

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Estudo da pressão arterial média basal e de respostas cardiovasculares em ratos
submetidos à mudança no ciclo claro/escuro

Isabella Goulart de Ávila

Trabalho de Conclusão do Curso
apresentado à Coordenação do curso de
Curso de Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Uberlândia para
obtenção do grau de Licenciada em
Ciências Biológicas.

Uberlândia – MG

2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Estudo da pressão arterial média basal e de respostas cardiovasculares em ratos
submetidos à mudança no ciclo claro/escuro

Isabella Goulart de Ávila

Professor Doutor Alexandre Antônio Vieira

Trabalho de Conclusão do Curso
apresentado à Coordenação do curso de
Curso de Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Uberlândia para
obtenção do grau de Licenciada em
Ciências Biológicas.

Uberlândia – MG

2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Estudo da pressão arterial média basal e de respostas cardiovasculares em ratos
submetidos à mudança no ciclo claro/escuro

Isabella Goulart de Ávila

Professor Doutor Alexandre Antônio Vieira
Instituto de Ciências Biomédicas / Departamento de Fisiologia

Homologado pela coordenação do Curso
de Ciências Biológicas em ____/____/____.

Celine de Melo

Uberlândia – MG
2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Estudo da pressão arterial média basal e de respostas cardiovasculares em ratos
submetidos à mudança no ciclo claro/escuro

Isabella Goulart de Ávila

Aprovado pela Banca examinadora em: / / Nota:

Nome e assinatura do Presidente da Banca Examinadora

Uberlândia, de de .

RESUMO

O sistema nervoso autônomo (SNA) simpático e parassimpático ajusta de maneira fina o sistema cardiovascular, pois a manutenção da pressão arterial média (PAM) é importante para a homeostase. Por outro lado, estes ajustes finos sobre o sistema cardiovascular podem ser prejudicados por diferentes patologias oriundas tanto da própria genética da pessoa como também adquirida ao longo da vida. Dentre algumas patologias, as psicosociais como, por exemplo, uma alta ansiedade e quadros de depressão podem ocasionar mudanças na atividade do SNA e assim influenciar estes ajustes finos sobre a pressão. O rato é um animal muito utilizado em laboratórios para experimentos, pois os seus mecanismos fisiológicos se assemelham ao do ser humano. Sabe-se que alguns protocolos de mudanças do ciclo claro/escuro podem afetar o comportamento do rato induzindo ansiedade e depressão. O objetivo do presente projeto foi estudar a PAM e a Frequência Cardíaca (FC) basal bem como o baro e quimiorreflexo em ratos que passaram por um protocolo crônico de mudança do ciclo claro e escuro. Grupos de ratos foram colocados em um gabinete com 5 horas de exposição ao claro e 19 horas de exposição ao escuro (grupo 5/19), sendo os grupos controle colocados em outro gabinete com um ciclo claro/escuro habitual [(12 horas cada) grupo 12/12]. Ambos os grupos (5/19 e 12/12) foram subdivididos e receberam injeções intraperitoniais duas vezes diariamente durante o ciclo claro do anti-depressivo N-acetilcisteína [NAC (1 mL/100 g)] ou PBS (injeção controle). Após o período de tratamento, a PAM e FC foram registradas em ratos não anestesiados que tiveram um dia antes dos experimentos a canulação da artéria femoral. A veia femoral também foi canulada para os testes de baro e quimiorreflexo. Ao final dos experimentos e para se estudar as respostas cardiovasculares frente à uma ansiedade aguda foi feito um teste que chamamos de teste do “rato vizinho” colocando ao lado do animal 5/19 ou 12/12 uma outra caixa com um outro rato, considerado “vizinho”. Os resultados mostraram que o ciclo 5/19 não alterou a PAM e a FC basal dos ratos. Por outro lado, o ciclo 5/19 foi capaz de potencializar a resposta pressora da ativação do quimiorreflexo sem comprometer as respostas do barorreflexo. Além disso, a potencialização da resposta pressora do quimiorreflexo não foi restaurada pelo tratamento crônico com NAC. Ademais frente ao teste do “rato vizinho” os animais 12/12 apresentaram aumento na FC e esse aumento foi também potencializado nos animais 5/19. Vale ressaltar que antes dos testes cardiovasculares, testes comportamentais como campo aberto, nado forçado e consumo de sacarose também foram realizados.

Palavras-Chave: Ciclo claro/escuro, Pressão Arterial Média, Ansiedade, Depressão, N-acetilcisteína (NAC), Quimiorreflexo, Barorreflexo.

ABSTRACT

The sympathetic and parasympathetic autonomic nervous system (ANS) adjusts finely the cardiovascular system because the maintenance of Mean Arterial Pressure (MAP) is important for the homeostasis. On the other hand, these fine adjustments on the cardiovascular system can be impaired by different pathologies, acquired genetically or throughout life. Among some pathologies, psychosocial disorders such as high anxiety and depression may cause changes in ANS activity and thus influence these fine adjustments on blood pressure. The rat is an animal very used in laboratories for experiments because its physiological mechanisms resemble that of the human being. It is known that some protocols of changes in the light-dark cycle may affect rat behavior inducing anxiety and depression. The objective of this project was to study the baseline MAP and Heart Rate (HR) as well as the autonomic responses in rats subjected to changes in their light-dark cycle. Groups of rats were placed in a cabinet with 5 hours of exposure to light and 19 hours of exposure to the dark (group 5/19) and the control groups were placed in a different cabinet with a usual light-dark cycle [(12 hours each) group 12/12]. Both groups (5/19 and 12/12) were subdivided and received daily an intraperitoneal injection of N-acetylcysteine [NAC (1 mL/100 g) an antidepressant agent or PBS (control injection)]. After the end of the treatment, MAP and HR were recorded in unanesthetized rats that had polyethylene tubing implanted into the abdominal aorta through the femoral artery one day before the experiments. A second polyethylene tubing was inserted in the femoral vein for baroreflex and chemoreflex tests. At the end of the experiments and to study the cardiovascular responses to acute anxiety, a test called the "neighboring rat" was made by placing close to the animal 5/19 or 12/12 a box containing another rat, considered "neighbor". The results showed that the 5/19 light-dark cycle did not alter the baseline MAP and HR of the rat. On the other hand, it cycle was able to enhance the pressor response to chemoreflex activation without changes in baroreflex responses. Important, the enhanced pressor response to chemoreflex activation was not restored by chronic NAC treatment. In addition to the test of the "neighboring rat" the animals from 12/12 light dark-cycle presented an increase in the HR and this increase was also enhanced in the animals from 5/19 light-dark cycle. It is noteworthy that before the cardiovascular tests, behavioral tests such as open field, sucrose consumption and forced swim were also performed.

Key Words: Light-dark cycle, Mean Arterial Pressure, Anxiety, Depression, N-acetylcysteine (NAC), Chemoreflex, Baroreflex.

Dedico este trabalho primeiramente a Deus Trino, que me dá amparo, força e sabedoria para seguir os caminhos e ensinamentos de uma vida mais santa. E também à minha tão querida e amada mãe, Maria Santíssima, sob o título de Nossa Senhora de Fátima, me dando o colo que me acalma em todos os momentos de agitação e me ensinando suas tão valorosas virtudes. Aos meus pais Renata e Ernani, meu irmão Victor e toda família que tanto amo. E aqueles que contribuíram com cada detalhe deste trabalho e do curso, sobretudo ao meu orientador Prof. Dr. Alexandre Antônio Vieira.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus principalmente por ter me dado à graça da vida, me dado o carinho, amor, fidelidade, enfim, tudo o que eu mais necessitava para não desistir da faculdade, deste trabalho e muito menos da fé, porque sem ela eu não sou nada. E também por neste período ter me dado uma nova oportunidade de voltar para seus caminhos.

Agradecendo também de forma muito especial o carinho e zelo de Nossa Senhora em cada momento que eu precisava conversar com Deus e não conseguia, Ela vinha com toda sua ternura e me acalmava pedindo a Deus que me concedesse as muitas graças alcançadas pelas mãos dEla.

Aos meus pais Renata Helen Silva Goulart de Ávila e Ernani Ferreira de Ávila, não só pelo suporte financeiro, mas principalmente emocional, por todo zelo para que não só esta pesquisa fosse realizada, mas esta fase fosse concluída com muito amor, carinho e sucesso. Ao meu irmão Victor Goulart de Ávila, que se não tivesse me dado incentivo, calma e principalmente amor, nada seria feito.

Aos meus tios, meus padrinhos Edivânio, Rachel e Rafael, e meus avós Larry, Déa, Wandercy e Esvandir (*In memoriam*) e principalmente pela minha Tia avó Gilza Terezinha da Silva, pelo entusiasmo, alegria, conselhos, ajudas e amor em cada momento do curso.

A todo resto da minha família, Tia Beta, Tio Mark, Giovanna, Pepe, Tio Hugo, Rafinha, Leandro, Guilherme, Tia Érika, Davi, Ane, e a todos os outros que estão no fundo do meu coração e em minhas orações!

A todos os meus amigos que me acompanharam por toda vida, que me incentivam e me ajudam a desempenhar da melhor forma tudo que eu faço. Em especial sobre os amigos do MUR (Ministério Universidades Renovadas) – Guilherme, Gabi, Hector, Ana Paula, Tais, Flávia, Leo, Barbara, Pedro, Lais, Lauany, Larissa, Matheus Vicente, Matheus Moraes, Jeferson, e todos os luquinhas do Brasil e do mundo, em especial os do GOU Santo Inácio de Loyola, que sempre estavam em oração por mim e me dando todo suporte - da RCC (Renovação Carismática Católica) – Nayara, Gustavo, Nat, Cida, Cláudia, Samantha, Glória,... - e de todos os lugares que Deus foi me dando essas pessoas que me fazem só crescer, a vocês eu rezo para que continuem ao meu lado intercedendo por mim e partilhando suas vidas e ouvindo as minhas partilhas. E também não menos importante ao meu padrinho Rafael, que se manteve sempre em oração e me dando seu amor e carinho, muito obrigada!

Dedico a todos os colaboradores, funcionários, amigos e professores, da Universidade Federal de Uberlândia, que me incentivaram nesta pesquisa e conclusão de curso, sobretudo ao meu orientador Prof. Dr. Alexandre Antônio Vieira, que fez um verdadeiro papel para este título de orientador, ao qual escolhi tão bem, me ajudando em cada detalhe deste trabalho, dando os mais valiosos conselhos e que não tenho uma palavra para agradecer.

“Amar, para isso foi feito o nosso coração” – Santa Teresinha do Menino Jesus

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	8
1.1.	REVISÃO DE LITERATURA E JUSTIFICATIVA	8
1.2.	OBJETIVOS	10
2.	MATERIAL E MÉTODOS	10
2.1.	ANIMAIS	10
2.2.	PROTOCOLO DE MUDANÇA DO CICLO CLARO/ESCURO E INJEÇÕES DO NAC	11
2.3.	CANULAÇÃO DA ARTÉRIA E VEIA FEMORAL	11
2.4.	REGISTRO DA PRESSÃO ARTERIAL MÉDIA, FREQUÊNCIA CARDIACA BASAL BEM COMO TESTE DO BARORREFLEXO E QUIMIORREFLEXO	12
3.	RESULTADOS	13
4.	DISCUSSÃO	14
5.	CONCLUSÕES	18
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	19

1. INTRODUÇÃO

1.1. REVISÃO DE LITERATURA E JUSTIFICATIVA

O funcionamento adequado do sistema cardiovascular e a manutenção de uma pressão arterial média (PAM) dentro de parâmetros normais é importante para a homeostase do meio interno e assim para a vida do animal. Em situações fisiológicas o sistema nervoso central (SNC) através da ação dos barorreceptores e quimiorreceptores periféricos controlam momento-a-momento (agudamente ou em curto prazo) o sistema cardiovascular (Palkovits & Zaborsky, 1974). Importante, mesmo que o sistema cardiovascular pudesse agir sob ausência do SNC, é este último que detém os mecanismos refinados de ajustes capazes de regular e manter em níveis adequados a PAM, a resistência periférica, a frequência cardíaca (FC) e o débito cardíaco (Machado, 2001). Isto porque as projeções aferentes dos receptores periféricos enviam, a todo o momento, informações para o SNC sobre PAM, a concentração de gases no sangue, como por exemplo, o oxigênio e o gás carbônico (Guertzeinstein & Silver, 1974; Blessing *et al.*, 1981; Guyenet, 1990; Dampney *et al.*, 2003).

Por outro lado, algumas alterações podem ocorrer sobre este mencionado sistema, levando a diferentes distúrbios homeostáticos e colocando a vida em risco (Santiago *et al.* 2013). Tais alterações podem ser desencadeadas por diferentes processos patológicos que por sua vez podem estar presentes de forma genética e/ou adquirida ao longo da vida como, por exemplo, patologias que afetam o estado psicológico do animal como a ansiedade e depressão.

A depressão pode aparecer em diferentes situações clínicas e dentre as principais enquadra-se aquelas decorrentes de situações estressantes, circunstâncias sociais e econômicas (Del Porto, 1999). Uma das circunstâncias sociais mais conhecidas e que em última análise poderia causar transtornos de depressão e profundo impacto na fisiologia do animal é a mudança no ciclo claro/escuro ao qual influencia o ritmo circadiano do mesmo.

O ritmo circadiano, como o próprio nome sugere, é um padrão biológico controlado de forma rítmica ao longo de 24 horas e que influencia os diferentes processos homeostáticos no animal. Para se adaptarem aos ritmos da terra, como a intensidade de luz, temperatura, umidade, entre outros, os animais desenvolvem ritmos adequados para o seu corpo, dependendo dos ritmos, tais como, expressão

genética, fisiológica, funções cognitivas e de humor. Vale a pena ressaltar que transtornos afetivos sazonais como ansiedade e depressão são considerados ritmos biológicos (aqueles que funcionam determinado pelo ciclo claro/escuro) anormais, que podem ser induzidos pela diminuição ou falta de luz diária e podem influenciar o sistema fisiológico.

No presente estudo a intenção foi investigar as mudanças no ritmo circadiano do animal observando as influências que estas teriam sobre a PAM e a FC basal bem como sobre as respostas cardiovasculares produzidas pela ativação do barorreflexo e quimiorreflexo. É importante o estudo das alterações no ritmo circadiano sobre os processos cardiovasculares, pois mudanças crônicas da PAM podem produzir comprometimento na nutrição das células e consequentemente na vida das mesmas. Interessante, nos humanos tais mudanças no ritmo circadiano fazem parte da vida daquelas pessoas que frequentemente viajam para diferentes países bem como daquelas pessoas que possuem o chamado “trabalho em turno”. Agora, se tais mudanças acarretam diretamente alterações cardiovasculares nestas pessoas ainda é motivo de discussão, porém sabe-se que uma das funções mais complexas do sistema fisiológico é a regulação da PAM e se existirem elevações crônicas na mesma, quadros de hipertensão arterial podem aparecer, causando danos nos vasos sanguíneos, no coração e nos rins (Brody *et al.*, 1984).

Neste estudo utilizamos o rato como modelo experimental. Os ratos possuem hábitos noturnos, uma particularidade cronológica, caracterizados por um alto consumo alimentar, temperatura corporal, FC e locomoção (Beck *et al.*, 2015). Esses animais possuem um ritmo claro/escuro de 12 horas cada. Os animais foram expostos a um ritmo diferente como, por exemplo, 5 horas de luz (claro) e 19 horas de escuro, sendo que os animais controle tiveram um ritmo normal/habitual de 12 horas cada ciclo.

Estudos recentes, mostraram que as mudanças no ritmo circadiano, e que estão aqui propostas, são eficazes em promover comportamentos do tipo depressivo em ratos (Guimarães *et al.*, 2009) e por especificamente este motivo, a hipótese principal é a de que diante desta potencial efeito depressivo (graças ao ritmo modificado), alterações nos níveis basais de PAM e FC poderiam também aparecer. Além deste citado parâmetro basal, outro teste do estudo foi testar a ocorrência de modificações em mecanismos de respostas cardiovasculares que são dependentes da ativação do sistema nervoso autônomo, como por exemplo, respostas da

ativação do quimiorreflexo (aumento da atividade simpática, frequência cardíaca e PAM) (Guimarães *et al.*, 2009; Ribeiro *et al.*, 2012).

Neste estudo alguns animais foram tratados com N-acetilcisteína (NAC). O NAC possui alguns efeitos benéficos sobre distúrbios neuropsiquiátricos podendo exercer efeito terapêutico para pessoas que possuem transtornos, como a depressão (Berk *et al.*, 2013). Ademais, o NAC pode ter efeito antidepressivo, atuando como antioxidante e redutor da liberação de glutamato no SNC, aos quais poderiam ser um estimulante para esse efeito antidepressivo (Pilz *et al.*, 2011; Michels *et al.*, 2012).

Sabendo que o NAC pode ser usado como antidepressivo, outra hipótese seria que a modificação do ciclo claro/escuro do animal poderia causar mudanças nas respostas cardiovasculares e a administração de NAC poderia restaurar estes parâmetros.

Este estudo foi e é importante, pois apontou quais os efeitos de um estilo de vida modificado sobre parâmetros cardiovasculares do animal. Este mesmo pode alertar e forçar reflexões sobre o planejamento da vida do animal para que o mesmo possa viver de forma não sobrecarregada, evitando assim consequências ruins para a saúde, a curto e/ou longo prazo, assim como estas reflexões servem também de estudo para a vida dos humanos como mencionado acima, aos quais poderiam sofrer os mesmos efeitos dos ratos.

1.2. OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi estudar se a modificação no ritmo circadiano do rato para ciclo 5/19 (5 horas claro e 19 horas escuro) influencia parâmetros cardiovasculares basais e de ativação do baro e quimiorreflexo, além de verificar se o N-acetilcisteína poderia restaurar os parâmetros modificados pela mudança do ciclo.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. ANIMAIS

Foram utilizados ratos machos, de linhagem Wistar, com pesos em torno de 300 g, mantidos em gaiolas individuais no laboratório ARFIS – UFU (Área de

Ciências Fisiológicas – Universidade Federal de Uberlândia) com ração Guabi (0,5% de sódio) e água.

Os 32 ratos foram observados diariamente e não houve qualquer indício de dor e/ou desconforto nos animais do grupo amostral.

Estes sinais são chamados como “sinais BAR” que inclui o brilho dos pêlos (B), a condição de alerta (A) bem como a capacidade do animal em reagir de forma anormal (R) a algum estímulo, por exemplo, o toque.

2.2. PROTOCOLO DE MUDANÇA DO CICLO CLARO/ESCURO E INJEÇÕES DO NAC

Os ratos foram colocados em caixas brancas constituídas de plástico com no máximo 4 animais cada, e em um gabinete, Insight Ltda, Ribeirão Preto-SP, no laboratório ARFIS – UFU (Área de Ciências Fisiológicas – Universidade Federal de Uberlândia) que controlava os horários de acender e apagar as luzes e também realizava a circulação e exaustão de ar, colocados em uma sala climatizada durante 10 semanas. O primeiro gabinete com o ciclo de 12 horas claro e 12 horas escuro (grupo controle, 12/12) e o segundo 5 horas claro e 19 horas escuro (grupo teste 5/19), o primeiro acendendo às 7:00 horas e apagando às 19:00 horas, e o segundo acendendo às 13:00 horas e apagando às 18:00 horas, o ciclo foi modificado desde o pós-desmame do animal, portanto este ciclo foi condicionado durante 75 dias. Mantidos nesse ciclo e pesados semanalmente, foi injetado 1mL a cada 100g do animal, N-acetilcisteína (NAC) em duas caixas dos grupos 12/12 e 5/19, e em duas caixas dos grupos 12/12 e 05/19 1mL a cada 100 g do animal de PBS (Injeção controle), duas vezes ao dia, durante o ciclo claro, dando um intervalo de 4 horas entre elas de injeções intraperitoneais. O PBS foi preparado dissolvendo 8 g de NaCl - 0,2 g de KCl - 1,44 g de Na_2HPO_4 e 0,24 g de KH_2PO_4 . O NAC foi dissolvido 60 mg em 1mL de PBS e ajustado ao pH para 7,4 com NaOH. As duas soluções foram mantidas na geladeira durante os intervalos de aplicações no ciclo escuro, e retiradas 30 minutos antes de serem aplicadas.

2.3. CANULAÇÃO DA ARTÉRIA E VEIA FEMORAL

Vinte e quatro horas antes do registro da pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) os ratos foram individualizados em caixas pequenas,

também brancas e de plástico, anestesiados com uma associação de anestésico com relaxante muscular, ketamina (80 mg/kg) e xilazina (8 mg/kg) respectivamente, para assim se iniciar a canulação da artéria e veia femoral. A artéria foi canulada com um tubo de polietileno PE 10, o qual foi conectado com um tubo de polietileno PE 50 que, conduzido subcutaneamente, foi exteriorizado pelo dorso do animal. A veia femoral também foi canulada e exteriorizada da mesma maneira acima mencionado para injeção de drogas, como Fenilefrina (FEN), Nitroprussiato de Sódio (NPS) e Cianeto de Potássio (KCN) que ativaram baro e quimiorreflexo possibilitando uma maior discussão a cerca dos objetivos.

2.4. REGISTRO DA PRESSÃO ARTERIAL MÉDIA, FREQUÊNCIA CARDÍACA BASAL BEM COMO TESTE DO BARORREFLEXO E QUIMIORREFLEXO

Importante destacar que uma semana antes do procedimento de canulação, todos os animais utilizados neste estudo passaram por testes comportamentais, que foram os seguintes: teste do campo aberto, nado forçado e do consumo de sacarose. Estes testes mostraram que a alteração do ciclo claro escuro (5/19) produziu comportamentos dos tipos ansioso e depressivo nos ratos além de aumento do consumo de sacarose. Estes resultados fizeram parte de outro projeto do laboratório, porém pode ter tido influencia para os resultados desta pesquisa.

Vinte e quatro horas após a canulação, ou seja, no dia do registro, os ratos foram levados para a sala de registro. A cânula da artéria foi conectada no registrador de pressão (Mac Lab/Power Lab) e o sistema calibrado utilizando uma coluna de mercúrio. Após um período de pelo menos 20 minutos de registro basal da PAM e FC os testes dos reflexos cardiovasculares foram iniciados com o quimiorreflexo ativado através da injeção endovenosa de Cianeto de Potássio [KCN (40 µg/0.1 ml)]. O KCN é conhecido como eficaz ferramenta laboratorial para se ativar o quimiorreflexo e aumentar a atividade do sistema nervoso simpático em ratos (Olivan *et al.*, 2001; Vieira *et al.*, 2006). Após o teste do quimiorreflexo, uma injeção endovenosa de fenilefrina [FEN (5 µg/Kg/ml)] e outra de nitroprussiato de sódio [NPS (30 µg/Kg/ml)] foram feitas para o teste do barorreflexo. Mantendo o intervalo entre os testes por cerca de 5 minutos. A FEN é um agonista adrenérgico ALFA-1 e quando injetada na veia produz resposta pressora e uma bradicardia reflexa, ou seja, aumenta a pressão arterial e diminui a frequência cardíaca,

causando sensação de cansaço. O NPS é um doador de óxido nítrico e quando injetado na veia produz hipotensão com resposta taquicárdica reflexa, portanto, causa queda na pressão arterial e aumento na frequência cardíaca, causando sensação de fadiga.

Todos os protocolos foram aprovados pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA/UFU, protocolo: 039/16).

3. RESULTADOS

A figura 1 representa os parâmetros basais de PAM e FC em ratos não anestesiados. Podemos observar os valores basais que normalmente se é encontrado em ratos Wistar sadios em um ciclo normal (barra branca, PBS 12/12).

Foram utilizados os seguintes “n” de animais

para cada grupo: PBS 12 horas claro/ 12 horas escuro – 3 animais; NAC 12 horas claro/ 12 horas escuro – 4 animais; PBS 5 horas claro/ 19 horas escuro – 3 animais; NAC 5 horas claro/ 19 horas escuro – 2 animais;

Tanto a mudança do ciclo claro/escuro (barra azul, PBS 5/19) quanto à injeção de NAC (barra preta, NAC 12/12) por si só não produziram efeitos sobre a

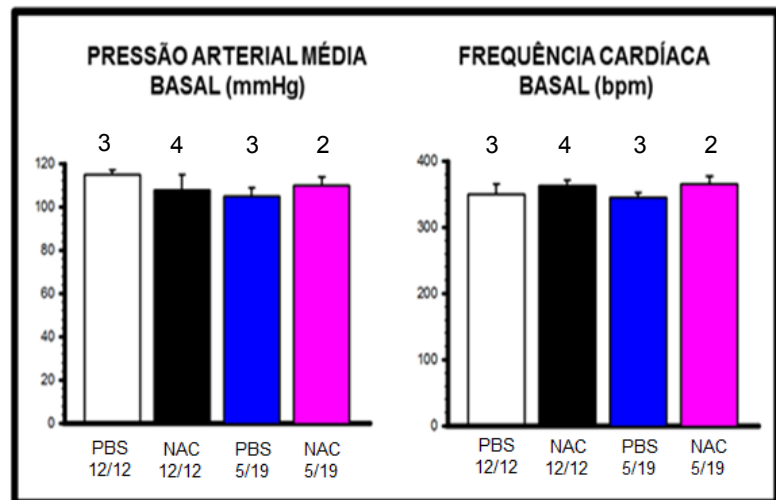


Figura 1: Pressão Arterial Média e Frequência Cardíaca basal registradas em ratos acordados dos diferentes grupos do ciclo claro/escuro.

	Mudanças na PAM (mmHg)			Mudanças na FC (bpm)		
	KCN	FEN	NPS	KCN	FEN	NPS
PBS 12/12	50±2*	38±2	-32±3	-160±15	-47±6	95±3
NAC 12/12	52±2*	40±1	-28±2	-150±8	-52±2	100±2
PBS 5/19	60±4	35±5	-32±4	-170±20	-45±5	100±6
NAC 5/19	52±5	38±4	-30±5	-145±14	-57±9	94±7

Tabela 1: Mudanças na Pressão Arterial Média (PAM) e Frequência Cardíaca (FC) produzidas pela ativação do quimiorreflexo com Cianeto de potássio (KCN) bem como do barorreflexo com Fenilefrina (FEN) e Nitroprussiato de sódio (NPS). *diferente de PAM do grupo PBS 5/19

PAM e FC basal. Não foram observadas mudanças na PAM e FC basal nos ratos que recebem NAC no ciclo modificado (barra rosa, NAC 5/19).

A figura 2 representa as respostas cardiovasculares do quimiorreflexo produzidas pela

injeção de KCN. Observamos que a resposta pressora do quimiorreflexo foi potencializada (barra azul, PBS 5/19) quando comparada com a típica resposta, que já é conhecida, em ratos acordados em um ciclo normal (barra branca, PBS 12/12). Ressalto que não houve alteração na resposta bradicárdica, apenas na pressora. A injeção de NAC por si só não alterou as respostas cardiovasculares do quimiorreflexo tanto em ratos do ciclo normal (barra preta, 12/12) quanto o modificado (barra rosa, 5/19).

Na tabela 1 estão representados também os valores do teste barorreflexo.

Podemos observar que tanto a resposta pressora e bradicárdica da FEN quanto a hipotensora e taquicárdica do NPS não foram modificadas quando comparados os grupos.

A figura 3 representa o teste da ansiedade aguda chamado de teste do rato “vizinho”. Observamos que a presença do rato “vizinho” produziu taquicardia no rato

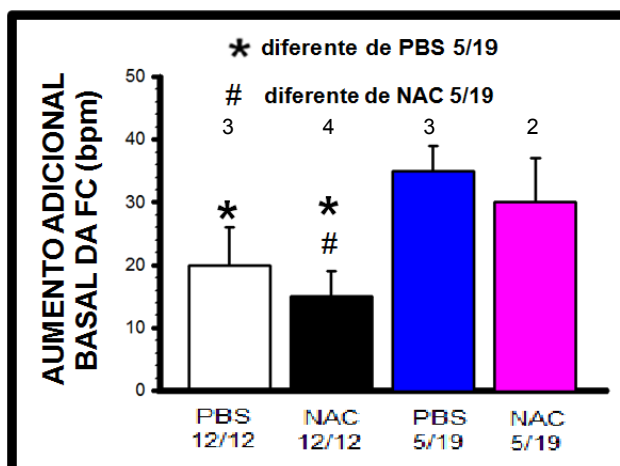


Figura 3: Mudanças na Frequência Cardíaca (FC) produzidas pela presença do rato “vizinho”. */# = $p < 0,05$

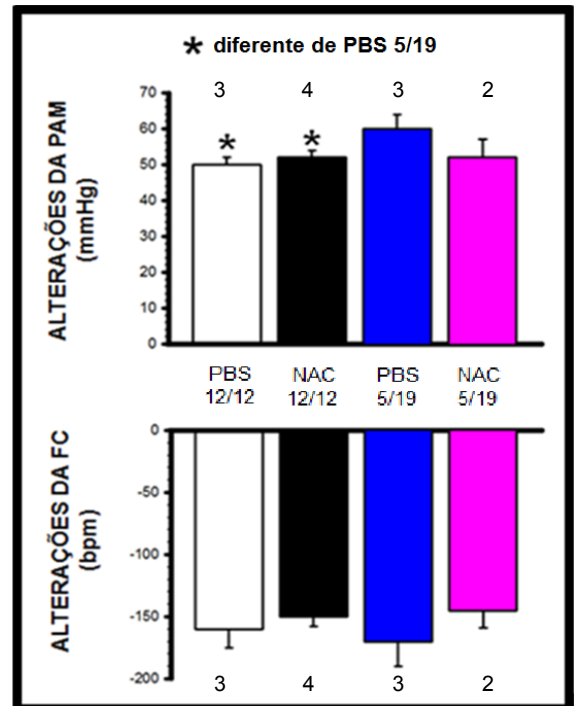


Figura 2: Efeitos da mudança do ciclo claro/escuro nas respostas cardiovasculares produzidas pela ativação do quimiorreflexo em ratos não anestesiados. * = $p < 0,05$

“residente” do ciclo normal ($+20 \pm 6$ bpm) (barra branca, SHAM 12/12). Esta presença do rato “vizinho” produziu um efeito taquicárdico ainda maior no rato “residente” que passou pelo ciclo modificado ($+35 \pm 3$ bpm) (barra azul, PBS 5/19). A pressão arterial nestes animais não foi modificada durante o teste que durou aproximadamente 5 minutos.

4. DISCUSSÃO

O sistema nervoso central (SNC) e os seus mecanismos autonômicos de ajustes do simpático e parassimpático são capazes de regular e manter em níveis

adequados a pressão arterial média (PAM) momento a momento ofertando assim, nutrientes para as células, garantindo sua sobrevivência e estabilidade.

Importantes mecanismos responsáveis pela regulação cardiovascular estão localizados em diferentes áreas do SNC como, por exemplo, no tronco encefálico bem como em suas porções anteriores (Brody *et al.*, 1984; Pyner & Coote, 1997; Guyenet, 2006).

No tronco encefálico, particularmente no bulbo, a área rostroventrolateral (RVL) tem papel importante na geração e manutenção da atividade simpática (Guertzeinstein & Silver, 1974; Brown & Guyenet, 1984). A área RVL envia e recebe projeções de diferentes áreas anteriores, destacando-se neste caso o hipotálamo, auxiliando assim no controle fino da atividade simpática e PAM (Willette *et al.*, 1983; Guyenet, 1990; Dampney *et al.*, 2003; Vieira *et al.*, 2006).

Para que o SNC possa ajustar a atividade autonômica e em última análise a PAM, existe a necessidade dele ser informado continuamente sobre os níveis de PAM e concentrações de gases no sangue. Estas informações partem dos receptores periféricos, os barorreceptores e os quimiorreceptores.

No caso dos quimiorreceptores periféricos, eles são formados por células especializadas que estão localizadas na parede da aorta e na bifurcação das artérias carótidas comuns. Eles são responsáveis pelo controle da pressão parcial dos gases circulantes do sangue, como por exemplo oxigênio (O₂) e gás carbônico (CO₂). Pode-se citar um exemplo prático, quando a pressão parcial de oxigênio sanguíneo cai (principal estímulo) ou a pressão parcial de CO₂ aumenta, essas células são mais ativadas e as mesmas (via nervo vago sensitivo e glossofaríngeo) produzem um aumento na atividade do sistema nervoso autônomo (simpático e parassimpático). Esse aumento da atividade autonômica é importante, pois promove ajustes cardiovasculares e respiratórios que defendem o animal contra o desbalanço na pressão parcial dos gases, contribuindo para o controle da homeostase e a sobrevivência das células do organismo. Agora, se por um lado a atividade do quimiorreflexo é importante para a manutenção da homeostase (por controlar a pressão parcial dos gases circulantes), uma hiperatividade crônica deste componente reflexo, poderia gerar quadros patológicos, como já foi sugerido na apneia obstrutiva do sono, ocasionando hipertensão (Appleton *et al.*, 2016).

Os resultados da pesquisa mostraram que a mudança do ciclo claro escuro para 5/19 foi capaz de potencializar a resposta pressora do quimiorreflexo em ratos não anestesiados. Os motivos pelos quais essa potencialização ocorreu ainda não

estão claros, porém podemos sugerir alguma facilitação de respostas que dependem da atividade simpática. Interessante se observar, na presença do chamado rato “vizinho”, ocorreu também uma potencialização na resposta taquicárdica nos mesmos animais, aqueles que passaram pelo ciclo 5/19. Esse teste do rato “vizinho” foi realizado, pois ofereceu para o rato “residente” (o que passou pela mudança de ciclo) uma ansiedade aguda (a curto prazo), que foi diferente da ansiedade e depressão promovida pela crônica mudança de ciclo claro/escuro. Colocando estes dois resultados juntos (do quimiorreflexo e do rato vizinho) podemos observar que ambas as respostas potencializadas foram aquelas que dependem do aumento da atividade simpática. Por outro lado, não teve diferença na taquicardia reflexa após a hipotensão promovida pela injeção (iv) de nitroprussiato de sódio (NPS) podendo sugerir neste caso a possibilidade da atuação de áreas anteriores do hipotálamo na potencialização das outras respostas. Nota – se que este teste do rato “vizinho” não foi encontrado na literatura.

Trabalhos anteriores mostraram que a resposta barorreflexa de taquicardia do NPS não depende da integridade de áreas do hipotálamo (Vieira *et al.*, 2006). Por outro lado, a resposta pressora do quimiorreflexo depende de áreas anteriores como, por exemplo, do núcleo paraventricular do hipotálamo (NPV) (Olivan *et al.*, 2001) que reciprocamente possui projeções com áreas envolvidas com luta/fuga e comportamento do tipo ansioso e/ou depressivo (Pittman *et al.*, 1981). Uma hipótese é a de que a mudança no ciclo do animal foi capaz de produzir uma facilitação nas respostas do NPV refletindo na potencialização do quimiorreflexo. Um interessante trabalho mostrou aumento na expressão de c-fos [(gene de ativação imediata como marcador neural de nocicepção) Brado & Del Bel, 1998] no NPV de ratos submetidos à hipóxia crônica por 30 dias (Sica *et al.*, 2000). Visto que pode existir uma relação entre respostas ventilatórias e ansiedade (Wilhelm *et al.*, 2001) é plausível de se pensar que possa ter ocorrido também aumento na expressão de c-fos no NPV nos ratos que passaram pela mudança de ciclo (modificando o nível de atividade desta área), porém não foi feita esta verificação.

Existe relação entre o NPV e a glândula pineal em respostas ao ritmo claro/escuro. Por exemplo, exposição à luz tende a inibir mais o NPV que por sua vez tende a inibir mais a via de produção da melatonina pela glândula pineal (Antunes-Rodrigues *et al.*, 2005a). Relacionando esta informação com os nossos resultados é possível pensar que aumentando o período de escuro para 19 horas, a via inibitória direcionada para o NPV esteja também menos ativa e desta forma, mais

facilmente outros mecanismos poderiam ativar o NPV. Ademais, esta mencionada via pelo qual existe a facilitação na produção de melatonina também já foi demonstrada ter participação de mecanismos dependentes do sistema nervoso simpático (Wurtman *et al.*, 1967; Teclemariam-Mesbah *et al.*, 1999).

O fato é que a ansiedade e a depressão promovida pela mudança de ciclo (Marin *et al.*, 2015) bem como a ansiedade aguda promovida pela presença do rato “vizinho” podem ter desencadeado um aumento na atividade destas áreas envolvidas com comportamento, e assim potencializações ocorreram em respostas dependentes do sistema nervoso simpático.

Ainda mais, sabemos que aumentos à curto prazo na frequência cardíaca também podem ser gerados pela própria diminuição da atividade do nervo vago refletindo uma menor liberação de acetilcolina nas áreas geradoras do sinal elétrico cardíaco. Por este motivo não podemos descartar a possibilidade da presença de comportamentos do tipo ansioso e depressivo (promovida pela mudança do ciclo) bem como a ansiedade aguda (teste do “rato vizinho”) facilitar alguma via inibitória direcionada, por exemplo, as áreas controladoras do nervo vago, como o núcleo ambíguo e motor dorsal do vago. Porém esta hipótese ainda precisa ser melhor estudada pois no presente trabalho, as respostas que dependem da atividade do nervo vago não foram reduzidas, respostas bradicárdicas do KCN (figura 2) bem como da fenilefrina (tabela 1). A figura 4 representa a hipótese central para os resultados obtidos. A injeção de KCN, que ativa o quimiorreflexo, aciona mecanismos presentes no tronco encefálico produzindo resposta pressora. Porém, a magnitude desta resposta pressora dependeria, em última análise de um

circuito bem mais elaborado que existe entre áreas hipotalâmicas e outras áreas centrais envolvidas no comportamento animal (Dampney, 2015). Assim, mudanças no ciclo claro/escuro bem como a presença do rato “vizinho” facilitaria mecanismos desencadeadores da chamada “luta ou fuga” e assim deixaria mais fácil o aparecimento

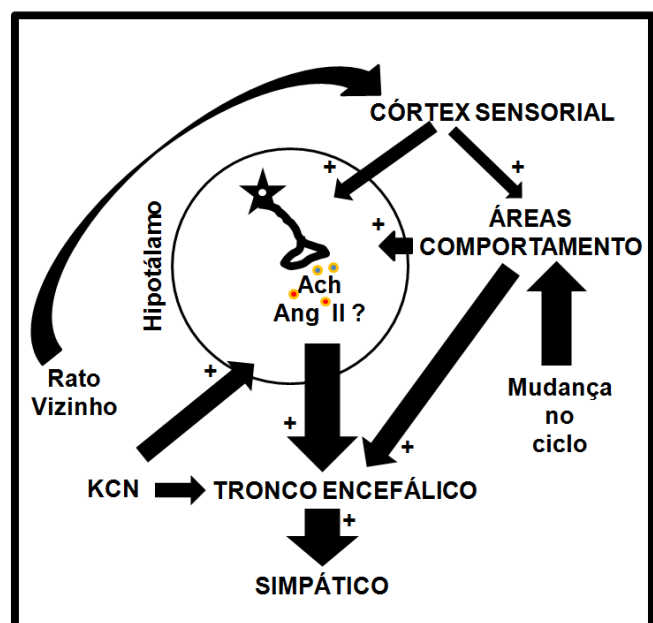


Figura 4: Hipótese central para os resultados obtidos

de algumas respostas que dependem da atividade simpática.

Como sugestão de mecanismos facilitadores da atividade simpática, destacamos a acetilcolina (Ach) e a angiotensina II (Ang II). Estudos apontam que ambos os mecanismos centrais (colinérgicos e angiotensinérgicos) podem facilitar respostas dependentes da atividade simpática como respostas pressoras desencadeadas pelo glutamato agindo em áreas do bulbo (Vieira *et al.*, 2007; Vieira *et al.*, 2010).

Vale a pena destacar que nos testes comportamentais, não somente os comportamentos do tipo ansioso e depressivo foram verificados nos animais que passaram pela mudança de ciclo, mas também um aumento no consumo de solução de sacarose, como estudado no trabalho realizado anteriormente com os mesmos animais deste. Recente trabalho sugere que a alta ingestão de sacarose pode estar associada com a patologia conhecida como síndrome metabólica (Rebolledo-Solleiro *et al.*, 2017) que tem como uma das características principais a elevação da atividade simpática e pressão arterial (Eckel *et al.*, 2010). Além do mais, os mecanismos que controlam a fome/saciedade dependem também da integridade de diferentes áreas do sistema nervoso central (Antunes-Rodrigues *et al.*, 2005b), que direta ou indiretamente podem modular a atividade simpática.

Por este motivo, podemos pensar que a modificação no ciclo claro escuro do animal, logicamente respeitando a biologia de cada um, poderia ser um fator que desencadearia comportamentos do tipo ansioso e depressivo, que por sua vez favoreceria respostas simpato-excitatórias. Pensando justamente assim, se a potencial ansiedade e depressão estiver acompanhada por aumento na ingestão alimentar este quadro de facilitação da atividade simpática se agravaria a longo prazo principalmente se a ingestão estiver direcionada aos carboidrato. Isto porque ingestão de alguns tipos de açúcar, por exemplo, a frutose, pode ocasionar eventos de hipertensão dependentes do aumento da atividade simpática e angiotensina II (Farah *et al.*, 2006).

De certo modo, seriam necessários mais experimentos para se obter uma resposta mais precisa sobre o impacto produzido por protocolos de mudança de ciclo claro e escuro no potencial desenvolvimento de características da síndrome metabólica.

5. CONCLUSÃO

A mudança no ritmo circadiano para ciclo de 5 horas claro / 19 horas escuro potencializou a resposta pressora do quimiorreflexo e a taquicardia promovida por uma ansiedade aguda, relacionada à presença de outro rato, sem alterar barorreflexo e pressão arterial média basal. O NAC não restaurou o parâmetro de mudança do ciclo.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANTUNES-RODRIGUES, J.; MOREIRA, AC.; ELIAS, LLK.; DE CASTRO, M (2005a). Neuroendocrinologia básica e aplicada, editora Guanabara Koogan S.A, Ritmos biológicos em neuroendocrinologia, capítulo 14:192-209.

ANTUNES-RODRIGUES, J.; MOREIRA, AC.; ELIAS, LLK.; DE CASTRO, M (2005b). Neuroendocrinologia básica e aplicada, editora Guanabara Koogan S.A, Controle neuroendócrino da ingestão alimentar, capítulo 11:135-161.

APPLETON, SL.; VAKULIN, A.; MARTIN, SA.; LANG, CJ.; WITTERT, GA.; TAYLOR, AW.; McEVOY, RD.; ANTIC, NA.; CATCHESIDE, PG & ADAMS, RJ (2016). Hypertension is associated with undiagnosed OSA during Rapid Eyes Movement Sleep. *Chest*, 150(3):495-505.

BECK, WR.; FORTE, LDM & GORBATTO, CA (2015). Efeitos do horário do dia, luminosidade ambiental e exercício físico sobre parâmetros inflamatórios e de performance em ratos nadadores. *Rev. Educ. Fís/UEM* 26, 96-106.

BERK, M.; MALHI, GS.; GRAY, LJ & DEAN, OM (2013). The promise of N-acetylcysteine in neuropsychiatry. *Trends Pharmacol Sci.* 34, 167-177.

BLESSING, WW.; GOODCHILD, AA.; DAMPNEY, RAL & CHALMERS, JP (1981). Cell groups in the lower brain stem of the rabbit projecting to the spinal cord with special reference to catecholamine-containing neurons. *Brain Res* 221, 35-55.

BRADO, PTC & DEL BEL, EA (1998). C-Fos, Um gene de ativação imediata como marcador neural de nocicepção. *Rev. Medicina/ Ribeirão Preto* 31, 424-433

BRODY, MJ.; FABER, JE, MANGIAPANE, ML & PORTER, JP (1984). The central nervous system and prevention of hypertension. In: *Handbook of hypertension: Experimental and Genetic models of hypertension*, edited by de Jong, W. Elsevier, pp. 474-494.

BROWN, DL. & GUYENET, PG (1984). Cardiovascular neurons of brainstem with projections to spinal cord. *Am. J. Physiol.*, 247:R1009-R1016.

DAMPNEY, RAL.; HORIUCHI, J.; TAGAWA, T.; FONTES, MAP.; POTTS, D & POISON, JW. (2003). Medullary and supramedullary mechanisms regulating sympathetic vasomotor tone. *Acta Physiol. Scand.*, 177:209-218.

DAMPNEY, RAL (2015). Central mechanisms regulating coordinated cardiovascular and respiratory function during stress and arousal. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.*, 309(5):R429-43.

ECKEL, RH.; ALBERTI, KG.; GRUNDY SM.; & ZIMMET, PZ (2010). The metabolic syndrome. *Lancet*, 375(9710):181-3.

FARAH, V.; ELASED, KM.; CHEN, Y.; KEY, MP.; CUNHA, TS.; IRIGOYEN, MC & MORRIS, M (2006). Nocturnal hypertension in mice consuming a high fructose diet. *Auton Neurosci*, 130(1-2):41-50.

GUERTZEINSTEIN, PG & SILVER, A (1974). Fall in blood pressure produced from discrete regions of the ventral surface of the medulla by glycine and lesions. *J. Physiol* 242, 489-503

GUIMARÃES, VG.; BELLI, JFC.; BACAL, F & BOCCHI, EA (2009). Behavior of central and peripheral quimiorreflexes in heart failure. *Arq Bras Cardiol* 96, 161-167.

GUYENET, PG (1990). Role of the ventral medulla oblongata in blood pressure regulation. In *Central Regulation of Autonomic Functions*, A.D. Loewy & K.M. Spyer, Eds.:145-167, Oxford University Press, New York.

GUYENET, PG (2006). The sympathetic control of blood pressure. *Nat. Rev. Neurosc.*, 7(5):335-346.

MACHADO, BH (2001). Neurotransmission of the cardiovascular reflexes in the nucleus tractus solitarii of awake rats. *Ann New York Acad Sci* 940, 179-196.

MARIN, MT.; ARAÚJO, TT.; REZENDE, MMF & RIBEIRO-BARBOSA, ER (2015). Behavioral alterations induced by absence of circadian light rhythm: effects of constant light or constant dark on depression-like behaviors and locomotor activity in rats. *Bioscience Journal*, 31(6), 1837-1843.

MICHELS, MS.; COSTA-CAMPOS, L & ELISABTESKY, E (2012). Efeito da N-acetilcisteína no teste de suspensão pela cauda em camundongos. XXIV Scientific Initiation Meeting, <http://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/63763>.

OLIVAN, MV.; BONAGAMBA, LG & MACHADO, BH (2001). Involvement of the paraventricular nucleus of the hypothalamus in the pressor response to chemoreflex activation in awake rats. *Brain Res.* 895, 167-172.

PALKOVITS, M & ZABORSKY, L (1974). Neuroanatomy of central cardiovascular control. Nucleus tractus solitarii: Afferent and efferent neuronal connections in relation to the baroreceptor reflex arch. *Prog Brain Res* 47, 9-34.

PILZ, LK.; GARCIA, CRL.; LINCK, VM.; COSTA-CAMPOS, L & ELISABTESKY, E (2011). Papel do glutamato, serotonina e noradrenalina no efeito tipo antidepressivo da N-acetilcisteína. XXIII Scientific Initiation Meeting, <http://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/48051>.

PITTMAN, QJ.; BLUME, HW & RENAUD, LP (1981). Connections of the hypothalamic nucleus with the neurohypophysis, median eminence, amygdale, lateral septum and midbrain periaqueductal gray: an electrophysiological study in the rat. *Brain Res.*, 215(1-2):15-28.

PYNER, S & COOTE, JH (1997). The organization of the PVN projection to the RVLM and sympathetic preganglionic neurons in the spinal cord of the rats. *J. Physiol.*, 501:82-83.

REBOLLEDO-SOLLEIRO, D.; ROLDÁN-ROLDÁN, G.; DIAZ, D.; VELASCO, M.; LARQUÉ, C.; RICO-ROSILLO, G.; VEJA-ROBLRDO, GB.; ZAMBRANO, E.; HIRIART, M & PÉREZ DE LA MORA, M (2017). Increased anxiety-like behavior is associated with the metabolic syndrome in non-stressed rats. *PLoS One*, 12(5):1-21.

RIBEIRO, JP.; CHIAPPA, GR & CALLEGARO, CC (2012). Contribuição da musculature inspiratória na limitação ao exercício na insuficiência cardíaca: mecanismos fisiopatológicos. *Rev. Bras. Fisioter* 16, 261-267.

SANTIAGO, MB.; VIEIRA, AA & GIUSTI-PAIVA, A (2013). Impaired chemoreflex sensitivity during septic shock induced by cecal ligation and perforation. *Can J Physiol Pharmacol* 91, 1107-11.

SICA, AL.; GREENBERG, HE.; SCHARF, SM.; RUGGIERO, DA (2000). Chronic-intermittent hypoxia induces immediate early expression in the midline thalamus and epithalamus, *Brain Res.*, 883:224-228.

WILHELM, FH.; GEVIRTZ, R & ROTH, WT (2001). Respiratory dysregulation in anxiety functional cardiac, and pain disorders. Assessment, phenomenology, and treatment. *Behav. Modif.*, 25:513-545.

WILLETE, RN.; BARCAS, PP.; KRIEGER, AJ & SAPRU, HN (1983) Vasopressor and depressor areas in the rat medulla. *Neuropharmacology*, 22(9):1071-1079.

WURTMAN, R.J.; AXELROD, J.; SEDVALL, G & MOORE, R. (1967). Photic and neural control of the 24-hours norepinephrine rhythm in the rat pineal gland. *The Journal of Pharmacol and Exp. Ther.*, 157:487-492.

TECLEMARIAM-MESBA, R.; TER-HORST, GJ.; POSTEMA, F.; WORTEL, J & BUIJS, RM (1999). Anatomical demonstration of the suprachiasmatic nucleus-pineal pathway. *The Journal of Comparative Neurology*, 406:171-182.

VIEIRA, AA.; DE LUCA JR, LA.; COLOMABRI, DAS.; COLOMBARI, E & MENANI, JV (2006). AV3V lesions impair the pressor response to glutamate into the rostral ventrolateral medulla. *Brain Res.*, 1086:160-167.

VIEIRA, AA.; COLOMBARI, E.; DE LUCA JR, LA.; COLOMBARI, DSA & MENANI, JV (2007). Central cholinergic blockade reduces the pressor response to L-glutamate into the rostral ventrolateral medullary pressor area. *Brain Res.*, 1155:100-107.

VIEIRA, AA.; COLOMBARI, E.; DE LUCA JR, LA.; COLOMBARI, DAS.; DE PAULA, PM & MENANI, JV (2010). Importance of angiotensinergic mechanisms for the pressor response to l-glutamate into the rostral ventrolateral medulla. *Brain Res*, 1322:72-80.