

2.07.02 - Fisiologia / Fisiologia de Órgãos e Sistemas

## **A ESTIMULAÇÃO COLINÉRGICA CENTRAL AUMENTA A PERDA DE CALOR EM RATOS ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS**

Sara B. Silva<sup>1,3</sup>, Sueli F. Fonseca<sup>1,2</sup>, Talita E. Domingues<sup>1,2</sup>, Dirceu S. Melo<sup>1,2</sup>, Jeanne B. Martins<sup>1,2</sup>, Washington Pires<sup>5</sup>, Cynthia F. F. Santos<sup>4</sup>, Wagner F. Pereira<sup>1,3</sup>, Laura H. R. Leite<sup>5</sup>, Cândido C. Coimbra<sup>2,5</sup>, Ana Cristina R. Lacerda<sup>1,2,3</sup>

1. Centro Integrado de Pós-Graduação e Pesquisa em Saúde, UFVJM
2. Programa Multicêntrico de Pós Graduação em Ciências Fisiológicas, SBFis
3. Faculdade de Ciências Biológicas e da Saúde, UFVJM
4. Faculdade de Medicina, UFVJM
5. Instituto de Ciências Biológicas, UFMG

### **Resumo:**

Sinapses colinérgicas desempenham um papel importante no controle autonômico. Há evidências de que estimulação colinérgica central (ECC) aumenta a dissipação de calor por meio da modulação de barorreceptores. Diante disso, o objetivo do presente estudo foi investigar os efeitos da ECC sobre as respostas termorregulatórias e cardiovasculares em condição de sensibilidade alterada dos barorreceptores, tal como na hipertensão arterial. Foram utilizados ratos machos Wistar e Espontaneamente Hipertensos (SHR) com 16 semanas de idade. As respostas termorregulatórias (temperatura da calda e colônica) e cardiovasculares (pressão arterial, frequência e variabilidade cardíaca) foram medidas por 60 minutos antes e após injeções intracerebroventricular (icv) aleatórias de fisostigmina ou salina com intervalo de 48 horas. Os principais achados deste estudo foram que a ECC promoveu aumento da dissipação de calor e redução da variabilidade da pressão arterial sistólica somente no grupo SHR.

**Autorização legal:** Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (Protocolo Número 039/2014).

**Palavras-chave:** Acetilcolina; Hipertensão; Termorregulação.

**Apoio financeiro:** FAPEMIG, CAPES, CNPq e Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM).

**Trabalho selecionado para a JNIC pela instituição:** UFVJM

### **Introdução:**

A administração intracerebroventricular (icv) de fisostigmina, um agente anticolinesterásico de ação central e reversível, tem sido amplamente utilizado para a compreensão da resposta termorregulatória por seus efeitos hipotérmicos. Em ratos, a dissipação de calor ocorre principalmente pela vasodilatação cutânea cauda e aumento do fluxo sanguíneo para a cauda, podendo ser ativada a partir da estimulação colinérgica central por meio da modulação de barorreceptores arteriais.

As respostas termorregulatórias induzidas por estimulação colinérgica central ocorrem em paralelo às mudanças no sistema cardiovascular. O aumento da temperatura da cauda causada por injeção icv de fisostigmina foi correlacionado com alta pressão arterial sistólica (PAS). Há evidências de que as sinapses colinérgicas centrais desempenham papel importante no controle da função neural cardiovascular. Ainda, segundo Pires e colaboradores (2010), o efeito hipertensivo da ativação colinérgica central promove maior ativação de barorreceptores carotídeos que parecem estar diretamente relacionados ao aumento da dissipação de calor induzida pela estimulação colinérgica central. No entanto, não há dados publicados sobre o envolvimento do sistema colinérgico central nas respostas termorregulatórias em modelo que apresenta alteração prévia da sensibilidade dos barorreceptores.

O rato Espontaneamente Hipertenso (SHR) é considerado um bom modelo para o estudo da hipertensão essencial. Tais animais apresentam sensibilidade alterada dos barorreceptores, hiperatividade simpática e disfunção endotelial. Além disso, o SHR apresenta similaridades com humanos

hipertensos, incluindo hemodinâmica em repouso e hiper responsividade simpatoadrenal e cardiovascular a estímulos estressantes. Adicionalmente, o SHR apresenta sensibilidade à estimulação colinérgica central.

Tendo em vista que o controle termorregulatório não somente ocorre paralelamente ao controle do sistema cardiovascular, mas é dependente deste; que a regulação da temperatura corporal pode ser modulada pela ativação dos barorreceptores; que ratos SHR apresentam sensibilidade alterada deste reflexo; o objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos da estimulação colinérgica central sobre as respostas termorregulatórias e cardiovasculares em ratos SHR.

### Metodologia:

Foram usados para o estudo ratos Wistar machos (peso =  $322.4 \pm 16.68\text{g}$ ; PAS =  $128.8 \pm 2.27\text{mmHg}$ ;  $n = 17$ ) e SHR machos (peso =  $249.7 \pm 6.31\text{g}$ ; PAS =  $182.9 \pm 3.37\text{mmHg}$ ;  $n = 17$ ) com 16 semanas de idade. Os ratos foram alojados em gaiolas individuais sob 12-12 h ciclo claro / escuro com temperatura  $22^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$  e tiveram livre acesso à água e ração. Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados sob anestesia com ketamina-Xilazina (116 e 6 mg/kg respectivamente), dose profilática de antibiótico (Pentabiotic, 24000 IU/ kg peso corporal) e analgesia pós-operatória (Fluxin Meglumine, 1,1mg/kg peso corporal). Para a administração central da fisostigmina foi realizado a canulação intracerebroventricular com a utilização de um estereotáxico para pequenos animais (Stoelting CO, Wood Dale, United States) de acordo com as coordenadas: AP = - 0,7 mm; ML = - 1,5 mm; DV = - 4,0 mm (Paxinos G e Watson C, 2007). Após recuperação da estereotaxia, os animais foram adaptados ao uso dos sensores de temperatura da cauda e temperatura do colón por 5 minutos durante três dias consecutivos. Para o registro da pressão arterial pulsátil foi implantado um cateter (PE50 e PE10; Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) na aorta ascendente via artéria carótida esquerda exteriorizado no dorso do rato para permitir livre movimentação. Para o protocolo experimental, a Injeção icv de 2  $\mu\text{L}$  de solução de fisostigmina ( $10 \times 10^{-3}$  M - Grupo Fis) (Sigma, St. Louis, EUA) ou NaCl (0,15 M - Grupo Sal) foi realizada por meio de uma seringa de 5  $\mu\text{L}$  (Hamilton Company, Nevada, EUA) conectada com PE10 a uma agulha injetora de 16,3 mm de comprimento. A temperatura colónica foi mensurada com teletermometro (Yellow Springs Instruments

4600, Ohio, USA) e uma sonda térmica. A temperatura da cauda foi mensurada por meio de um sensor de temperatura (E-val Flex M8, Ellab, Hilleroed, Denmark) acoplado a um mostrador digital. A FC e PAS foram derivadas a partir da pressão arterial pulsátil medida continuamente por meio do cateter implantado na aorta ascendente e conectado ao transdutor do software (LabChart reader v8.1.5, ADInstruments, PowerLab, Spain). Análises no domínio da frequência foram avaliados durante os 15 primeiros minutos do repouso após injeção icv de fisostigmina (período de principal ação da fisostigmina). A transformada rápida de Fourier foi utilizada para obter a densidade espectral dos componentes espectrais da PAS e FC. A normalidade das variáveis foi avaliada pelo teste Shapiro-Wilk. Para a análise de variância na densidade espectral da pressão arterial e frequência cardíaca foi usado (anova) one-way. Para análise do delta das variáveis termorregulatórias e cardiovasculares em função do tempo foi usado anova two-way. O *post-hoc* de Bonferroni foi usado para múltiplas comparações. E as integradas áreas sob a curva (ASC) da temperatura da cauda, PAS e FC foram calculadas pela regra trapezoidal. O nível de significância adotado foi de  $p < 0.05$  para todos os testes.

### Resultados e Discussão:

Como resultados, observou-se aumento do delta ( $\Delta$ : medida após – medida antes) da PAS, seguido de redução do  $\Delta\text{FC}$ , com posterior aumento do  $\Delta\text{Tcauda}$  em ambos os grupos (Wistar fis e SHR fis). Entretanto, somente o grupo SHR fis apresentou redução do  $\Delta\text{Tcolon}$ . Sendo que a magnitude da vasodilatação cutânea, mensurada pelo aumento da  $\text{Tcauda}$  no SHR fis, foi 27,46% maior do que o alcançado pelo Wistar fis no pico máximo, o que pode ter contribuído com a redução significativa da temperatura corporal interna somente no SHR fis. Além disso, as variáveis  $\Delta\text{PAS}$ ,  $\Delta\text{FC}$ ,  $\Delta\text{Tcauda}$  foram fortemente correlacionadas com  $\Delta\text{Tcolon}$  quando realizadas em ambos os grupos (wistar e SHR). Estas mesmas variáveis foram mais fortemente correlacionadas considerando somente o grupo SHR. Adicionalmente, a ECC reduziu a densidade espectral dos componentes da variabilidade cardíaca da PAS, indicando redução da atividade simpática vascular, bem como da atividade cardíaca simpática no grupo SHR após icv de fisostigmina. Além disso, o componente da densidade espectral da variabilidade da FC foi significativamente maior no SHR fis comparado ao Wistar fis indicando melhor

modulação autonômica mediada pelo barorreflexo após estimulação colinérgica central em ratos hipertensos.

### Conclusões:

A ECC em ratos hipertensos em repouso inicia uma sucessão de respostas cardiovasculares e termorregulatórias que resultam em melhor resposta autonômica mediada pelos barorreceptores e redução da atividade simpática vascular. Paralelamente, ocorre aumento da PAS, seguido de redução da FC com consequente aumento da Tcauda e redução da Tcolon, levando à dissipação de calor. Juntos, estes resultados fornecem evidências que ECC promove a perda de calor em ratos hipertensos primariamente por meio de mecanismos não termorregulatórios, mediados pelos barorreceptores arteriais.

### Referências bibliográficas

Besch, H.R., Jr., Murphy, W.R., Hockel, G.M., 1976. Sympathetic nerve activity: role in regulation of blood pressure in the spontaneously hypertensive rat. **Circ Res.** 38, 21-9

Dworkin, B.R., Dworkin, S., Tang, X., 2000. Carotid and aortic baroreflexes of the rat: I. Open-loop steady-state properties and blood pressure variability. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.** 279, R1910-21.

Fonseca, S.F., Teles, M.C., Ribeiro, V.G., Magalhaes, F.C., Mendonca, V.A., Peixoto, M.F., Leite, L.H., Coimbra, C.C., Lacerda, A.C., 2015. Hypertension is associated with greater heat exchange during exercise recovery in a hot environment. **Braz J Med Biol Res.** 48, 1122-9.

Okamoto, K., Aoki, K., 1963. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. **Japanese circulation journal.** 27, 282-293.

Paxinos G, Watson C, 2007. The rat brain in stereotaxic coordinates., Vol., **Elsevier Science & Technology Books.**

Pires, W., Wanner, S.P., La Guardia, R.B., Rodrigues, L.O., Silveira, S.A., Coimbra, C.C., Marubayashi, U., Lima, N.R., 2007. Intracerebroventricular physostigmine enhances blood pressure and heat loss in running rats. **J Physiol Pharmacol.** 58, 3-17.

Pires, W., Wanner, S.P., Lima, M.R., Oliveira, B.M., Guimaraes, J.B., de Lima, D.C., Haibara, A.S., Rodrigues, L.O., Coimbra, C.C., Lima, N.R., 2010. Sinoaortic denervation prevents

enhanced heat loss induced by central cholinergic stimulation during physical exercise. **Brain Res.** 1366, 120-8.

Pires, W., Wanner, S.P., Lima, M.R., Fonseca, I.A., Fumega, U., Haibara, A.S., Coimbra, C.C., Lima, N.R., 2013. Physical exercise performance in temperate and warm environments is decreased by an impaired arterial baroreflex. **PLoS One.** 8, e72005.

Primola-Gomes, T.N., Pires, W., Rodrigues, L.O., Coimbra, C.C., Marubayashi, U., Lima, N.R., 2007. Activation of the central cholinergic pathway increases post-exercise tail heat loss in rats. **Neurosci Lett.** 413, 1-5.

Rodrigues, A., Lima, N., Coimbra, C., Marubayashi, U., 2008. Evidence that exercise-induced heat storage is dependent on adrenomedullary secretion. **Physiology & behavior.** 94, 463-467.

Rodrigues, A.G., Lima, N.R., Coimbra, C.C., Marubayashi, U., 2004. Intracerebroventricular physostigmine facilitates heat loss mechanisms in running rats. **J Appl Physiol** (1985). 97, 333-8.

Waki, H., Katahira, K., Polson, J.W., Kasparov, S., Murphy, D., Paton, J.F., 2006. Automation of analysis of cardiovascular autonomic function from chronic measurements of arterial pressure in conscious rats. **Exp Physiol.** 91, 201-13.

Yoshimoto, T., Eguchi, K., Sakurai, H., Ohmichi, Y., Hashimoto, T., Ohmichi, M., Morimoto, A., Yamaguchi, Y., Ushida, T., Iwase, S., Sugeno, J., Kumazawa, T., 2011. Frequency components of systolic blood pressure variability reflect vasomotor and cardiac sympathetic functions in conscious rats. **J Physiol Sci.** 61, 373-83.

Kai, H., Kudo, H., Takayama, N., Yasuoka, S., Kajimoto, H., Imaizumi, T., 2009. Large blood pressure variability and hypertensive cardiac remodeling--role of cardiac inflammation. **Circulation journal: official journal of the Japanese Circulation Society.** 73,2198-2203  
Judy, W.V., Watanabe, A.M., Henry, D.P.,