obtidos registros da pressão arterial pulsátil, por meio da artéria femoral, para obtenção dos valores da pressão arterial média (PAM), sistólica (PAS), diastólica (PAD), frequência cardíaca (FC) e razão simpático-vagal (LF/HF) de ratos Wistar antes e após receberem microinjeções bilaterais no NPV de salina ou DOI seguida de EVEC.

**Resultados:** Não foram observadas diferenças significativas dos valores das variáveis estudadas nos diferentes tratamentos do grupo controle. Entretanto, quando os animais são tratados com DOI seguida de EVEC ocorre aumento significativo em relação ao grupo controle com EVEC em todas as variáveis estudadas: PAM ( $114,42 \pm 7,85$  vs  $101,34 \pm 9,17$ ), PAS ( $147,23 \pm 14,31$  vs  $129,39 \pm 10,70$ ), PAD ( $98,01 \pm 4,91$  vs  $87,31 \pm 8,61$ ), FC ( $421,02 \pm 43,32$  vs  $356,35 \pm 41,99$ ) e LF/HF ( $2,32 \pm 0,80$  vs  $0,27 \pm 0,32$ ).

**Discussão:** O presente estudo mostrou que a indução de EVEC isotônica não promoveu alterações na PAM, PAD, PAS, FC e LF/HF. Por outro lado, os animais que receberam microinjeção de DOI no NPV seguida de EVEC apresentaram aumento significativo de todas as variáveis.

**Conclusão:** Esses resultados sugerem que a serotonina exerce uma neuromodulação em nível do NPV, e essa promove uma inibição da resposta barorreflexa frente à EVEC. Assim, o presente trabalho sugere o envolvimento serotoninérgico na neuromodulação no nível do NPV na resposta reflexa vagal em ratos normotensos. (Arq Bras Cardiol. 2017; 108(2):154-160)

**Palavras-chave:** Serotoninérgicos; Serotonina; Ratos; Núcleo Paraventricular do Hipotálamo; Pressão Arterial; Líquido Extracelular.

## Abstract

**Background:** Isotonic blood volume expansion (BVE) induced alterations of sympathetic and parasympathetic activity in the heart and blood vessels, which can be modulated by serotonergic pathways.

**Objective:** To evaluate the effect of saline or serotonergic agonist (DOI) administration in the hypothalamic paraventricular nucleus (PVN) on cardiovascular responses after BVE.

**Methods:** We recorded pulsatile blood pressure through the femoral artery to obtain the mean arterial pressure (MAP), systolic (SBP) and diastolic blood pressure (DBP), heart rate (HR) and the sympathetic-vagal ratio (LF/HF) of Wistar rats before and after they received bilateral microinjections of saline or DOI into the PVN, followed by BVE.

**Results:** No significant differences were observed in the values of the studied variables in the different treatments from the control group. However, when animals are treated with DOI followed by BVE there is a significant increase in relation to the BE control group in all the studied variables: MBP ( $114.42 \pm 7.85$  vs  $101.34 \pm 9.17$ ); SBP ( $147.23 \pm 14.31$  vs  $129.39 \pm 10.70$ ); DBP ( $98.01 \pm 4.91$  vs  $87.31 \pm 8.61$ ); HR ( $421.02 \pm 43.32$  vs  $356.35 \pm 41.99$ ); and LF/HF ratio ( $2.32 \pm 0.80$  vs  $0.27 \pm 0.32$ ).

**Discussion:** The present study showed that the induction of isotonic BVE did not promote alterations in MAP, HR and LF/HF ratio. On the other hand, the injection of DOI into PVN of the hypothalamus followed by isotonic BVE resulted in a significant increase of all variables.

**Conclusion:** These results suggest that serotonin induced a neuromodulation in the PVN level, which promotes an inhibition of the baroreflex response to BVE. Therefore, the present study suggests the involvement of the serotonergic system in the modulation of vagal reflex response at PVN in the normotensive rats. (Arq Bras Cardiol. 2017; 108(2):154-160)

**Keywords:** Serotonin; Serotonin Agents; Rats; Midline Thalamic Nuclei; Arterial Pressure; Extracellular Fluid.

Full texts in English - <http://www.arquivosonline.com.br>

Correspondência: Rosângela Soares Chriguer •

Rua Silva Jardim, 136. CEP 11015-020, Vila Mathias, Santos, SP – Brasil

E-mail: rochriguer@hotmail.com

Artigo recebido em 16/06/16, revisado em 28/07/16, aceito em 19/09/16.

DOI: 10.5935/abc.20160205

## Introdução

A expansão de volume extracelular (EVEC) induz a ativação de várias áreas cerebrais importantes nos ajustes cardiovasculares e neuroendócrinos.<sup>1,2</sup> A EVEC ativa o barorreflexo, o qual promove hipotensão e bradicardia através da excitação de duas vias neurais. A hipotensão envolve projeções excitatórias do núcleo do trato solitário (NTS) para a área ventrolateral caudal da medula oblonga, e quando ativada, promove inibição da área ventrolateral rostral da medula oblonga, via simpato-inibitória, a qual resulta na diminuição do tônus simpático para o coração, redução da resistência periférica total e aumento da capacitância venosa. A bradicardia envolve uma projeção excitatória do NTS para os neurônios pré-ganglionares parassimpáticos no núcleo motor dorsal do vago e núcleo ambíguo, resultando em aumento de eferentes vagais para o coração.<sup>3,4</sup>

A EVEC também promove aumento das concentrações plasmáticas de ocitocina (OT), sintetizada principalmente nos núcleos paraventriculares (NPV) e supraóptico do hipotálamo (NSO).<sup>4</sup> Evidências de que a OT age como um importante neuromodulador do controle autônomo da circulação surgiram a partir de estudos nos quais foram observadas projeções do NPV para o NTS, que foi reforçada pela observação de que manipulações no sistema ocitocinérgico do NPV resultavam em profundas alterações das respostas cardiovasculares em relação a estímulos estressores e peptidérgicos.<sup>5-8</sup>

A participação de mecanismos serotoninérgicos (5-HT) nas respostas do NPV também tem sido estudada, principalmente sobre a ação de 5-HT em receptores 5-HT<sub>1A</sub> e 5-HT<sub>2A</sub>. Autores demonstraram a presença de receptores 5-HT<sub>1A</sub> e 5-HT<sub>2A</sub> e seus respectivos RNAm no NPV. Adicionalmente, verificou-se a co-expressão de receptores 5-HT<sub>1A</sub> e 5-HT<sub>2A</sub> nas regiões do NPV, e uma sub-população desses neurônios apresentou dupla marcação, 5-HT<sub>2A</sub>/OT, demonstrando evidência da participação de 5-HT na ativação desses receptores no NPV.<sup>9,10</sup> Aferências do núcleo dorsal da rafe para regiões do NPV e significativa densidade de receptores 5-HT nesses núcleos hipotalâmicos têm sido descritas por vários autores e esses resultados evidenciam que respostas neuroendócrinas frente à alteração de volume podem ser moduladas por 5-HT ativando receptores 5-HT<sub>1A</sub> e/ou 5-HT<sub>2A</sub> no NPV.<sup>11,12</sup>

Com base nas evidências neuro-anatômicas de projeções ocitocinérgicas do NPV para o NTS e em trabalhos que têm demonstrado a neuromodulação da serotonina sobre a secreção de OT, estando esta aumentada durante a EVEC isotônica, objetivamos avaliar a neuromodulação serotoninérgica, sobre receptores 5-HT<sub>2</sub>, nas respostas cardiovasculares do NPV em condições basais ou induzidas por EVEC.

## Métodos

### Animais

Treze Ratos Wistar machos pesando 250-300g no início dos experimentos foram obtidos e mantidos no Biotério da Disciplina de Fisiologia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM), aclimatados à temperatura ambiental controlada (23 ± 2°C), em regime de luz com ciclo claro-

escuro de 12h (luz 7:00-19:00 h) com ração e água "ad libitum". Esses animais foram divididos em dois grupos: Controle (N=8) e DOI (N=5). Todos os experimentos foram realizados entre 8:00 e 13:00 h. Todos os experimentos foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA/UFTM) sob o número de protocolo 273.

### Habituação dos animais aos procedimentos experimentais

Para diminuir a influência de fatores que promovam o estresse no momento dos experimentos, os ratos foram diariamente manipulados e treinados, durante sete dias, com as manobras utilizadas no protocolo experimental tais como: limpeza da cânula e leve massagem na região supra-púbica por pelo menos uma semana antes do experimento.

### Protocolo experimental

#### Cânulas no NPV

Os ratos foram anestesiados com tribromoetanol (150 mg/kg) e fixados a um aparelho estereotáxico (Insight Equipamentos – modelo ETX3/99, SP, Brasil). Dois pontos antropométricos do crânio - o bregma (ponto de união das suturas sagital e coronal) e o lâmbda (ponto de união das suturas sagital e lambdóide) - foram utilizados como referência para nivelar a cabeça dos animais no plano horizontal. Utilizando-se o bregma, foram determinados os pontos de introdução das cânulas bilateralmente no NPV dos ratos. Nesses pontos, foram feitas trepanações dos ossos do crânio com uma broca esférica, abrindo-se dois orifícios de aproximadamente 1,5 mm de diâmetro. No NPV, cânulas de aço inoxidável (12 x 0,55 mm d.i) foram posicionadas bilateralmente no cérebro conforme as coordenadas: 1,2 mm caudal ao bregma, 0,5 mm lateral à linha mediana e 5,0 mm abaixo da dura-máter de acordo com as coordenadas do Atlas de Paxinos e Watson.<sup>13</sup> As cânulas foram posicionadas 2 mm acima do NPV e fixadas ao crânio usando-se parafusos e resina acrílica dental. Mandris metálicos (0,3 mm d.i) foram utilizados para obliteração das cânulas. Os ratos receberam injeções profiláticas de penicilina (20.000 unidades, intramuscular). Durante os seis dias de recuperação dos animais, previamente à canulação das veias e artéria femorais, os ratos foram manipulados e treinados diariamente para o procedimento e limpeza do mandril visando reduzir as possíveis influências de respostas estressoras decorrentes da manipulação animal.

#### Canulação da artéria e veia femorais

Para o registro cardiovascular dos animais acordados, no dia que antecedeu ao experimento, os animais foram submetidos à anestesia com tribromoetanol (150 mg/kg) para implantação de cateteres de polietileno (PE-50 e PE-10) na aorta abdominal através da artéria femoral, para registro da PA e na veia femoral para a realização da EVEC. Após o implante, as cânulas foram devidamente preenchidas com solução fisiológica e exteriorizadas subcutaneamente na região posterior do pescoço. Antes do início dos registros, as cânulas foram heparinizadas (heparina 2% em solução fisiológica) para evitar a formação de coágulos.

### Registros cardiovasculares

Após 24 horas de recuperação cirúrgica, as cânulas foram lavadas com solução de salina heparinizada (0,1 mL de heparina sódica 25000UI, Liqueimine®, Roche, RJ, Brasil, dissolvida em 20 mL de salina 0,9 %). O cateter arterial foi conectado a um transdutor de PA (P23Db, Gould-Statham), e os sinais da PA pulsátil foram gravados em condições basais por um período de trinta minutos, e o sinal foi convertido por placa análogo-digital (CODAS, com frequência de amostragem – 4-kHz, Di220 Dataq Instruments, Inc., Akron, OH, USA). Durante o procedimento experimental, a PAM e a FC foram derivadas da PA pulsátil. Durante o registro, os animais permaneceram em uma sala, com controle de ruído, a uma temperatura de 27°C. Após o posicionamento dos animais e conexão ao equipamento, eles passaram por um período de adaptação de 15 minutos para, em seguida, realizarem os registros. Após o período de adaptação do animal e adequação da captação do sinal, iniciou-se o registro contínuo da PA pulsátil por 30 minutos para obtenção dos valores basais da PA e FC.

### Microinjeções de salina ou fármaco no cérebro

Trinta minutos após o início dos registros, salina (1,0 µg/200 µL; n=8 animais) ou agonista hidrocloreto de dimetoxi-4-iodoanfetamina (DOI - 1,0 µg/200 µL; n=5 animais) serotonérgico (5-HT<sub>2</sub>) dissolvidos em solução salina fisiológica foram injetados bilateralmente no NPV dos ratos utilizando-se uma seringa Hamilton (5 µL) conectada por um tubo de polietileno PE-10 a uma agulha injetora introduzida no cérebro pela cânula guia previamente fixada ao cérebro. A cânula injetora (0,3 mm d.i.) era 2,0 mm mais longa do que a cânula guia. Durante e após as microinjeções intracerebroventriculares, os registros dos animais foram realizados em um período de trinta minutos.

### Expansão de volume extracelular (EVEC)

Sessenta minutos após o início dos registros, os animais foram submetidos ou não à EVEC realizada por meio da infusão intravenosa (veia femoral) de solução de NaCl isotônica (0,15 M) em volume de 2 ml/100 g de peso corporal

durante 60 segundos. Durante e após a EVEC, os registros dos animais foram realizados em um período de quinze minutos.

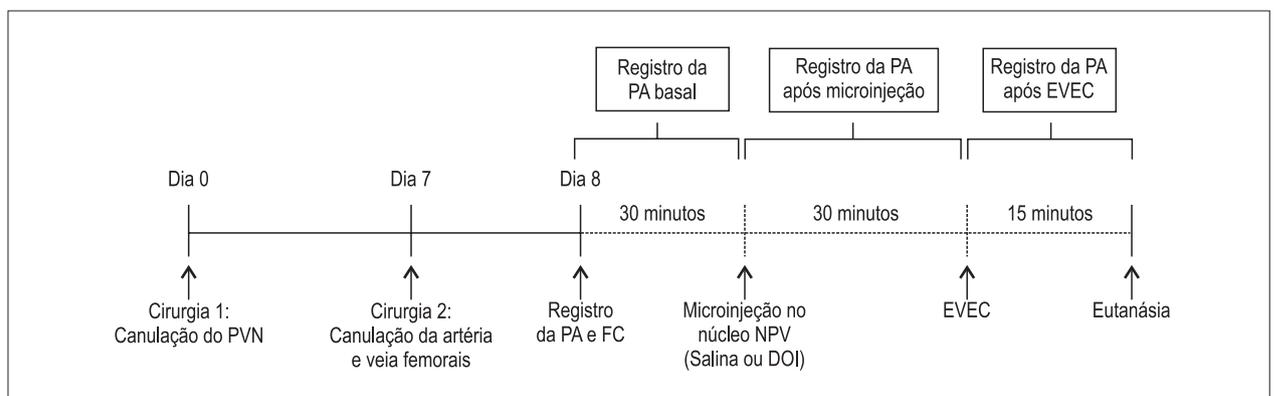
### Registro da PA pulsátil

No dia do experimento, entre oito e nove da manhã, os animais foram pesados e a cânula arterial conectada a um transdutor de pressão; a PA pulsátil basal foi registrada durante 30 minutos. Decorrido esse período, os animais receberam microinjeções no NPV de DOI (1,0 µg/200 µL; n=5 animais) ou mesmo volume de veículo (salina isotônica; n=8 animais). Após 30 minutos, os animais foram submetidos à EVEC isotônica (NaCl 0,15 M; 2 ml/100 g de peso), e a pressão foi continuamente registrada por mais 15 minutos (Figura 1). Concluídos setenta e cinco minutos de registro, os animais foram eutanasiados com tiopental sódico (100 mg/Kg), e o cérebro de cada um removido e fixado em formalina 10% por alguns dias. Cortes transversais (40 µm de espessura) foram realizados nos pontos de injeção do NPV com o auxílio de um micrótomo de congelamento (MICROM, modelo HM 5000 M). Os cortes histológicos, montados em lâminas, foram corados pelo Método Nissl e analisados quanto aos pontos das injeções no NPV de acordo com o Atlas de Paxinos e Watson.<sup>13</sup>

### Estudo da variabilidade da PA e da FC

A PA pulsátil foi processada por um software específico que determina, batimento-a-batimento, valores da PAS e FC. A variabilidade da FC, PAS e PAD foi também avaliada no domínio da frequência, empregando-se o método de análise espectral autorregressivo.<sup>14,15</sup>

Séries temporais de Intervalos de Pulso, PAS e PAD, coletadas durante os 30 minutos basais, foram divididas em segmentos seriados de 300 batimentos, sendo que todo segmento sucessivo sobreponha-se em 50% ao segmento anterior (método de Welch). Usando-se segmentos estacionários das séries temporais, parâmetros autorregressivos foram estimados por meio do método de Levinson-Durbin, e a ordem do modelo foi escolhida de acordo com o critério de Akaike.<sup>15</sup> Em seguida, sobre cada segmento estacionário individual de 300 batimentos, a decomposição espectral foi realizada. A normalização dos valores minimiza a interferência



**Figura 1** – Esquema representativo dos sete dias do protocolo experimental dos grupos Controle e Agonista Serotonérgico (DOI). NPV, núcleos paraventriculares do hipotálamo; PA, PA pulsátil; FC, FC EVEC, expansão de volume extracelular com salina isotônica.

da potência total sobre os componentes, o procedimento de normalização foi realizado pela divisão da potência do componente de baixa frequência (low frequency – LF; 0,15-0,4 Hz) ou de alta frequência (high frequency – HF; 0,4–0,15 Hz) pela potência espectral total, da qual se subtraiu a potência da banda de muito baixa frequência (very low frequency – VLF, 0,01-0,20 Hz) multiplicando-se o resultado por 100.<sup>15</sup> Os parâmetros espectrais obtidos para cada segmento estacionário individual de 300 batimentos foram medidos, e valores médios resultantes para os 30 minutos basais foram coletados para cada animal. O quociente entre LF e HF (razão LF/HF) foi utilizado para expressar o balanço simpato-vagal.<sup>16</sup>

### Análise estatística

A análise estatística foi realizada pelo software R versão 3.3.0. Os resultados obtidos foram apresentados como média  $\pm$  desvio padrão da média. Para confirmar que todas as variáveis contínuas eram normalmente distribuídas, utilizamos o teste de Kolmogorov- Smirnov e, posteriormente, para avaliar o efeito dos grupos e avaliações em relação às variáveis PAS, PAD, PAM, FC e LF/HF, foi empregado o modelo de análise de variância (ANOVA) de duas vias com medidas e o método de comparações múltiplas de Bonferroni. O nível de significância estatística adotado foi de 5%.

### Resultados

A Tabela 1 apresenta os resultados (média  $\pm$  desvio padrão da média) das variáveis cardiovascular dos animais do grupo controle (C) e do grupo DOI (D). Não foram observadas diferenças significantes no grupo controle entre os valores obtidos no período basal (Cb), após microinjeção com salina (Cm) e esta seguida de EVEC isotônica (Ce) em todas as variáveis investigadas. Os animais do grupo DOI basal (Db) não apresentaram diferença significativa em relação aos animais do grupo controle após microinjeção com salina (Cm) e esta seguida da EVEC isotônica (Ce) nas variáveis PAM, PAS, PAD. A microinjeção de DOI (Dm) e esta seguida de EVEC (De) promoveu aumento significativo na LF/HF em relação ao mesmo grupo em condições basais

(Db) ( $2,45 \pm 0,82$  vs  $0,67 \pm 0,68$  e  $2,45 \pm 0,82$  vs  $0,67 \pm 0,68$ , respectivamente). A microinjeção de DOI seguida de EVEC (De) aumentou, significativamente, a PAM (Figura 2), PAS e PAD em relação ao grupo controle (Ce) ( $114,42 \pm 7,85$  vs  $101,34 \pm 9,17$ ;  $147,23 \pm 14,31$  vs  $129,39 \pm 10,70$  e  $98,01 \pm 4,91$  vs  $87,31 \pm 8,61$ , respectivamente).

Os animais do grupo controle apresentaram diferença significativa nos valores da FC basal (Cb), com microinjeção de salina (Cm) e esta seguida de EVEC, em relação ao Grupo DOI com os mesmos tratamentos (Db, Dm e De) ( $354,14 \pm 29,53$  vs  $399,40 \pm 25,09$ ;  $356,14 \pm 32,09$  vs  $405,08 \pm 41,09$  e  $356,35 \pm 41,99$  vs  $421,02 \pm 43,32$ , respectivamente). A microinjeção de DOI (Dm), e esta seguida de EVEC (De), aumentou a relação LF/HF em relação aos animais controles que receberam microinjeção de salina (Cm) e esta seguida de EVEC isotônica (Ce) ( $2,45 \pm 0,82$  vs  $0,55 \pm 0,22$  e  $2,32 \pm 0,80$  vs  $0,27 \pm 0,32$ , respectivamente).

Todos os valores de p obtidos das análises estatísticas das variáveis estudadas estão apresentados na Tabela 2.

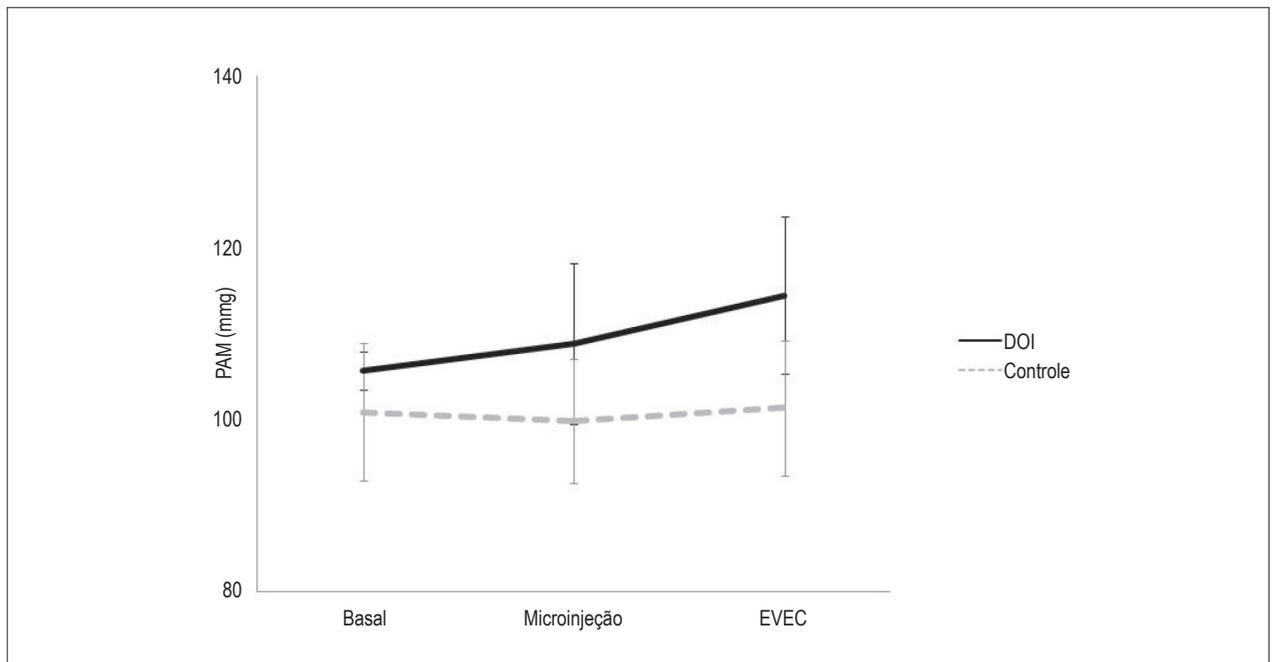
### Discussão

Nosso estudo mostrou que a EVEC isotônica não promoveu alteração nas pressões PAM, PAS e PAD, como também na FC e relação simpático-vagal (LF/HF). Como mostrado anteriormente por outros autores, a EVEC aguda induz uma série de eventos hemodinâmicos, incluindo um aumento na pressão venosa central, pressão atrial direita, volume sanguíneo central e periférico, débito cardíaco e volume sistólico. Por outro lado, a FC diminui acentuadamente, e a resistência periférica total diminui ligeiramente durante a sobrecarga de volume, enquanto a PAM não se altera.<sup>17</sup> Esses achados contradizem Godino et al., 2005, que realizaram EVEC por infusão de um grande volume intra atrial por um minuto e observaram não só uma redução na FC como também na PAM. Essa hipotensão pode ser mediada por uma rápida e pronunciada liberação de ocitocina e do peptídeo natriurético atrial que possuem efeito diurético e vasodilatador.<sup>18</sup> Adicionalmente, esses peptídeos estão envolvidos no controle barorreflexo da FC facilitando a resposta vagal no aumento da bradicardia reflexa durante a descarga dos barorreceptores.<sup>19-23</sup>

**Tabela 1 - Valores médios ( $\pm$  desvio padrão da média) das pressões arteriais média (PAM), sistólica (PAS) e diastólica (PAD), frequência cardíaca (FC), componente de baixa frequência (LF) e componente de alta frequência (HF) dos animais dos grupos controle basal (Cb), controle após microinjeção de salina nos núcleos paraventriculares do hipotálamo (Cm), controle após expansão de volume extracelular (Ce) e dos tratados com DOI, no estado basal (Db), após microinjeção de DOI nos núcleos paraventriculares do hipotálamo (Dm) e posterior à expansão do volume extracelular (De)**

Variáveis	Cb	Cm	Ce	Db	Dm	De
PAM (mmHg)	100,83 $\pm$ 7,98	99,79 $\pm$ 7,24	101,34 $\pm$ 9,17	105,65 $\pm$ 2,25	108,79 $\pm$ 9,31	114,42 $\pm$ 7,85 <sup>#</sup>
PAS (mmHg)	130,28 $\pm$ 7,62	129,66 $\pm$ 6,49	129,39 $\pm$ 10,70	136,05 $\pm$ 2,74	141,11 $\pm$ 14,95	147,23 $\pm$ 14,31 <sup>#</sup>
PAD (mmHg)	86,10 $\pm$ 8,53	84,86 $\pm$ 7,97	87,31 $\pm$ 8,61	90,46 $\pm$ 3,63	92,63 $\pm$ 6,50	98,01 $\pm$ 4,91 <sup>#</sup>
FC (bpm)	354,14 $\pm$ 29,53	356,14 $\pm$ 32,09	356,35 $\pm$ 41,99	399,40 $\pm$ 25,09 <sup>s</sup>	405,08 $\pm$ 41,09 <sup>e</sup>	421,02 $\pm$ 43,32 <sup>s</sup>
Razão LF/HF	0,36 $\pm$ 0,20	0,55 $\pm$ 0,22	0,27 $\pm$ 0,32	0,67 $\pm$ 0,68	2,45 $\pm$ 0,82 <sup>**</sup>	2,32 $\pm$ 0,80 <sup>##</sup>

<sup>#</sup>p=0,018 vs PAM Ce; <sup>1</sup>p=0,016 vs PAM Db; <sup>4</sup>p=0,010 vs PAS Ce; <sup>5</sup>p=0,035 vs PAS Db; <sup>6</sup>p=0,047 vs PAD Ce; <sup>7</sup>p=0,022 vs PAD Db; <sup>8</sup>p=0,034 vs FC Cb; <sup>9</sup>p=0,033 vs FC Cm; <sup>10</sup>p=0,010 vs FC Ce; <sup>11</sup>p=0,001 vs razão LF/HF Cm e Db; <sup>12</sup>p=0,001 vs LF/HF Ce e Db.



**Figura 2** – Valores médios ( $\pm$  desvio padrão da média) da pressão arterial média (PAM) dos animais dos grupos controle basal (Cb), controle após microinjeção de salina (Cm), controle após expansão de volume extracelular (Ce) e dos tratados com DOI, no estado basal (Db), após microinjeção de DOI (Dm), e posterior à expansão do volume extracelular (De). <sup>#</sup> $p=0,018$  vs PAM Ce; <sup>†</sup> $p=0,016$  vs PAM Db.

**Tabela 2** – Valores de p obtidos após comparações entre os grupos Controle (n=8) e DOI (dimetoxi-4-iodoanfetamina) (n=5) das variáveis estudadas: pressões arteriais média (PAM), sistólica (PAS) e diastólica (PAD), frequência cardíaca (FC), componente de baixa frequência (LF) e componente de alta frequência (HF) dos animais dos grupos controle basal (Cb), controle após microinjeção de salina nos núcleos paraventriculares do hipotálamo (Cm), controle após expansão de volume extracelular (Ce) e dos tratados com DOI, no estado basal (Db), após microinjeção de DOI nos núcleos paraventriculares do hipotálamo (Dm) e posterior à expansão do volume extracelular (De). Análise da Variância com medidas repetidas e método de comparações múltiplas de Bonferroni foram empregados no estudo. Nível de significância foi fixado em  $p<0,05$

Comparações	PAM	PAS	PAD	FC	LF/HF
Cb vs Cm	0,827	0,937	0,568	0,987	0,704
Cb vs Ce	0,828	0,930	0,568	0,988	0,755
Cm vs Ce	0,820	0,934	0,560	0,980	0,704
Db vs Dm	0,293	0,234	0,418	0,730	0,001
Db vs De	0,016	0,035	0,022	0,503	0,001
Dm vs De	0,096	0,230	0,075	0,500	0,711
Cb vs Db	0,287	0,316	0,308	0,034	0,290
Cm vs Dm	0,077	0,076	0,110	0,033	0,001
Ce vs De	0,018	0,010	0,047	0,010	0,001

No presente trabalho, os animais que receberam microinjeção intracerebroventricular do agonista serotoninérgico DOI no NPV seguida de EVEC, apresentaram aumento significativo da PAM, PAS, PAD, FC e LF/HF, sugerindo que o agonista serotoninérgico DOI leva à inibição da secreção de OT frente à EVEC quando microinjetado bilateralmente no NPV, ou mesmo que exerça uma neuromodulação no nível do NPV, e esta promova uma inibição na resposta barorreflexa frente à EVEC.

A administração intravenosa de 8-OHDPAT (agonista de receptor 5-HT<sub>1A</sub>) ou de DOI (agonista de receptor 5-HT<sub>2A</sub>) promove aumento das concentrações plasmáticas de OT. Ambas as respostas são significativamente atenuadas quando os animais recebem pré-tratamento intravenoso com antagonistas desses mesmos receptores, sugerindo que esse aumento ocorre por ativação serotoninérgica desses receptores em vez da estimulação por interneurônios.<sup>11,12,24,25</sup> A estimulação de receptores 5-HT<sub>2A</sub> no sistema nervoso

central pode induzir a um aumento da PA, em parte pelo aumento da atividade simpática vasoconstritora decorrente da ativação de neurônios pré-motores simpáticos na medula oblonga ventrolateral rostral, e também pela libertação de vasopressina.<sup>26</sup>

O NPV é reciprocamente conectado a várias outras áreas cerebrais envolvidas no controle da função cardiovascular.<sup>27</sup> O NPV também contém neurônios pré-autonômicos, que projetam para neurônios pré-ganglionares simpáticos dentro da coluna celular intermediolateral da medula espinhal, ambos, direta e indiretamente, via medula oblonga ventrolateral rostral.<sup>28</sup>

Diversos estudos precedentes têm relatado a contribuição de neurônios parvocelulares do NPV na resposta autonômica compensatória durante o treinamento físico para a sobrecarga de volume, sugerindo que a sobrecarga de volume causa estimulação de receptores cardíacos vagais, principalmente pela ativação de neurônios parvocelulares no NPV que, sucessivamente, induz a inibição da atividade nervosa simpática.<sup>29-35</sup> Vários trabalhos têm sugerido que o aumento da atividade de neurônios no NPV está associado à excitação simpática durante o colapso cardíaco.<sup>36-38</sup> Adicionalmente, trabalhos encontraram que um mecanismo GABAérgico alterado no NPV pode estar envolvido na regulação do aferente simpático no colapso cardíaco, e que alterações desse mecanismo inibitório podem contribuir para o aumento da atividade simpática.<sup>39,40</sup>

Este estudo é o primeiro a explorar a neuromodulação serotoninérgica, via receptores 5-HT<sub>2A</sub> em nível do NPV sobre as respostas cardiovasculares frente à EVEC isotônica, que se mostrou inibitória. Porém, vale ressaltar que é necessário um estudo mais aprofundado para verificar se essa neuromodulação afeta diretamente a atividade simpática e/ou barorreflexa ou vem acompanhada ou não com alterações

neuroendócrinas, principalmente no que se refere à secreção de OT, arginina, vasopressina e peptídeo natriurético atrial.

### Conclusão

O presente trabalho fornece evidências de que a serotonina exerce uma neuromodulação no nível do NPV e essa promove uma inibição da resposta barorreflexa frente à EVEC. Assim, o presente trabalho sugere o envolvimento serotoninérgico na neuromodulação no nível do NPV na resposta reflexa vagal em ratos normotensos.

### Contribuição dos autores

Concepção e desenho da pesquisa e Análise estatística: Semionatto IF, Capitelli CS, Chrigger RS; Obtenção de dados e Análise e interpretação dos dados: Semionatto IF, Alves AC, Capitelli CS, Chrigger RS; Redação do manuscrito: Semionatto IF, Raminelli AO, Capitelli CS, Chrigger RS; Revisão crítica do manuscrito quanto ao conteúdo intelectual importante: Capitelli CS, Chrigger RS.

### Potencial conflito de interesse

Declaro não haver conflito de interesses pertinentes.

### Fontes de financiamento

O presente estudo não teve fontes de financiamento externas.

### Vinculação acadêmica

Não há vinculação deste estudo a programas de pós-graduação.

## Referências

1. Guynet PG. Role of the ventral medulla oblongata in blood pressure regulation. In: Loewy AD, Saper KM. Central regulation of autonomic functions. New York: Oxford University Press; 1990. p. 145-67.
2. Urbanski RW, Sapru HN. Evidence for a sympathoexcitatory pathway from the nucleus tractus solitarius to the ventrolateral medullary pressor area. *J Auton Nerv System*. 1988;23(2):161-74.
3. Dampney RA. Functional organization of central pathways regulating the cardiovascular system. *Physiol Rev*. 1994;74(2):323-64.
4. Swanson LW, Kuypers HG. The paraventricular nucleus of the hypothalamus: cytoarchitectonic subdivisions and organization of projections to the pituitary, dorsal vagal complex, and spinal cord as demonstrated by retrograde fluorescence double-labeling methods. *J Comp Neurol*. 1980;194(3):555-70.
5. Michelini LC. Differential effects of vasopressinergic and oxytocinergic pre-autonomic neurons on circulatory control: reflex mechanisms and changes during exercise. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2007;34(4):369-76.
6. Callahan MF, Thore CR, Sundberg DK, Gruber KA, O'Steen K, Morris M. Excitotoxin paraventricular nucleus lesions: stress and endocrine reactivity and oxytocin mRNA levels. *Brain Res*. 1992;597(1):8-15.
7. Maier T1, Dai WJ, Csikós T, Jirikowski GF, Unger T, Culman J. Oxytocin pathways mediate the cardiovascular and behavioral responses to substance P in the rat brain. *Hypertension*. 1998;31(1 Pt 2):480-6.
8. Morris M, Callahan MF, Li P, Lucion, AB. Central oxytocin mediates stress-induced tachycardia. *J Neuroendocrinol*. 1995;7(6):455-9.
9. Wright DE, Seroogy KB, Lundgren KH, Davis BM, Jennes L. Comparative localization of serotonin1A, 1C and 2 receptor subtype mRNAs in rat brain. *J Comp Neurol*. 1995;351(3):357-73.
10. Gundlach C, Pecins-Thompson M, Schutzer WE, Bethea CL. Ovarian steroid effects on serotonin 1A, 2A and 2C receptor mRNA in macaque hypothalamus. *Brain Res Mol Brain Res*. 1999;63(2):325-39.
11. Zhang Y, Damjanoska KJ, Carrasco GA, Dudas B, D'Souza DN, Tetzlaff J, et al. Evidence that 5-HT<sub>2A</sub> receptors in the hypothalamic paraventricular nucleus mediate neuroendocrine responses to (-)DOI. *J Neurosci*. 2002;22(21):9635-42.
12. Zhang Y, Gray TS, D'Souza DN, Carrasco GA, Damjanoska KJ, Dudas B, et al. Desensitization of 5-HT<sub>1A</sub> receptors by 5-HT<sub>2A</sub> receptors in neuroendocrine neurons in vivo. *J Pharmacol Exp Ther*. 2004;310(1):59-66.

13. Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. 3<sup>rd</sup> ed. San Diego: Academic Press; 1997.
14. Pagani M, Lombardi F, Guzzetti S, Rimoldi O, Furlan R, Pizzinelli P, et al. Power spectral analysis of heart rate and arterial pressure variabilities as a marker of sympatho-vagal interaction in man and conscious dog. *Circ Res*. 1986;59(2):178-93.
15. Malliani A, Pagani M, Lombardi F, Cerutti S. Cardiovascular neural regulation explored in the frequency domain. *Circulation*. 1991;84(2):482-92.
16. Grans CF, Feriani DJ, Absamra ME, Rocha LY, Carrozzi NM, Mostarda C, et al. Resistance training after myocardial infarction in rats: its role on cardiac and autonomic function. *Arq Bras Cardiol*. 2014;103(1):60-8.
17. Ricksten SE, Yao T, Thorén P. Peripheral and central vascular compliances in conscious normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Acta Physiol Scand*. 1981;112(2):169-77.
18. Godino A1, Giusti-Paiva A, Antunes-Rodrigues J, Vivas L. Neurochemical brain groups activated after an isotonic blood volume expansion in rats. *Neuroscience*. 2005;133(2):493-505.
19. Thomas CJ1, Rankin AJ, Head GA, Woods RL. ANP enhances bradycardic reflexes in normotensive but not spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 1997;29(5):1126-32.
20. Thomas CJ, May CN, Sharma AD, Woods RL. ANP, BNP, and CNP enhance bradycardic responses to cardiopulmonary chemoreceptor activation in conscious sheep. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2001;280(1):282-8.
21. Thomas CJ, Allen AM, McAllen RM, Woods RL. ANP potentiates nonarterial baroreflex bradycardia: evidence from sinoaortic denervation in rats. *Auton Neurosci*. 2002;97(2):89-98.
22. Higa KT, Mori E, Viana FF, Morris M, Michelini LC. Baroreflex control of heart rate by oxytocin in the solitary-vagal complex. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2002;282(2):R537-45.
23. Michelini LC, Marcelo MC, Amico J, Morris M. Oxytocinergic regulation of cardiovascular function: studies in oxytocin-deficient mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003;284(6):2269-76.
24. Bagdy G, Kalogeras KT. Stimulation of 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>2/5-HT<sub>1C</sub></sub> receptors induce oxytocin release in the male rat. *Brain Res*. 1993;611(2):330-2.
25. Osei-Owusu P, James A, Crane J, Scrogin KE. 5-Hydroxytryptamine 1A receptors in the paraventricular nucleus of the hypothalamus mediate oxytocin and adrenocorticotropin hormone release and some behavioral components of the serotonin syndrome. *J Pharmacol Exp Ther*. 2005;313(3):1324-30.
26. Watts SW, Morrison SF, Davis RP, Barman SM. Serotonin and blood pressure regulation. *Pharmacol Rev*. 2012;64(2):359-88.
27. Kannan H, Yamashita H. Connections of neurons in the region of the nucleus tractus solitarius with the hypothalamic paraventricular nucleus: their possible involvement in neural control of the cardiovascular system in rats. *Brain Res*. 1985;329(1-2):205-12.
28. Shafton AD, Ryan A, Badoer E. Neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus send collaterals to the spinal cord and to the rostral ventrolateral medulla in the rat. *Brain Res*. 1998;801(1-2):239-43.
29. Patel KP, Salgado HC, Liu X, Zheng H. Exercise training normalizes the blunted central component of the baroreflex in rats with heart failure: role of the NPV. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2013;305(2):173-81.
30. Lovick TA, Malpas S, Mahony MT. Renal vasodilatation in response to acute volume load is attenuated following lesions of parvocellular neurones in the paraventricular nucleus in rats. *J Auton Nerv Syst*. 1993;43(3):247-55.
31. Haselton JR, Goering J, Patel KP. Parvocellular neurons of the paraventricular nucleus are involved in the reduction in renal nerve discharge during isotonic volume expansion. *J Auton Nerv Syst*. 1994;50(1):1-11.
32. Randolph RR, Li Q, Curtis KS, Sullivan MJ, Cunningham JT. Fos expression following isotonic volume expansion of the unanesthetized male rat. *Am J Physiol*. 1998;274(5 Pt 2):R1345-52.
33. Deering J, Coote JH. Paraventricular neurones elicit a volume expansion-like change of activity in sympathetic nerves to the heart and kidney in the rabbit. *Exp Physiol*. 2000;85(2):177-86.
34. Pyner S, Deering J, Coote JH. Right atrial stretch induces renal nerve inhibition and c-fos expression in parvocellular neurones of the paraventricular nucleus in rats. *Exp Physiol*. 2002;87(1):25-32.
35. Higa KT, Mori E, Viana FF, Morris M, Michelini LC. Baroreflex control of heart rate by oxytocin in the solitary-vagal complex. *Am J Physiol*. 2002;282(2):R537-45.
36. Patel KP, Zhang PL, Krukoff TL. Alterations in brain hexokinase activity associated with heart failure in rats. *Am J Physiol*. 1993;265(4 Pt 2):R923-8.
37. Vahid-Ansari F, Leenen FHH. Pattern of neuronal activation in rats with CHF after myocardial infarction. *Am J Physiol*. 1998;275(6 Pt 2):H2140-6.
38. Zhang ZH, Francis J, Weiss RM, Felder RB. The renin-angiotensin-aldosterone system excites hypothalamic paraventricular nucleus neurons in heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002;283(1):H423-33.
39. Zhang K1, Li YF, Patel KP. Reduced endogenous GABA-mediated inhibition in the NPV on renal nerve discharge in rats with heart failure. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2002;282(4):R1006-15.
40. Hassan Z, Sattar MZ, Suhaimi FW, Yusoff NH, Abdulla MH, Yusof AP, et al. Blunted endogenous GABA-mediated inhibition in the hypothalamic paraventricular nucleus of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Acta Neurologica Belgica*. 2013;113(3):319-25.