

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
Fisiologia e Farmacologia

**ESTUDO DA CONTRIBUIÇÃO DA VIA ENTRE O HIPOTÁLAMO
DORSOMEDIAL E NÚCLEO DO TRATO SOLITÁRIO (HDM-NTS) NAS
RESPOSTAS CARDIOVASCULARES E COMPORTAMENTAIS DO
QUIMIORREFLEXO EM RATOS NÃO ANESTESIADOS**

Renata de Bessa Nascimento

Belo Horizonte - MG

2012

Renata de Bessa Nascimento

**ESTUDO DA CONTRIBUIÇÃO DA VIA ENTRE O HIPOTÁLAMO DORSOMEDIAL E
NÚCLEO DO TRATO SOLITÁRIO (HDM-NTS) NAS RESPOSTAS
CARDIOVASCULARES E COMPORTAMENTAIS DO QUIMIORREFLEXO EM RATOS
NÃO ANESTESIADOS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia, Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Andréa Siqueira Haibara

AGRADECIMENTOS



Gostaria de agradecer inicialmente a Deus, que me acompanha em todos os momentos de minha vida, que me fortalece, me ilumina e me inspira.

Aos meus pais, alicerces da minha vida, que apoiaram, acompanharam (mesmo a distância) e torceram sempre para que eu alcançasse meus objetivos.

A minha orientadora Andrea, obrigada por acreditar em mim desde o início, por me ensinar cada passo que eu teria que dar, por não me deixar desistir diante das dificuldades (que não foram poucas! É verdade), por ser minha grande parceira nos dias de cirurgias, de experimentos, de envios de resumos, de discussões de resultados. E posso dizer com muita certeza que, se hoje estou completando essa importante etapa da minha vida, uma grande parcela desse mérito deve ser creditado a ela.

Gostaria de agradecer também a todos do laboratório de hipertensão desde os queridos alunos de iniciação científica e estagiários que, ao aprenderem um pouco comigo na verdade me ensinaram muito; passando pelos alunos de mestrado e doutorado, grandes colegas, incentivadores da minha perseverança, cuja torcida se fez sempre presente para que cada animal se tornasse um acerto, como também aos professores Robson, Maria José, e Marco Antônio que me sempre me ajudaram de uma forma muito solícita, que compreenderam esse meu jeito um pouco expansiva e que, dessa forma, foram a cada dia tornando nossa convivência mais próxima.

Meu muito obrigado também ao Zezé, nosso querido mestre da cirurgia, atencioso com os alunos e cuidadoso com os animais. Sempre disposto a ajudar. No meu caso, companhia diária durante esses anos, peça fundamental nos meus experimentos em dias que, com certeza, precisariam ter mais de 24 horas.

Agradeço aos amigos que me apoiaram sempre, que torceram para dar certo e que sofreram quando isso não ocorria, que me ajudaram nas mais diversas ocasiões pelo simples fato de serem amigos, que leram comigo e me corrigiram, que em algumas ocasiões cuidaram dos meus animais, que operaram ou fatiaram histologias por mim, que fizeram materiais cirúrgicos, que me deixaram apagar a luz e que fizeram silêncio durante os experimentos, aos que rezaram, que oraram, e principalmente aos que me escutaram (e como escutaram!). Obrigada!

Agradeço também aos animais de pesquisa, que deram suas vidas em prol de um objetivo maior e que ao longo da vida eu, como veterinária e posteriormente como pesquisadora, aprendi a respeitar e valorizar.

Por último, eu gostaria de agradecer de forma especial ao Pedro, meu grande amor, por tudo! Obrigada pelo carinho, pela paciência, pelo apoio incondicional, por entender meus atrasos em dias de experimento, por compreender também meus momentos difíceis, mas principalmente por compartilhar comigo desse sonho de ser mestre, de ser pesquisadora.

A todos vocês,

Muito Obrigada.

Renata Bessa

ÍNDICE

1. RESUMO	01
2. ABSTRACT	04
3. INTRODUÇÃO	07
3.1. A importância dos quimiorreceptores no controle da pressão arterial	08
3.2. NTS e a neurotransmissão do quimiorreflexo	09
3.3. O papel do hipotálamo dorsomedial no quimiorreflexo	13
4. OBJETIVOS	17
4.1. Objetivo geral	18
4.2. Objetivo específicos	18
5. MATERIAL E MÉTODOS	19
5.1. Animais	20
5.2. Implante de cânulas-guia em direção ao NTS e HDM	20
5.3. Canulação da artéria e veias femorais	21
5.4. Estimulação dos quimiorreceptores periféricos	22
5.5. Registro da pressão arterial e da frequência cardíaca	23
5.6. Análise da resposta comportamental	23
5.7. Microinjeção de drogas no NTS e HDM	24
5.8. Drogas utilizadas	25
5.9. Histologia	25
5.10. Análise estatística	26
5.11. Protocolos experimentais	26
5.11.1. Efeito do bloqueio dos receptores purinérgicos do NTS sobre as respostas cardiovasculares e comportamentais induzidas pela estimulação dos receptores NMDA do HDM	26
5.11.2. Efeito do bloqueio dos receptores purinérgicos do NTS sobre as respostas cardiovasculares e comportamentais induzidas pela estimulação dos receptores não-NMDA do HDM	27
5.11.3. Efeito do bloqueio sequencial dos receptores glutamatérgicos do HDM e do	

NTS sobre as respostas cardiovasculares do quimiorreflexo	28
6. RESULTADOS	30
6.1. Efeito do bloqueio dos receptores purinérgicos do NTS sobre as respostas cardiovasculares e comportamentais induzidas pela estimulação dos receptores NMDA do HDM	31
6.2. Efeito do bloqueio dos receptores purinérgicos do NTS sobre as respostas cardiovasculares e comportamentais induzidas pela estimulação dos receptores não-NMDA do HDM	37
6.3. Efeito do bloqueio sequencial dos receptores glutamatérgicos do HDM e do NTS sobre as respostas cardiovasculares do quimiorreflexo	43
6.4. Análise histológica	47
7. DISCUSSÃO	49
8. SUMÁRIO E CONCLUSÕES	60
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63

1 - RESUMO

Estudos em animais anestesiados mostraram que o aminoácido excitatório L-glutamato participa da neurotransmissão do quimiorreflexo no núcleo do trato solitário (NTS). Entretanto, em animais não anestesiados a neurotransmissão do quimiorreflexo no NTS depende não apenas dos receptores glutamatérgicos, mas também de receptores purinérgicos. A origem do ATP liberado no NTS ainda não é conhecida, mas estudos sugerem que a estimulação da área hipotalâmica de defesa (AHD) libera ATP no NTS e este facilita as respostas cardiorrespiratórias do quimiorreflexo. Em estudos de nosso laboratório em animais não anestesiados observou-se que o hipotálamo dorsomedial (HDM), região integrante das AHD, está envolvido na integração do quimiorreflexo uma vez que o bloqueio glutamatérgico do HDM reduziu a resposta pressora e aboliu a resposta comportamental deste reflexo. Este estudo teve como objetivo avaliar se a ativação do HDM de fato modula, direta ou indiretamente, a atividade dos neurônios do NTS, facilitando a resposta quimiorreflexa. Objetivando a elucidação da interação HDM-NTS, este estudo avaliou em animais não anestesiados, o papel dos receptores purinérgicos do NTS na neurotransmissão das respostas cardiovasculares e comportamentais induzidas pela microinjeção de agonistas NMDA e não-NMDA do HDM. Também avaliamos o efeito do bloqueio conjunto dos receptores glutamatérgicos do HDM e do NTS sobre as respostas cardiovasculares do quimiorreflexo. Para isso foram utilizados ratos Wistar com peso entre 270-320g. Os animais foram submetidos à cirurgia estereotáxica para implante bilateral de cânulas-guia em direção ao HDM e ao NTS, e canulação da artéria e veia femoral, para mensuração dos parâmetros cardiovasculares e administração de drogas, respectivamente. Os experimentos foram filmados e a resposta comportamental foi avaliada pela atividade locomotora do animal. As respostas cardiovasculares induzidas pela microinjeção unilateral do agonista NMDA (10 pmol/100 nl) ou do agonista não-NMDA AMPA (3 pmol/100 nl) no HDM foram avaliadas antes e 10, 20 e 30 minutos após o bloqueio bilateral dos receptores purinérgicos do NTS com o antagonista Suramin (4 nmol/100 nl). A estimulação do HDM com agonista NMDA promoveu aumento da pressão arterial ($+15 \pm 2$ mmHg), taquicardia ($+80 \pm 9$ bpm) e resposta comportamental de locomoção (187 ± 46 cm). O bloqueio dos receptores purinérgicos do NTS reduziu significativamente a resposta pressora aos 20 e 30 min ($+2 \pm 2$ e 6 ± 3 mmHg, respectivamente) e a resposta taquicárdica aos 10, 20 e 30 min ($+27 \pm 13$; 21 ± 22 e 28 ± 11 bpm, respectivamente), bem como a resposta comportamental (8 ± 3 ; 25 ± 9 e 26 ± 15 cm) induzidas pelo agonista NMDA microinjetado no HDM. A estimulação do HDM com agonista AMPA também promoveu aumento da pressão arterial ($+16 \pm 1$ mmHg), taquicardia ($+104 \pm 12$ bpm) e aumento da atividade locomotora (276 ± 55 cm). O bloqueio dos receptores purinérgicos do NTS reduziu a resposta pressora induzida pelo agonista não-NMDA microinjetado no HDM apenas aos 10 min ($+6 \pm 2$ mmHg). A resposta comportamental do AMPA também foi reduzida aos 10 e 20 min (67 ± 26 e 39 ± 15 cm, respectivamente) após o Suramin no NTS. O quimiorreflexo foi estimulado cianeto de potássio (KCN, 40-80 μ g/0,1 ml, i.v.) e as respostas avaliadas antes, 5 min após a microinjeção bilateral de Kinurênico no HDM (2,7 nmol/100 nl) e

nos tempos 5, 10 e 20 min após a microinjeção bilateral de Kinurênico no NTS (10 nmol/100nl). A estimulação do quimiorreflexo promoveu aumento da pressão arterial ($+38 \pm 5$ mmHg) e bradicardia (-174 ± 28 bpm). Como esperado, o bloqueio glutamatérgico do HDM reduziu a resposta pressora ($+23 \pm 4$ mmHg) e não alterou a resposta bradicárdica (-178 ± 43 bpm) do quimiorreflexo. O bloqueio sequencial dos receptores glutamatérgicos do NTS não promoveu redução adicional da resposta pressora (5 min: $+17 \pm 6$; 10 min: $+20 \pm 6$ e 20 min: $+25 \pm 7$ mmHg) ao passo que a bradicardia foi reduzida aos 5 e 10 min (-28 ± 17 e -4 ± 15 bpm, respectivamente) como esperado após o bloqueio glutamatérgico do NTS. Estes resultados sugerem que as respostas cardiovasculares e comportamentais induzidas pela estimulação dos receptores glutamatérgicos do HDM, particularmente dos receptores NMDA, podem depender de receptores purinérgicos do NTS. Ao passo que a liberação de ATP no NTS durante a estimulação do quimiorreflexo parece não depender diretamente da estimulação dos receptores glutamatérgicos do HDM.

2 - ABSTRACT

Studies in anesthetized animals have shown that the excitatory amino acid L-glutamate participates in the neurotransmission of the chemoreflex into the nucleus tractus solitarius (NTS). However, in conscious animals, the chemoreflex neurotransmission into the NTS is dependent not only the glutamatergic receptors but also purinergic receptors. The origin of the ATP released into the NTS is not yet known, but studies suggest that stimulation of the hypothalamic defense area (HDA) releases ATP into the NTS. This ATP released into NTS facilitates the chemoreflex cardiorespiratory responses. Previous studies from our laboratory, performed in conscious animals, showed that the dorsomedial hypothalamus (DMH), an integral part of HAD, is involved in the integration of the chemoreflex, since the glutamatergic blockade of the DMH reduced the pressor response and abolished the behavioral response of this reflex. The aim of the present study was evaluate if the activation of the DMH modulates the NTS neurons activity, facilitating the chemoreflex response. This study evaluated the role of purinergic receptors of the NTS in the neurotransmission of the cardiovascular and behavioral responses induced by microinjections of the NMDA or non-NMDA agonists into the DMH. This study also evaluated, in conscious rats, the effect of glutamatergic blockade of DMH and NTS on cardiovascular chemoreflex responses. Male Wistar rats were used, weighting 270-320g. The animals were submitted to stereotaxic surgery to bilateral implant of guide cannulas in direction to DMH and NTS, and also submitted to cannulation of femoral artery and vein, for measurement of cardiovascular parameters and systemic drug injections, respectively. The experiments were recorded by a webcam and the behavioral response was evaluated by the locomotor activity of the animal. The cardiovascular responses induced by the NMDA agonist (10 pmol/100 nl) or the non-NMDA AMPA agonist (3 pmol/100 nl) microinjections into the DHM were evaluated before and 10, 20 and 30 min after the bilateral blockade of purinergic receptors of the NTS with the antagonist Suramin (4 nmol/100 nl). Microinjection of NMDA into the DMH produced increase in arterial pressure ($+15 \pm 2$ mmHg), tachycardia ($+80 \pm 9$ bpm) and behavioral response (187 ± 46 cm). The blockade of the purinergic receptors was able to significantly reduced the pressor response on 20 and 30 min ($+2 \pm 2$ and 6 ± 3 mmHg, respectively), the tachycardic response in all the period studied ($+27 \pm 13$; 21 ± 22 and 28 ± 11 bpm, respectively) and the locomotor activity (8 ± 3 ; 25 ± 9 and cm) induced by the NMDA agonist microinjected into the DMH. The stimulation of the DMH with the AMPA agonist also produced increase in arterial pressure ($+16 \pm 1$ mmHg), tachycardia ($+104 \pm 12$ bpm) and behavioral response (276 ± 55 cm). The blockade of purinergic receptors of the NTS was able to reduce only the pressor response induced by the non-NMDA agonist microinjected into the DHM on 10 min ($+6 \pm 2$ mmHg). The locomotor activity induced by AMPA also was reduced at 10 and 20 min (67 ± 26 and 39 ± 15 cm, respectively) after Suramin into the NTS. The chemoreflex was stimulated by potassium cyanide (KCN, 40-80 μ g/0,1 ml, i.v.) and the reflex responses evaluated before, 5 min after the bilateral microinjection of

kynurenic (2,7 nmol/100 nl) into the DMH and 5, 10 and 20 min after the bilateral microinjection of kynurenic (10 nmol/100nl) into the NTS. The chemoreflex stimulation produced increase of arterial pressure ($+38 \pm 5$ mmHg) and bradycardia (-174 ± 28 bpm). As expected, the glutamatergic blockade of the DMH reduced the pressor response ($+23 \pm 4$ mmHg) and produced no changes on bradycardic response (-178 ± 43 bpm) of the chemoreflex. The sequential blockade of glutamatergic receptors of the NTS produced no additional reduction in the pressor response (5 min: $+17 \pm 6$; 10 min: $+20 \pm 6$ and 20 min: $+25 \pm 7$ mmHg), but reduced the bradycardia 5 and 10 min (-28 ± 17 and -4 ± 15 bpm, respectively) after kynurenic microinjection into the NTS. These data suggest that the cardiovascular and behavioral responses induced by stimulation of glutamatergic receptors into the DMH, particularly the NMDA receptors, seem to be dependent of purinergic receptors of the NTS. However, the release of ATP into the NTS during chemoreflex stimulation seems not directly dependent on stimulation of glutamatergic receptors of the DMH.

3 - INTRODUÇÃO

O sistema circulatório, sob controle do sistema nervoso central (SNC), tem papel fundamental no controle da homeostase do organismo, controlando o fornecimento de oxigênio e nutrientes para todas as células e tecidos. A regulação neural do sistema cardiovascular depende da ativação de vários grupos de sensores localizados na periferia. Esses sensores geram informações que são enviadas ao SNC, e este leva a modulação do sistema nervoso autônomo (SNA) por meio de seus componentes simpático e parassimpático. Tais componentes atuam como dispositivo de ajuste da pressão arterial, no sentido de manter constante a composição do meio interno. Entre os sensores periféricos podemos destacar os barorreceptores arteriais, os receptores cardiopulmonares e os quimiorreceptores periféricos (Loewy e Spyer, 1990).

3.1 - A importância dos quimiorreceptores no controle da pressão arterial.

Os quimiorreceptores são células altamente especializadas, capazes de detectar variações da pressão parcial de oxigênio, de dióxido de carbono e da concentração hidrogeniônica do sangue (Biscoe e Sampson, 1967; Biscoe e cols., 1969). Os quimiosensores estão distribuídos em corpúsculos carotídeos e aórticos, localizados bilateralmente na bifurcação da artéria carótida comum (quimiorreceptores carotídeos) ou em pequenos corpúsculos espalhados entre o arco aórtico e a artéria pulmonar (quimiorreceptores aórticos) (Sapru e Krieger, 1977). Entretanto, de acordo com Easton e Howe (1983) os corpúsculos aórticos estão geralmente ausentes no coelho, rato e camundongo que são modelos experimentais amplamente usados no estudo do quimiorreflexo.

Estudos anteriores (Bernthal e Woodcock, 1951; Franchini e Krieger, 1993 e Haibara e cols., 1995) demonstraram que a estimulação dos quimiorreceptores

periféricos promove reflexamente, além de taquipnéia, aumento da pressão arterial e bradicardia. Dessa forma, o papel fisiológico dos quimiorreceptores periféricos está relacionado com a promoção de ajustes ventilatórios e cardiovasculares, proporcionando a manutenção da composição dos gases sanguíneos em níveis ideais, bem como uma pressão de perfusão sanguínea adequada para todos os tecidos.

Em estudos anteriores, realizados em ratos (Franchini e Krieger, 1993) foi verificado que os efeitos pressor e bradicárdico, assim como o aumento da resistência periférica e da atividade simpática induzidos pela estimulação dos quimiorreceptores carotídeos, foram sensivelmente reduzidos nos animais anestesiados com cloralose, pentobarbital sódico ou halotano. Esses resultados indicam que os diferentes anestésicos prejudicam ou atenuam o quimiorreflexo de forma importante. Em função desses resultados fica evidente que o emprego dos diferentes anestésicos pode alterar as respostas do quimiorreflexo, e desta forma torna-se importante o estudo deste reflexo em animais não anestesiados. Um importante aspecto que tem sido considerado é que a ativação dos quimiorreceptores periféricos promove, além de respostas cardiovasculares e ventilatórias, uma importante resposta comportamental, a qual obviamente é ausente em animais anestesiados que é caracterizada por uma reação de fuga, decorrente da ativação de diferentes áreas prosencefálicas e mesencefálicas (Marshall, 1987; Franchini e Krieger, 1993).

3.2 - NTS e a neurotransmissão do quimiorreflexo.

Foi mostrado que células quimiossensíveis, quando estimuladas, deflagram potenciais de ação que se propagam pelo nervo do seio carotídeo em direção ao

sistema nervoso central (Gonzalez e cols., 1994). Estas aferências realizam a sua primeira sinapse no núcleo do trato solitário (NTS) (Mifflin, 1993). O NTS pode ser considerado uma das mais importantes estações sinápticas do tronco cerebral que integra informações aferentes do sistema cardiovascular, produzindo ajustes autonômicos e ventilatórios adequados às diferentes situações fisiológicas (Spyer, 1990).

O NTS é constituído por grupos heterogêneos de neurônios, situados na porção dorsomedial do bulbo. Estende-se rostrocaudalmente como uma coluna bilateral, desde a porção caudal do núcleo facial, local onde as duas estruturas fundem-se para formar uma estrutura mediana que continua caudalmente até aproximadamente o nível caudal da decussação piramidal (Blessing e cols., 1982). Divide-se em rostral, intermediário e comissural, de acordo com a proximidade da área postrema. É um importante centro de integração do controle cardiovascular (Blessing, 1997). As regiões intermediária e comissural do NTS podem ser consideradas como os subnúcleos envolvidos no controle cardiovascular, pois recebem as aferências dos barorreceptores e quimiorreceptores respectivamente (Nathan e Reis, 1977; Sato e cols., 2001).

Estudos neuroanatômicos (Ross e cols., 1985; Aicher e cols., 1996) e farmacológicos (Urbanski e Sapru, 1988) mostram a existência de uma via excitatória direta do NTS para a área bulbar ventrolateral rostral (RVLM). Estudos da desinibição dos neurônios pré-motores do RVLM mostraram que esse grupo de células é capaz de gerar aumento substancial da atividade simpática e da pressão arterial (Blessing e cols., 1982). Também tem sido demonstrado por estudos de Stuesse e Fish (1984), que o núcleo ambíguo (NA), uma área que constitui a origem das fibras pré-ganglionares parassimpáticas (Stuesse e Powell, 1982), recebe

projeções diretas do NTS. Dessa forma, é sugerido que as vias neurais relacionadas à ativação dos quimiorreceptores periféricos envolvam a ativação de projeções do NTS tanto para o RVLM, determinando em aumento da atividade simpática vascular e conseqüentemente em aumento da pressão arterial, quanto para o NA, determinando em aumento da atividade eferente parassimpática, e conseqüente bradicardia. (figura I).

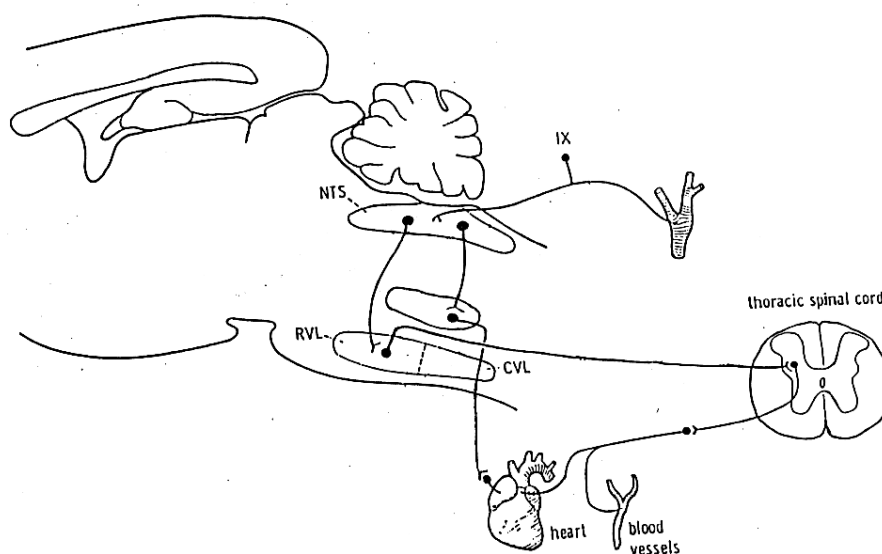


Figura I: Modelo esquemático da circuitaria neural do quimiorreflexo. As aferências dos quimiorreceptores carotídeos terminam no NTS. Neurônios do NTS projetam-se para dois sítios do bulbo: neurônios pré-ganglionares parassimpáticos do NA e neurônios bulbo-espinhais da RVL. Estes últimos, por sua vez, projetam-se diretamente para os neurônios pré-ganglionares simpáticos da CIML. NTS: núcleo do trato solitário; NA: núcleo ambiguus; RVL: área bulbar ventrolateral rostral; CIML: coluna intermédial lateral; IX: nervo glossofaríngeo; Nor: noradrenalina; Ach: acetilcolina. (Adaptado de Reis e cols., 1994).

O aminoácido excitatório (AAE) L-glutamato é considerado o mais importante neurotransmissor liberado no NTS após ativação dos reflexos cardiovasculares (Talman e cols., 1980; Talman e cols., 1989; Vardhan e cols., 1993; Zhang e Mifflin, 1993). Estudos de Vardhan e cols. (1993) mostraram que os receptores de AAes possuem importante papel na transmissão de sinais aferentes do barorreflexo e do quimiorreflexo no NTS. Nesse estudo foi observado que o bloqueio dos receptores

de AAEs no NTS de ratos anestesiados aboliu a resposta pressora do quimiorreflexo (Vardhan e cols., 1993). No entanto, em ratos não anestesiados foi observado que o componente simpatoexcitatório do quimiorreflexo (resposta pressora) não é alterado após o antagonismo dos receptores AAEs (Haibara e cols., 1999; Machado e Bonagamba, 2005; Braga e Machado, 2006). Esses dados sugerem que a neurotransmissão do componente simpatoexcitatório no NTS de ratos não anestesiados envolvem outros neurotransmissores, além do L-glutamato. Nesse sentido, foi observada a existência de interação entre o ATP e o glutamato nos neurônios do NTS (Kato e Shigetomi, 2001; Jin e cols., 2004; Shigetomi e Kato, 2004).

A participação do ATP e da adenosina como moléculas de sinalização central foi sugerida inicialmente por Burnstock (1972), dando início as investigações sobre a neurotransmissão purinérgica no SNC. Foi mostrado que a microinjeção do ATP no NTS caudal de ratos não-anestesiados promove respostas pressora e taquipnéica semelhantes àquelas do quimiorreflexo (de Paula e cols., 2004; Antunes e cols., 2005a; Antunes e cols., 2005b). Em ratos anestesiados o antagonismo dos receptores purinérgicos do subtipo P2 bloqueou seletivamente os impulsos excitatórios dos quimiorreceptores periféricos para os neurônios do NTS, demonstrando assim a participação do ATP na mediação das vias do quimiorreflexo a partir de seus sensores periféricos (Paton e cols., 2002). Apesar das evidências em favor à participação do ATP na neurotransmissão do quimiorreflexo no NTS, o bloqueio dos receptores purinérgicos no NTS de animais não-anestesiados não bloqueou as respostas cardiovasculares induzidas pela estimulação dos quimiorreceptores periféricos (Braga e cols., 2007). Neste mesmo estudo, Braga e cols. (2007) mostraram em animais não-anestesiados que o bloqueio simultâneo dos

receptores glutamatérgicos e purinérgicos no NTS promove redução significativa da resposta pressora induzida pela estimulação do quimiorreflexo. Esses resultados sugerem que, diferente do que é observado em animais anestesiados, a neurotransmissão do quimiorreflexo no NTS depende tanto do glutamato quanto do ATP.

3.3 - O papel do hipotálamo dorsomedial no quimiorreflexo.

A ativação de áreas hipotalâmicas de defesa (AHD) pelos quimiorreceptores tem sido considerada parte integrante da resposta a hipóxia sistêmica (Marshall e Metcalfe, 1988). Estudos mostraram que a estimulação dos quimiorreceptores periféricos pode induzir respostas autonômicas e comportamentais associadas a estados de alerta e reação de defesa (Hilton e cols., 1982; Marshall e cols., 1994). Outros estudos mostraram ainda que a estimulação destas áreas pode facilitar as respostas cardiovasculares e respiratórias evocadas pelo quimiorreflexo. (Hilton & Joels, 1965; Silva-Carvalho et al. 1993, 1995).

Estudos anatômicos mostraram a existência de conexões entre o NTS e os núcleos do hipotálamo (Ricardo e Koh, 1978; ter Horst e Luiten, 1986). O hipotálamo nos mamíferos é conhecido por participar da integração de respostas comportamentais, neuroendócrinas termogênicas e cardiorespiratórias a diferentes situações, como medo, defesa e estresse (Bailey e DiMicco, 2001; Stotz-Potter e DiMicco 1996 A e B; DiMicco e cols., 2002). Dentre os núcleos e sub-regiões hipotalâmicas que organizam tais respostas, podem se destacar núcleo paraventricular (Swanson e Sawchenko, 1980; Blair e cols., 1996), área hipotalâmica lateral (Bernardis e Bellinger, 1996), hipotálamo posterior (Barron e Heesch, 1990), área pré-óptica medial (Bazzett e cols., 1992) e hipotálamo dorsomedial (DiMicco e

cols., 2002).

O hipotálamo dorsomedial (HDM) localiza-se adjacientemente ao terceiro ventrículo, circundado lateralmente pela região perifornical e caudalmente pelo núcleo periventricular (Thompson e cols., 1996) e é considerado parte da chamada área hipotalâmica de defesa (AHD). (Yardley & Hilton, 1986). O HDM ainda é subdividido em porção difusa (DMD) e compacta (DMC) (Paxinos e Watson, 1986), como pode ser observado na figura II.

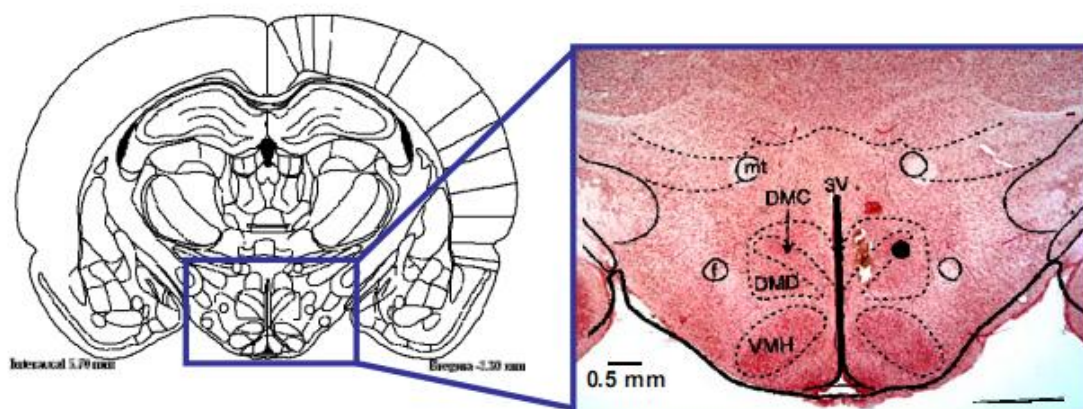


Figura II. O Hipotálamo dorsomedial e suas sub-regiões: porção compacta (DMC) e difusa (DMD). 3V – terceiro ventrículo. Adaptado de PAXINOS G., WATSON C. The rat brain in stereotaxic coordinates. 1986.

Estudos têm demonstrado que a porção compacta do HDM é mais responsiva à estimulação pela microinjeção de aminoácidos excitatórios e de antagonistas de receptores GABA_A (Soltis e DiMicco, 1991; De Novellis e cols., 1995). A ativação do HDM através de microinjeções de antagonistas GABA_A, como a bicuculina, ou agonistas de AAEs (Wible e cols., 1988; Soltis e DiMicco, 1991) resulta em aumento significativo da frequência cardíaca devido à elevação na atividade simpática do nervo cardíaco (Cao e cols., 2004), aumento de atividade simpática para o nervo renal e elevação da pressão arterial (Fontes e cols., 2001).

Um importante indicativo da participação do HDM nas respostas cardiovasculares à ativação do quimiorreflexo foi demonstrado por Queiroz e cols. (2011), uma vez que a microinjeção bilateral de lidocaína no HDM reduziu significativamente a magnitude da resposta pressora induzida pela ativação do quimiorreflexo.

Tem sido relatada a presença de receptores de aminoácidos excitatórios em níveis significativos no HDM (Meeker e cols., 1994). Estudo recente mostrou que a microinjeção de antagonista de receptores de AAEs, ácido kinurênico, no HDM de animais não-anestesiados reduz em 44% a resposta pressora e abole a resposta comportamental do quimiorreflexo, sugerindo que a ativação dos receptores de aminoácidos excitatórios do HDM pode modular direta ou indiretamente a resposta quimiorreflexo (Queiroz e cols., 2011).

Foi observado por Hilton e cols (1965) que a estimulação elétrica das áreas hipotalâmicas de defesa (AHD) facilitavam os efeitos cardiorrespiratórios do quimiorreflexo. Posteriormente (Silva-Carvalho e cols., 1993; Silva-Carvalho e cols., 1995) mostraram que uma parte da facilitação desses efeitos pode ocorrer devido à modulação excitatória da AHD sobre a atividade dos neurônios do NTS que recebem a informação aferente dos quimiorreceptores. Estudos mais recentes mostram ainda que a estimulação elétrica da AHD promove a liberação de ATP no NTS (Spyer e Thomas, 2000; Dale e cols., 2002).

Considerando que os anestésicos deprimem tanto a atividade das áreas hipotalâmicas (Marshall, 1987) quanto as respostas reflexas dos quimiorreceptores (Franchini e Krieger, 1993), é possível que parte das diferenças encontradas nos estudos da neurotransmissão do quimiorreflexo no NTS em ratos anestesiados e

não-anestesiados seja decorrente da menor atividade desta modulação hipotalâmica sobre os neurônios do NTS.

Dessa forma, nossa hipótese é que em animais não-anestesiados a resposta pressora do quimiorreflexo dependa do L-glutamato, liberado a partir das aferências primárias dos quimiorreceptores periféricos no NTS, bem como do ATP, liberado a partir da via neural que se projeta do HDM para o NTS. Neste contexto o presente estudo pretende avaliar a possível influência dos receptores purinérgicos no eixo HDM-NTS, bem como reavaliar o papel dos receptores glutamatérgicos do NTS na resposta cardiovascular do quimiorreflexo, em animais com os receptores glutamatérgicos do HDM também bloqueados.

4 - OBJETIVOS

4.1 - Objetivo geral:

Avaliar a contribuição da via hipotálamo dorsomedial - núcleo do trato solitário (HDM-NTS) nas respostas reflexas à estimulação dos quimiorreceptores periféricos em ratos não anestesiados.

4.2 - Objetivos específicos:

- Avaliar se as respostas cardiovasculares e comportamentais induzidas pela estimulação dos receptores glutamatérgicos do HDM (receptores NMDA e não-NMDA) dependem de receptores purinérgicos do NTS.

- Avaliar o papel dos receptores glutamatérgicos do NTS nas respostas cardiovasculares do quimiorreflexo em animais com os receptores glutamatérgicos do HDM também bloqueados.

5 - MATERIAL E MÉTODOS

5.1 – Animais

Neste trabalho foram utilizados ratos Wistar, com peso entre 270 a 330 gramas, fornecidos pelo Centro de Bioterismo (CEBIO) do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. Os animais foram mantidos em ambiente adequado com temperatura (22 ± 2 °C) e luminosidade controladas (14 h luz/ 10 h escuro), alimentados com ração e água à vontade. Os procedimentos experimentais utilizados neste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da UFMG (protocolo nº 81/2010).

5.2 – Implante de cânulas-guia em direção ao NTS e HDM

Utilizando um aparelho estereotáxico para animais de pequeno porte (Stoelting, IL, USA) cânulas-guia foram implantadas em direção ao NTS e HDM. Para isso, os animais foram anestesiados com tribromoetanol (250mg/kg - Aldrich Chemical Company, WI, USA), submetidos à tricotomia da região dorsal da cabeça, posicionados no estereotáxico e por meio de duas barras auriculares a cabeça foi fixada. Após a assepsia da pele com solução de álcool iodado, o anestésico local lidocaína contendo vasoconstritor (Xylestesin, Cristália, SP, Brasil) foi injetado subcutaneamente na região do escalpo a ser aberta. A seguir, foi realizada uma incisão longitudinal na pele e tecido subcutâneo expondo-se a região da calota craniana. As cânulas-guia (15 mm) foram confeccionadas a partir de agulhas hipodérmicas de aço inoxidável (25 x 6 mm), posicionadas em pequenos suportes e posteriormente fixados na torre do estereotáxico. A torre do estereotáxico foi colocada em posição vertical (angulação zero) e a cabeça do animal ajustada até que os pontos bregma e lâmbda da calota craniana estivessem nivelados. A partir do bregma foram realizadas as leituras dos parâmetros ântero-posterior (AP), latero-

lateral (LL) e dorso-ventral (DV). As coordenadas estereotáxicas foram determinadas a partir do Atlas de Paxinos e Watson (1986). Para o NTS foram utilizadas as seguintes coordenadas: AP: -14,0 mm, LL: -0,5mm e DV: -7,9mm. Para o HDM foram utilizadas as coordenadas: AP: -3,0mm, LL: -0,6mm e DV: -7,0mm. Determinados os pontos de introdução das cânulas-guia no NTS e HDM, foi realizada a trepanação da calota craniana com o auxílio de uma broca odontológica esférica acoplada a um motor de baixa rotação. As cânulas-guia foram então fixadas ao crânio do animal por meio de resina acrílica de uso odontológico e de pequenos parafusos de aço inox, afixados na calota craniana previamente às leituras das coordenadas estereotáxicas. Após a completa fixação das cânulas-guia, a torre do estereotáxico foi removida e com o objetivo de se evitar a obstrução das cânulas foi introduzido nas mesmas um mandril de aço inoxidável (15 mm). Como medida profilática, após a cirurgia estereotáxica todos os animais receberam 0,2 ml (i.m.) de pentabiótico veterinário (Fort Dodge, SP, Brasil) e 0,1 ml (s.c.) do analgésico-antiinflamatório flunixinina meglumina (2,2 mg/Kg, s.c. - Banamine, Schering-Plough, RJ, Brasil). Os animais foram mantidos em caixas coletivas, com ração e água à vontade, em salas com temperatura e luminosidade controladas por um período de 3 a 5 dias para recuperação pós-cirúrgica.

5.3 - Canulação da artéria e veias femorais

Um dia antes do experimento foi realizada a canulação da artéria e veia femoral. As cânulas utilizadas foram confeccionadas a partir de um tubo de polietileno PE-10 (4 cm para a artéria e 2 cm para veia) soldado a outro tubo de polietileno PE-50 (15 cm). Antes de serem implantadas, as cânulas foram preenchidas com solução fisiológica e obstruídas na extremidade livre do PE-50 com

pinos de metal. Com os animais sob anestesia pelo tribromoetanol (250mg/kg), os animais tiveram canuladas a artéria femoral e as veias femorais. Uma vez implantadas, as cânulas foram dirigidas subcutaneamente para a cintura escapular com auxílio de um trocater, onde foram exteriorizadas e fixadas com linha de sutura. A cânula arterial foi utilizada para registro direto da pressão arterial e da frequência cardíaca e as cânulas venosas para administração sistêmica de drogas. Após a canulação os animais foram colocados em caixas individuais com ração e água à vontade.

5.4 - Estimulação dos quimiorreceptores periféricos

Para a estimulação dos quimiorreceptores periféricos foi utilizada solução de cianeto de potássio (KCN 40 ou 80 $\mu\text{g}/0,1$ ml/rato), a qual foi injetada através da cânula venosa previamente implantada. O cianeto é descrito na literatura como um estímulo potente para os quimiorreceptores periféricos (Biscoe e Duchon, 1990; Gonzáles e cols., 1994; Franchini e Krieger, 1993), atuando por inibição da enzima citocromo-oxidase da cadeia respiratória, impedindo a redução do oxigênio, e portanto a sua utilização pela célula. Como consequência ocorre um déficit energético celular promovendo uma hipóxia citotóxica, a qual é detectada pelas células quimiossensíveis do corpúsculo carotídeo, ativando o quimiorreflexo. As respostas cardiovasculares e respiratórias observadas são dependentes da ativação das células do corpúsculo carotídeo uma vez que a ligadura da artéria que irriga o corpúsculo carotídeo abole essas respostas. (Franchini e Krieger, 1993; Haibara e cols, 1995).

5.5 - Registro da pressão arterial e da frequência cardíaca

O registro da pressão arterial e da frequência cardíaca foi realizado no dia seguinte ao da canulação, em animais não-anestesiados e com livre movimentação. Para o registro da pressão arterial e da frequência cardíaca a cânula arterial, previamente heparinizada (1:20), foi conectada a um transdutor de pressão acoplado a um sistema de aquisição de dados analógico-digital (Biopac Systems, Inc.), com frequência de amostragem de 200 Hz. Após prévia calibração do equipamento, a pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) foram registradas. A PAM e a FC foram calculadas pelo programa de computador Acqknowledge (Biopac Systems, Inc.) a partir dos valores da PAP.

5.6 - Análise da resposta comportamental

A resposta comportamental foi analisada pela mensuração da distância percorrida pelo animal após a microinjeção dos agonistas NMDA ou AMPA no HDM, simultaneamente ao registro das variáveis cardiovasculares. Para isso o animal foi colocado em uma caixa preta de 35 x 50 cm, e o experimento foi filmado com auxílio de uma câmera de vídeo digital. A câmera filmou o animal apenas no plano superior. A digitalização da imagem foi feita com taxa de aquisição de quadros na frequência de 30 quadros por segundo. Dessa forma, o filme foi transformado numa sequência de fotos com resolução de 240 x 320 pontos por quadro. No processamento intermediário da imagem foi feita a conversão das imagens coloridas (RGB) para preto e branco, seguida da aplicação de um filtro passa-baixa. O resultado é uma figura com o animal branco em um fundo preto. Feita a filmagem, o centro geométrico do animal (figura IIIA) foi determinado através de um aplicativo do programa MatLab 7.1, e este valor armazenado como sendo a posição do rato no

instante em que foi tirada a foto. Sendo assim, foi calculada a posição do animal em cada um dos instantes referentes às várias fotos de todo o período filmado, pelo contraste dos pixels brancos e pretos. A distância percorrida pelo rato foi o somatório das distâncias euclidianas do centro geométrico, para cada par de fotos sequenciais (figura IIIB).

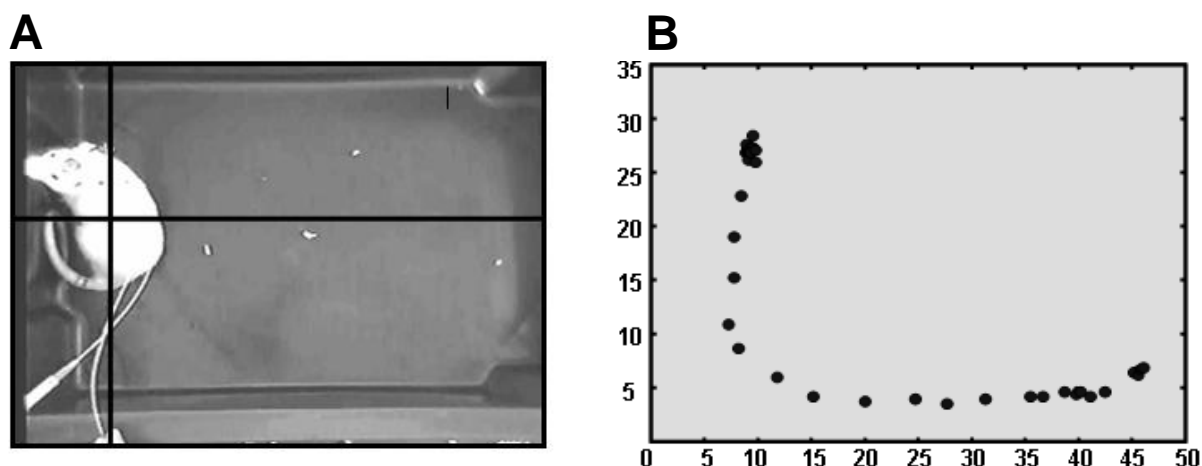


Figura III: Foto de um trecho do filme mostrando o centro geométrico da projeção do corpo do animal, calculado a partir de um aplicativo do MatLab (A). Deslocamento do centro geométrico do animal induzido pela estimulação dos quimiorreceptores carotídeos com KCN (40 µg/0,1 ml) (B).

5.7 - Microinjeção de drogas no NTS e HDM

As drogas utilizadas foram dissolvidas em solução salina fisiológica (NaCl 0,15 M) e o pH ajustado com bicarbonato de sódio (pH 7,0 – 7,4). As drogas foram manualmente microinjetadas em seus sítios específicos, utilizando-se uma seringa Hamilton de 1 µl (Hamilton, Reno, NV), conectada por meio de um tubo de polietileno PE-10 a agulha injetora (30 gauges). A fim de que as microinjeções atingissem diretamente a região do NTS, o comprimento da agulha injetora foi 0,9 mm a 1,9 mm maior que a cânula-guia (15 mm). A escolha do comprimento da injetora foi realizada através de microinjeções de L-glutamato (2,5 nmol/100 nl), iniciando-se com a injetora de menor tamanho e aumentando de forma gradual até

que se identificasse o local de injeção que produzisse as respostas cardiovasculares típicas (Colombari e cols., 1994). Para as microinjeções no HDM o comprimento da injetora foi 1,6 a 1,8 mm maior que a cânula-guia. O volume microinjetado foi de 100 nl em todas as drogas exceto para o antagonista ácido kinurênico microinjetado do HDM, em que foi utilizado um volume de 200 nl.

5.8 - Drogas utilizadas

- Ácido kinurênico, KIN (antagonista glutamatérgico ionotrópico não seletivo - Sigma Chemical, St. Louis, MO);
- Cianeto de potássio, KCN (inibidor da citocromo oxidase - Sigma, St. Louis, MO);
- Nitroprussiato de sódio, NPS (doador de óxido nítrico - Sigma Chemical, St. Louis, MO).
- Suramin (antagonista de receptores purinérgicos P2 não seletivo - Sigma Chemical, St. Louis, MO).
- NMDA – N-Metil-D-Aspartato (agonista glutamatérgico dos receptores NMDA - Sigma Chemical, St. Louis, MO).
- AMPA - α - amino-3-hidroxi-5-metil-4 isoxazolpropionato (agonista glutamatérgico dos receptores não-NMDA - Sigma Chemical, St. Louis, MO).

5.9 - Histologia

Ao final dos experimentos foram realizadas microinjeções do corante Alcian Blue (2,5 %) nos locais das microinjeções no NTS e HDM, a fim de se determinar os seus sítios específicos. A seguir, os animais foram profundamente anestesiados (Tiopental, 90 mg/kg, i.p.) e submetidos à abertura da região torácica para exposição do coração, através do qual foi feita a perfusão com solução de formol 10%. Para

facilitar a perfusão cerebral, a aorta descendente foi bloqueada com pinça hemostática e a cava superior seccionada. O cérebro foi removido e mantido em solução de formol 10%. Após um período mínimo de 5 dias os cérebros foram colocados em solução de sacarose (20%) por 48 horas. Após esse período, secções transversais do tronco cerebral foram feitas em micrótomo de congelamento em fatias de 80 µm de espessura. Os cortes foram corados pelo vermelho neutro 1% utilizando-se a técnica de Nissl, e analisados por microscopia óptica. Somente os animais com confirmação histológica dos sítios de microinjeção no NTS e HDM foram considerados neste estudo.

5.10 - Análise estatística

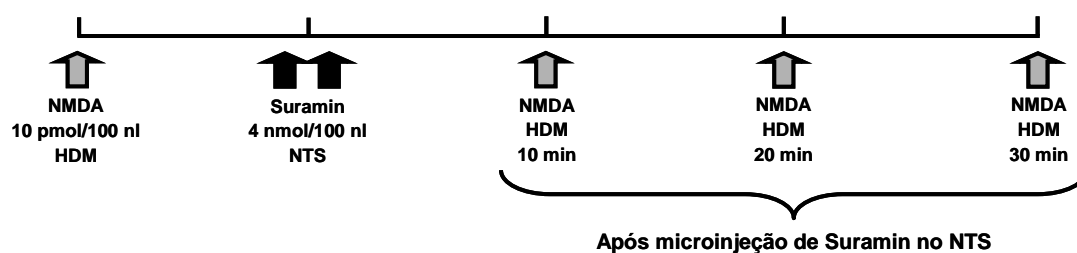
Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média ($x \pm$ epm). Para a análise estatística dos resultados dentro de cada grupo experimental foi aplicado o teste-*t* pareado. Para a comparação entre grupos foi utilizada a análise de variância (ANOVA) e pós-teste de Dunnet. As alterações foram consideradas estatisticamente significativas com $p < 0,05$.

5.11 - Protocolos experimentais

5.11.1 - Efeito do bloqueio dos receptores purinérgicos do NTS sobre as respostas cardiovasculares e comportamentais induzidas pela estimulação dos receptores NMDA do HDM.

Com o objetivo de avaliar se as respostas cardiovasculares e comportamentais induzidas pela estimulação dos receptores glutamatérgicos do subtipo NMDA do HDM dependem de receptores purinérgicos do NTS, foi

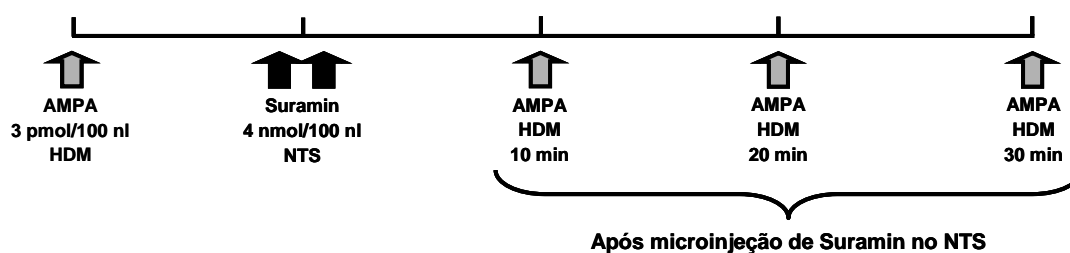
microinjetado unilateralmente no HDM o agonista NMDA, e as respostas avaliadas antes e após a microinjeção bilateral do antagonista purinérgico Suramin no NTS. Para isso foram utilizados animais previamente submetidos ao implante bilateral de cânulas-guia em direção ao NTS e HDM e implante de cânula arterial. No dia seguinte ao da canulação e após um período de adaptação do animal frente às novas condições ambientais de aproximadamente 40 a 60 minutos, foi feita a microinjeção unilateral do agonista glutamatérgico NMDA (10 pmol/100 nl) no HDM. Em seguida foi microinjetado o antagonista purinérgico Suramin (4 nmol/100 nl) ou o veículo Salina (NaCl 0,9%) bilateralmente no NTS. Após a microinjeção de Suramin no NTS, o agonista NMDA foi microinjetado no HDM nos tempos 10, 20 e 30 minutos após o bloqueio dos receptores purinérgicos do NTS. Essas respostas foram comparadas com àquelas observadas no período controle, ou seja, antes da microinjeção de Suramin no NTS. As doses do agonista NMDA (10 pmol/100 nl) e antagonista Suramin (4 nmol/100 nl), utilizadas neste protocolo foram baseadas em estudos anteriores (Soltis e DiMicco, 1992; De Paula e cols., 2004, respectivamente).



5.11.2 - Efeito do bloqueio dos receptores purinérgicos do NTS sobre as respostas cardiovasculares e comportamentais induzidas pela estimulação dos receptores não-NMDA do HDM.

Com o objetivo de avaliar se as respostas cardiovasculares e comportamentais induzidas pela estimulação dos receptores glutamatérgicos do

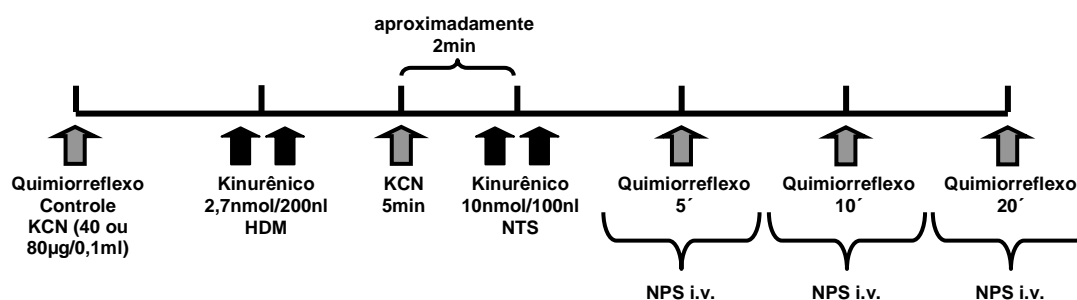
subtipo não-NMDA do HDM dependem de receptores purinérgicos do NTS, foi microinjetado unilateralmente no HDM o agonista AMPA, e as respostas avaliadas antes e após a microinjeção bilateral do antagonista purinérgico Suramin no NTS. Para isso foram utilizados animais previamente submetidos ao implante bilateral de cânulas-guia em direção ao NTS e HDM e implante de cânula arterial. No dia seguinte a canulação e após um período de adaptação do animal frente às novas condições ambientais foi feita a microinjeção unilateral do agonista glutamatérgico (AMPA, 3 pmol/100 nl) no HDM. Em seguida foi microinjetado o antagonista purinérgico Suramin (4 nmol/100 nl) bilateralmente no NTS. Após a microinjeção de Suramin no NTS o agonista glutamatérgico (AMPA) foi microinjetado no HDM nos tempos 10, 20 e 30 minutos após o bloqueio dos receptores purinérgicos do NTS. Essas respostas foram comparadas com aquelas observadas no período controle, ou seja, antes da microinjeção de Suramin no NTS. As doses do agonista AMPA (3 pmol/100 nl) e do antagonista Suramin (4 nmol/100 nl), utilizadas neste protocolo foram baseadas em estudos anteriores (Soltis e DiMicco, 1992; De Paula e cols., 2004, respectivamente).



5.11.3 - Efeito do bloqueio sequencial dos receptores glutamatérgicos do HDM e do NTS sobre as respostas cardiovasculares do quimiorreflexo

Com o objetivo de se avaliar o efeito do bloqueio conjunto dos receptores glutamatérgicos do HDM e do NTS sobre as respostas cardiovasculares do quimiorreflexo, foi microinjetado bilateralmente nessas áreas o antagonista ácido

kinurênico. Para isso foram utilizados animais previamente submetidos ao implante bilateral de cânulas-guia em direção ao NTS e HDM e implante de cânulas na artéria e veias femorais. No dia seguinte à cirurgia de canulação arterial e venosa e após um período de adaptação do animal frente às novas condições ambientais, o quimiorreflexo foi testado através de injeção intravenosa de KCN (40 ou 80 $\mu\text{g}/0,1$ ml) (período controle). Após a normalização dos parâmetros cardiovasculares o antagonista ácido kinurênico (KIN; 2,7 nmol/200 nl) foi microinjetado bilateralmente no HDM, e o quimiorreflexo foi novamente estimulado. Após 7 minutos (aproximadamente) do bloqueio do HDM, foi feita uma segunda microinjeção bilateral de KIN agora no NTS (10 nmol/100 nl). Uma vez que a microinjeção de KIN no NTS bloqueia a via simpatoinibitória do barorreflexo causando elevação dos níveis basais de pressão arterial (Haibara e cols, 1999), foi necessária a normalização da pressão por meio da infusão intravenosa (2 ml/h) de nitroprussiato de sódio (NPS 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (Machado e Bonagamba, 2005). A seguir, o quimiorreflexo foi novamente estimulado com KCN nos tempos 5, 10 e 20 minutos após a microinjeção bilateral de KIN no NTS. Essas respostas foram comparadas com àquelas observadas no período controle e após a microinjeção de KIN no HDM. As doses de ácido kinurênico (2,7 nmol/200 nl e 10 nmol/100 nl) utilizadas para bloqueio dos receptores glutamatérgicos do HDM e do NTS foram baseadas em estudos anteriores (Queiroz e cols., 2011 e Haibara e cols., 1999, respectivamente).



6 - RESULTADOS

6.1 - Efeito do bloqueio dos receptores purinérgicos do NTS sobre as respostas cardiovasculares e comportamentais induzidas pela estimulação dos receptores NMDA do HDM.

Para avaliar se as respostas cardiovasculares e comportamentais induzidas pela estimulação dos receptores glutamatérgicos do subtipo NMDA do HDM dependem de receptores purinérgicos do NTS, foi microinjetado unilateralmente no HDM o agonista NMDA, e as respostas avaliadas antes e após a microinjeção bilateral do antagonista purinérgico Suramin no NTS.

Um traçado típico de um animal representativo do grupo estudado mostrando as alterações na pressão arterial pulsátil (PAP, mmHg), pressão arterial média (PAM, mmHg) e frequência cardíaca (FC, bpm) induzidas pela microinjeção unilateral do agonista glutamatérgico NMDA (10 pmol/100 nl) no HDM em ratos não-anestesiados, antes e após o bloqueio dos receptores purinérgicos do NTS com Suramin (4 nmol/100 nl) é mostrado na figura 1. A microinjeção de NMDA no HDM promoveu aumento da pressão arterial e taquicardia (figura 1A). Podemos observar que o bloqueio dos receptores purinérgicos do NTS promoveu alteração das respostas pressora e taquicárdica induzidas pelo NMDA (figura 1B).

Os dados obtidos neste grupo experimental (n = 6), são mostrados na figura 2, onde se observa que a microinjeção bilateral do antagonista purinérgico Suramin no NTS produziu redução significativa da magnitude da resposta pressora ($+13 \pm 1$ vs. $+2 \pm 1$; $+3 \pm 2$ e $+4 \pm 3$ mmHg) e da resposta taquicárdica ($+87 \pm 10$ vs. $+23 \pm 14$; $+24 \pm 20$ e $+26 \pm 8$ bpm) induzidas pelo agonista NMDA no HDM em todos os tempos analisados (tabela 1). A Figura 2 mostra ainda que o bloqueio dos receptores purinérgicos do NTS aboliu a atividade locomotora da resposta

comportamental do NMDA até os trinta primeiros minutos após a microinjeção do antagonista (187 ± 46 vs. 8 ± 3 ; 25 ± 9 e 26 ± 15 cm) (tabela 1).

A microinjeção bilateral do veículo salina no NTS ($n = 4$) não alterou as respostas pressora ($+10 \pm 1$ vs. $+9 \pm 1$; $+9 \pm 1$ e $+9 \pm 2$ mmHg), taquicárdica ($+44 \pm 4$ vs. $+40 \pm 9$; $+46 \pm 5$ e $+47 \pm 5$ bpm) e comportamental (115 ± 41 vs. 129 ± 43 ; 162 ± 75 e 167 ± 58 cm) induzidas pelo NMDA em nenhum dos tempos analisados (figura 3, tabela 2).

Em relação aos parâmetros cardiovasculares basais o bloqueio dos receptores purinérgicos do NTS com Suramin neste grupo experimental ($n = 6$) não promoveu qualquer alteração dos parâmetros cardiovasculares basais de pressão arterial e frequência cardíaca (120 ± 3 vs. 124 ± 4 mmHg e 378 ± 19 vs. 394 ± 17 bpm, respectivamente) (figura 4, tabela 3).

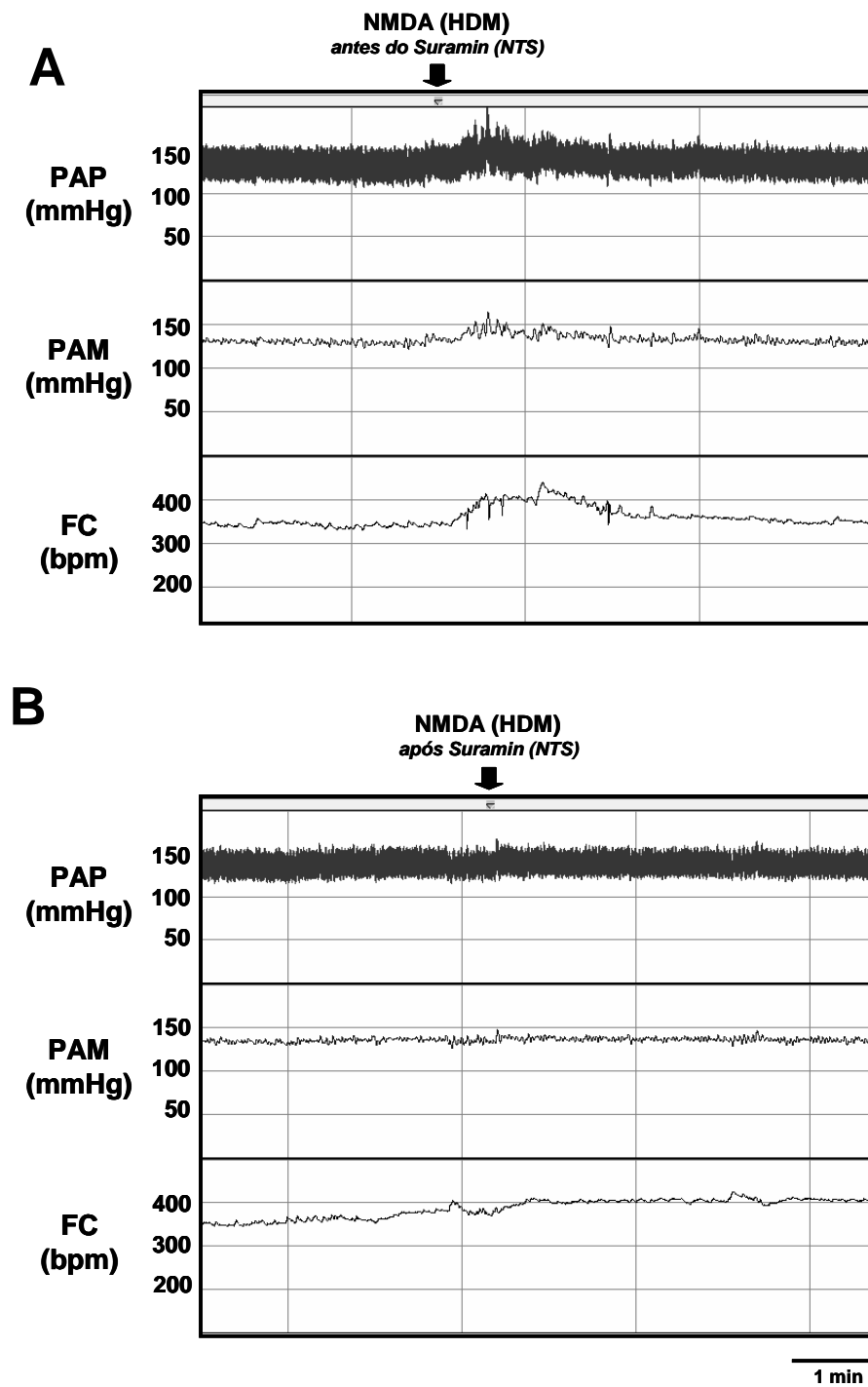


Figura 1: Traçado representativo de um animal do grupo estudado mostrando as alterações na pressão arterial pulsátil (PAP, mmHg), pressão arterial média (PAM, mmHg) e frequência cardíaca (FC, bpm), induzidas pela microinjeção unilateral do agonista **NMDA no HDM** (10 pmol/100 nl), antes (**painel A**) e após (**painel B**) à microinjeção bilateral do antagonista purinérgico **Suramin no NTS** (4 nmol/100 nl) de ratos não anestesiados. As setas indicam o momento da microinjeção do NMDA no HDM.

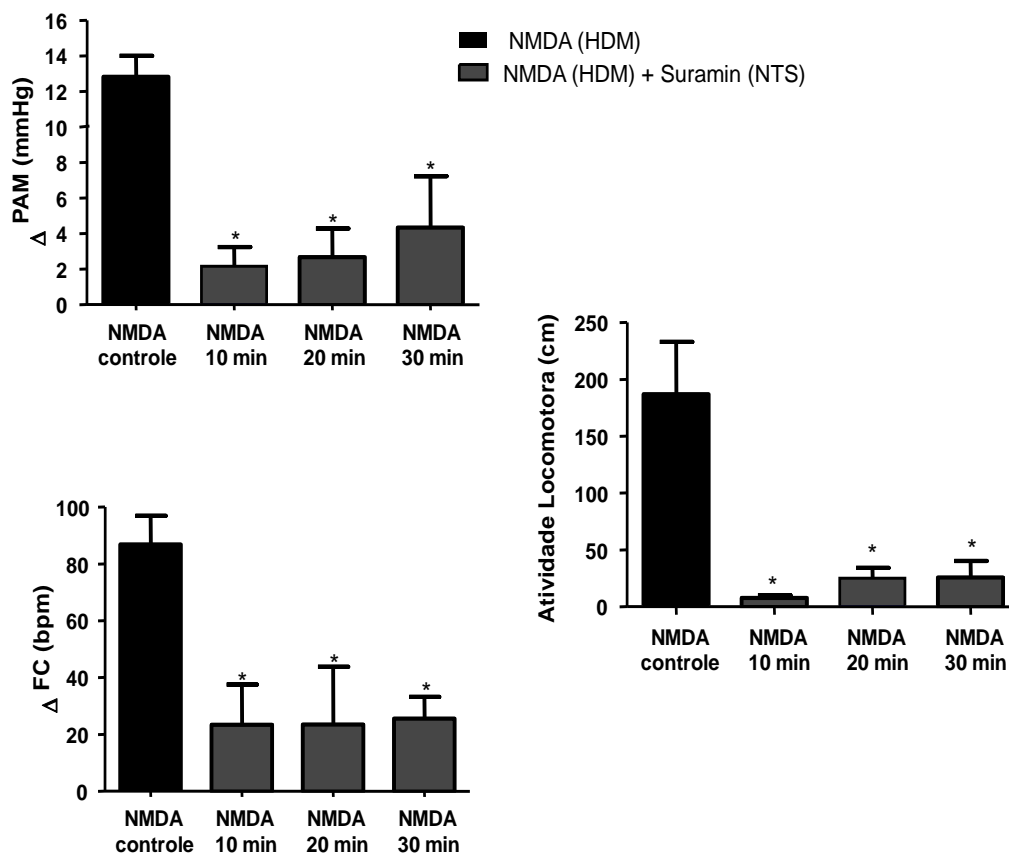


Figura 2: Alterações sobre a pressão arterial média (Δ PAM, mmHg), frequência cardíaca (Δ FC, bpm) e atividade locomotora (cm), induzidas pela microinjeção do agonista **NMDA no HDM** (10 pmol/100 nl), antes (controle), 10, 20 e 30 min após a microinjeção bilateral do antagonista purinérgico **Suramin no NTS** (4 nmol/100 nl) em ratos não-anestesiados (n = 6). (*) Diferença significativa em relação ao NMDA controle (ANOVA, pós-teste de Dunnet, $p < 0,05$).

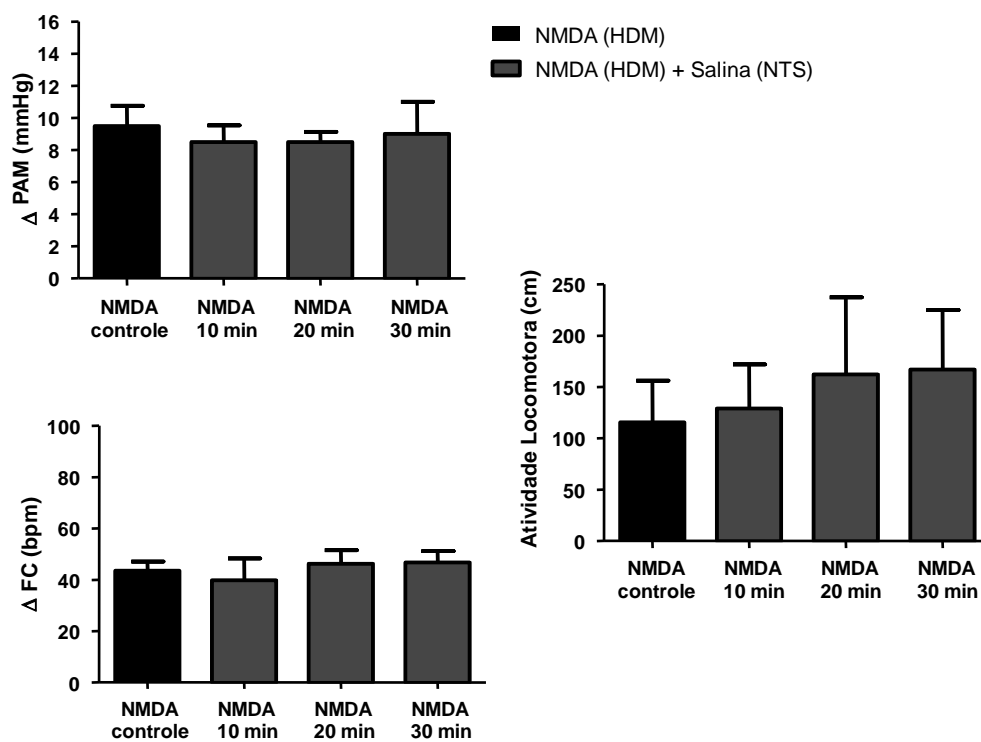


Figura 3: Alterações sobre a pressão arterial média (Δ PAM, mmHg), frequência cardíaca (Δ FC, bpm) e atividade locomotora (cm), induzidas pela microinjeção do agonista **NMDA no HDM** (10 pmol/100 nl), antes (controle), 10, 20 e 30 min após a microinjeção bilateral do veículo **Salina no NTS** (NaCl 0,9%) em ratos não-anestesiados (n = 4). ANOVA, $p > 0,05$).

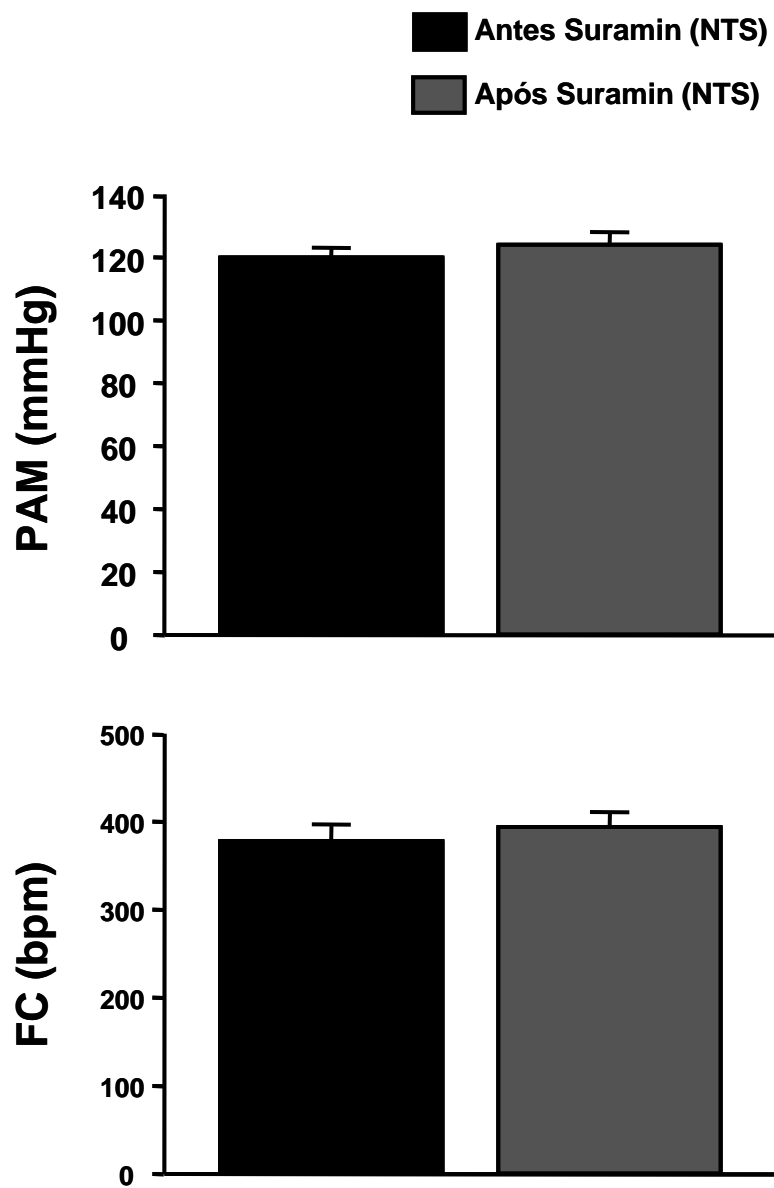


Figura 4: Valores basais de pressão arterial média (PAM, mmHg) e frequência cardíaca (FC, bpm), antes e 10 minutos após a microinjeção bilateral de **Suramin no NTS** (4 nmol/100 nl) de ratos não-anestesiados (n = 6). Teste-t pareado.

6.2 - Efeito do bloqueio dos receptores purinérgicos do NTS sobre as respostas cardiovasculares e comportamentais induzidas pela estimulação dos receptores não-NMDA do HDM.

Para avaliar se as respostas cardiovasculares e comportamentais induzidas pela estimulação dos receptores glutamatérgicos do subtipo não-NMDA do HDM dependem de receptores purinérgicos do NTS, foi microinjetado unilateralmente no HDM o agonista AMPA, e as respostas avaliadas antes e após a microinjeção bilateral do antagonista purinérgico Suramin no NTS.

As alterações na PAP, PAM e FC induzidas pela microinjeção unilateral do agonista glutamatérgico AMPA (3 pmol/100 nl) no HDM em ratos não-anestesiados, antes e após o bloqueio dos receptores purinérgicos do NTS com Suramin (4 nmol/100 nl) são mostradas no traçado típico da figura 5. A microinjeção de AMPA no HDM promoveu aumento da pressão arterial e taquicardia. Podemos observar que o bloqueio dos receptores purinérgicos do NTS, promoveu pequena alteração das respostas pressora e taquicárdica induzidas pelo AMPA (figura 5).

Os dados obtidos neste grupo experimental (n = 5) estão representados na figura 6. O bloqueio dos receptores purinérgicos do NTS reduziu significativamente a resposta pressora apenas aos 10 min ($+16 \pm 1$ vs. $+6 \pm 2$ mmHg), mas não promoveu alteração da resposta taquicárdica induzida pelo AMPA em nenhum dos tempos analisados ($+104 \pm 12$ vs. $+53 \pm 15$; $+61 \pm 16$ e $+59 \pm 22$ bpm, respectivamente) (figura 6). A estimulação dos receptores não-NMDA do HDM, além de aumentar a pressão arterial e a frequência cardíaca, também induziu resposta comportamental de aumento da atividade locomotora (237 ± 55 cm). O bloqueio dos receptores purinérgicos do NTS também reduziu esta resposta após 10 e 20 min (67

± 26 e 39 ± 15 cm, respectivamente) da microinjeção do antagonista Suramin (figura 6, tabela 4).

Os efeitos do Suramin sobre as respostas do AMPA foram restritos ao NTS, uma vez que a microinjeção deste antagonista em áreas adjacentes ao NTS ($n = 3$) não promoveu alterações significativas sobre as respostas pressora ($+15 \pm 2$ vs. $+15 \pm 3$; $+13 \pm 1$ e $+14 \pm 1$ mmhg), taquicárdica ($+108 \pm 28$ vs. $+100 \pm 50$; $+100 \pm 47$ e $+101 \pm 45$ bpm) ou comportamental (42 ± 18 vs. 89 ± 31 ; 85 ± 34 e 97 ± 36 cm) do AMPA em nenhum dos tempos analisados (figura 7, tabela 5).

O bloqueio dos receptores purinérgicos do NTS com Suramin neste grupo experimental ($n = 5$) também não promoveu qualquer alteração dos parâmetros cardiovasculares basais (116 ± 3 vs. 123 ± 6 mmHg e 393 ± 14 vs. 367 ± 19 bpm) (figura 8, tabela 6).

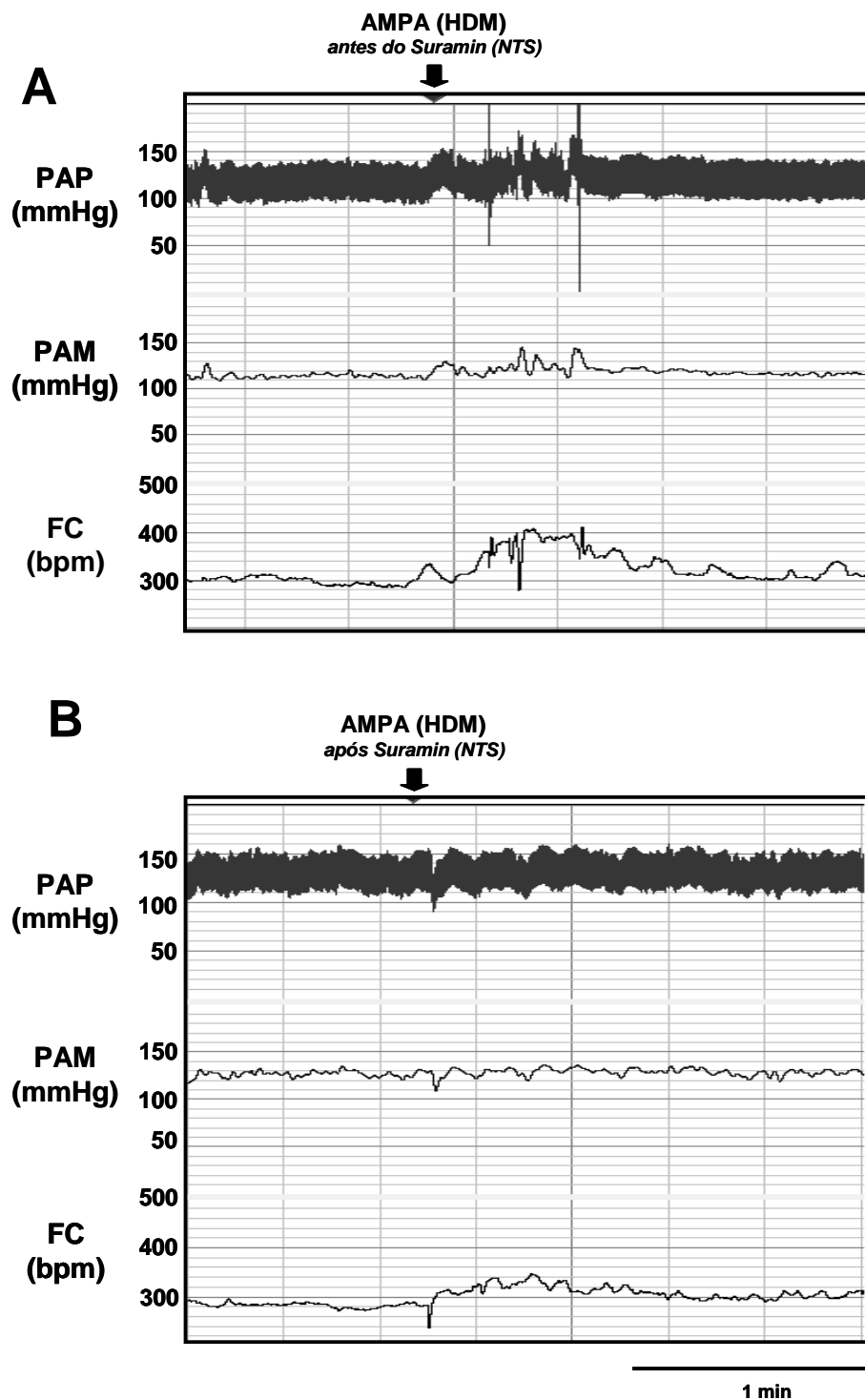


Figura 5: Traçado representativo de um animal do grupo estudado mostrando as alterações na pressão arterial pulsátil (PAP, mmHg), pressão arterial média (PAM, mmHg) e frequência cardíaca (FC, bpm), induzidas pela microinjeção unilateral do agonista **AMPA no HDM** (3 pmol/100 nl), antes (**painel A**) e após (**painel B**) à microinjeção bilateral do antagonista purinérgico **Suramin no NTS** (4 nmol/100 nl) de ratos não anestesiados. As setas indicam o momento da microinjeção do AMPA no HDM.

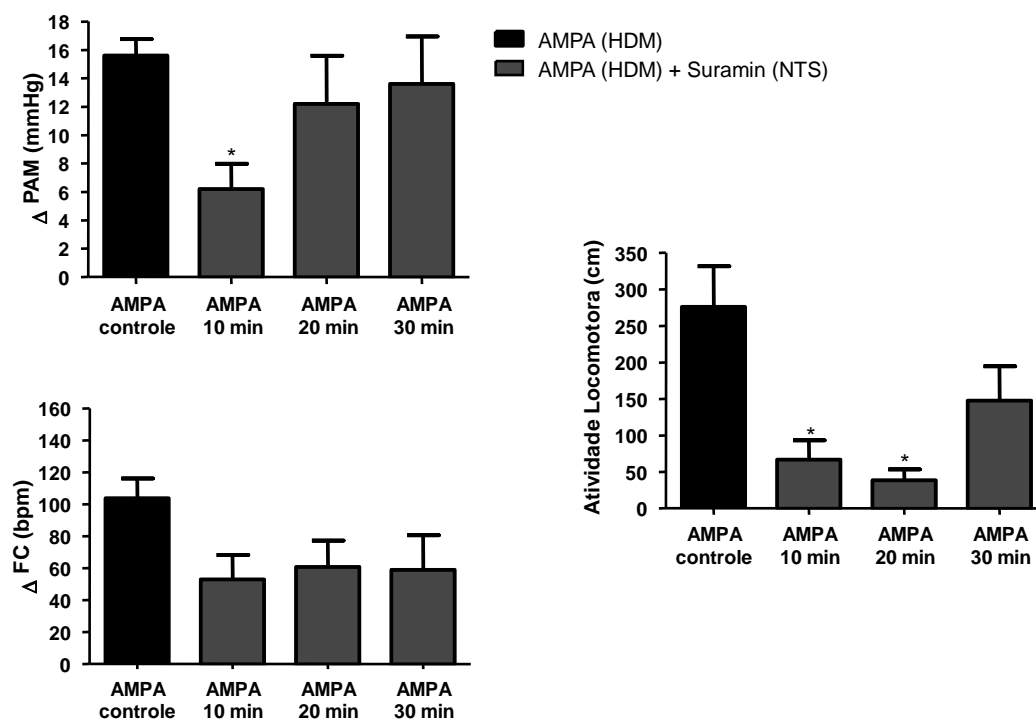


Figura 6: Alterações sobre a pressão arterial média (Δ PAM, mmHg), frequência cardíaca (Δ FC, bpm) e atividade locomotora (cm), induzidas pela microinjeção do agonista **AMPA no HDM** (3 pmol/100 nl), antes (controle), 10, 20 e 30 min após a microinjeção bilateral do antagonista purinérgico **Suramin no NTS** (4 nmol/100 nl) em ratos não-anestesiados (n = 5). (*) Diferença significativa em relação ao AMPA controle (ANOVA, pós-teste de Dunnet, $p < 0,05$).

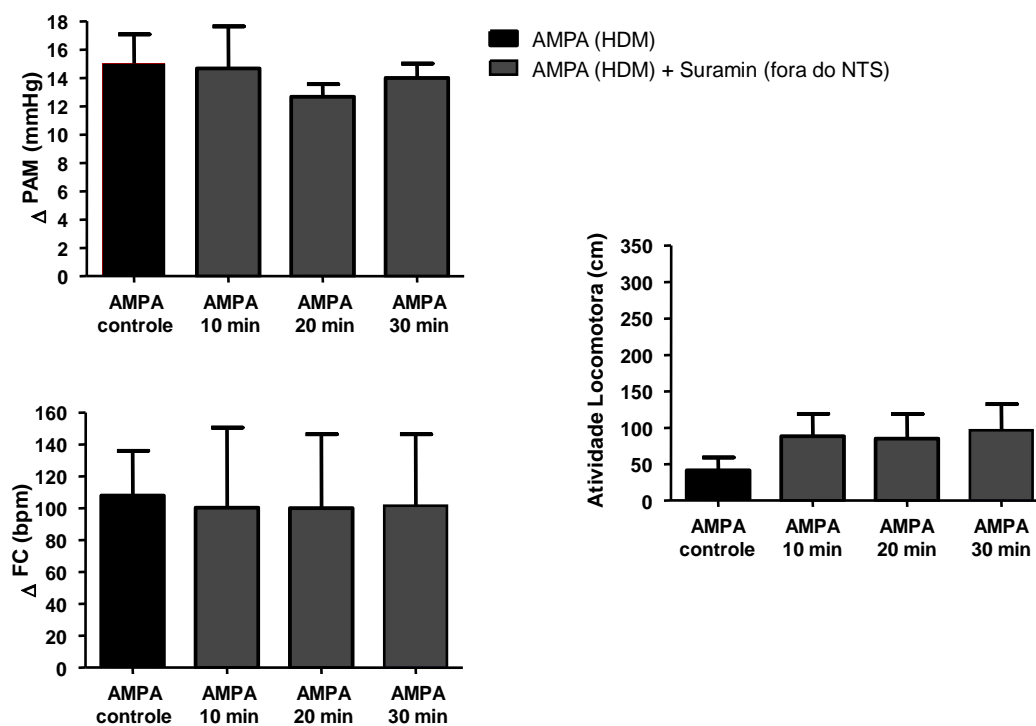


Figura 7: Alterações sobre a pressão arterial média (Δ PAM, mmHg), frequência cardíaca (Δ FC, bpm) e atividade locomotora (cm), induzidas pela microinjeção do agonista **AMPA no HDM** (3 pmol/100 nl), antes (controle), 10, 20 e 30 min após a microinjeção bilateral do antagonista purinérgico **Suramin em regiões adjacentes ao NTS** (4 nmol/100 nl) em ratos não-anestesiados (n = 3). ANOVA, $p > 0,05$).

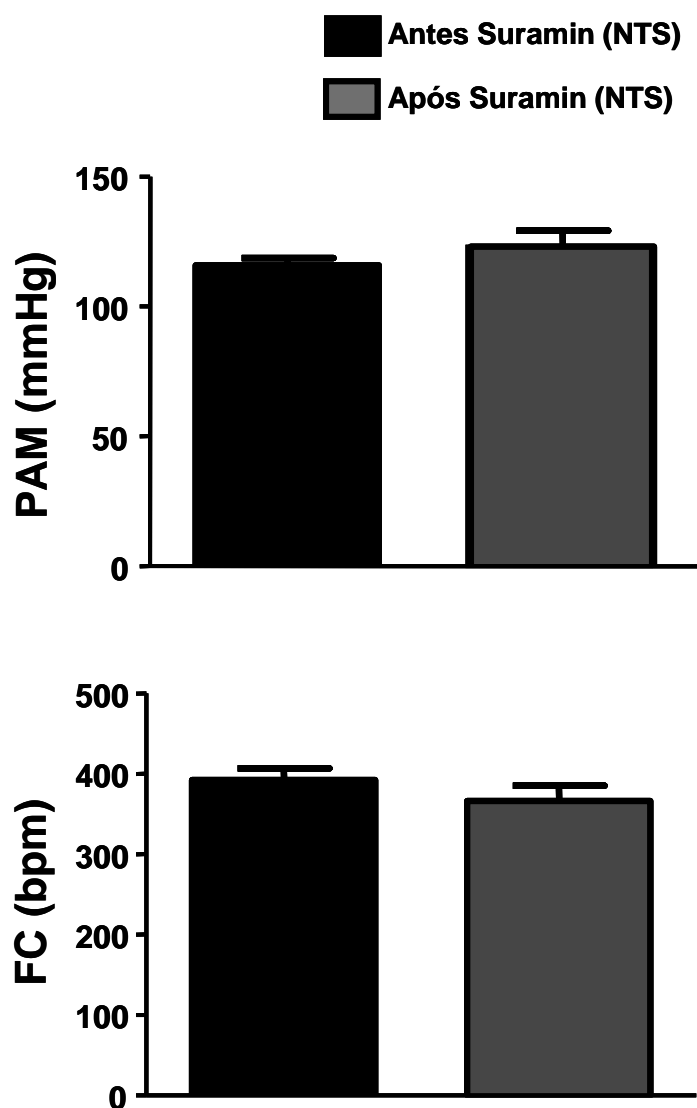


Figura 8: Valores basais de pressão arterial média (PAM, mmHg) e frequência cardíaca (FC, bpm), antes e 10 minutos após a microinjeção bilateral de **Suramin no NTS** (4 nmol/100 nl) de ratos não-anestesiados (n = 5). Teste-*t* pareado.

6.3 - Efeito do bloqueio sequencial dos receptores glutamatérgicos do HDM e do NTS sobre as respostas cardiovasculares do quimiorreflexo.

Com o objetivo de se avaliar o efeito do bloqueio conjunto dos receptores glutamatérgicos do HDM e do NTS sobre as respostas cardiovasculares do quimiorreflexo, foi microinjetado bilateralmente nessas áreas o antagonista ácido kinurênico, e o quimiorreflexo estimulado antes e após estas microinjeções.

As alterações na PAP, PAM e FC induzidas pela estimulação do quimiorreflexo com KCN (40 µg/0,1 ml) em ratos não-anestesiados, antes, 5 min após o bloqueio dos receptores glutamatérgicos do HDM com ácido kinurênico (2,7 nmol/200 nl), e 5, 10 e 20 min após o bloqueio sequencial dos receptores glutamatérgicos do NTS (KIN, 10 nmol/100 nl), estão representadas no traçado da figura 9. As setas indicam o momento da injeção i.v. de KCN. A estimulação dos quimiorreceptores com KCN promoveu aumento da pressão arterial e bradicardia. Podemos observar, como descrito em estudo anterior (Queiroz e cols., 2011), que o bloqueio dos receptores glutamatérgicos do HDM, promoveu alteração da resposta pressora, sem modificar a resposta bradicárdica deste reflexo. O bloqueio adicional dos receptores glutamatérgicos do NTS com ácido kinurênico, não promoveu alteração sobre a resposta pressora, mas aboliu a resposta bradicárdica do quimiorreflexo (figura 9).

Os dados obtidos neste grupo experimental (n = 6) estão sumarizados na figura 10, onde se observa que a microinjeção bilateral do antagonista glutamatérgico no HDM produziu redução significativa da resposta pressora ($+38 \pm 5$ vs. $+23 \pm 4$ mmHg), mas não da bradicardia do quimiorreflexo (-174 ± 28 vs. -178 ± 43 bpm) (figura 10). O bloqueio sequencial dos receptores glutamatérgicos do NTS

não promoveu redução adicional da resposta pressora em nenhum dos tempos analisados (5 min: $+17 \pm 6$; 10 min: $+20 \pm 6$ e 20 min: $+25 \pm 7$ mmHg) ao passo que a bradicardia foi reduzida 5 e 10 min após a microinjeção de kinurênico no NTS (-28 ± 17 e -4 ± 15 bpm, respectivamente) (figura 10).

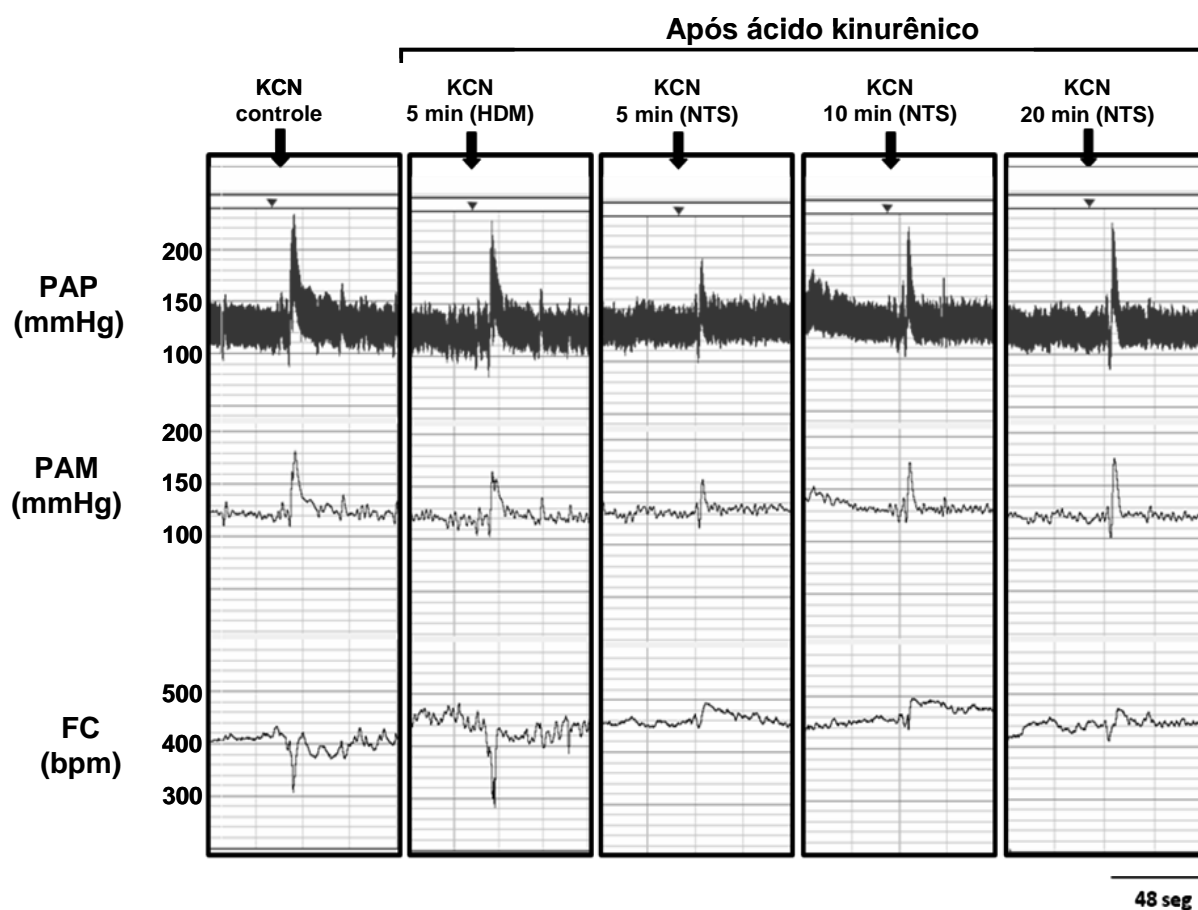


Figura 9: Traçado representativo de um animal do grupo estudado mostrando as alterações na pressão arterial pulsátil (PAP, mmHg), pressão arterial média (PAM, mmHg) e frequência cardíaca (FC, bpm), induzidas pela estimulação do quimiorreflexo com cianeto de potássio (KCN 40 μ g/0,1ml, i.v.) antes (controle), 5 min após a microinjeção bilateral de ácido kinurênico (2,7 nmol/200 nl) no HDM e 5, 10 e 20 min após a microinjeção bilateral de ácido kinurênico (10 nmol/100 nl) no NTS. As setas indicam o momento da injeção i.v. de KCN.

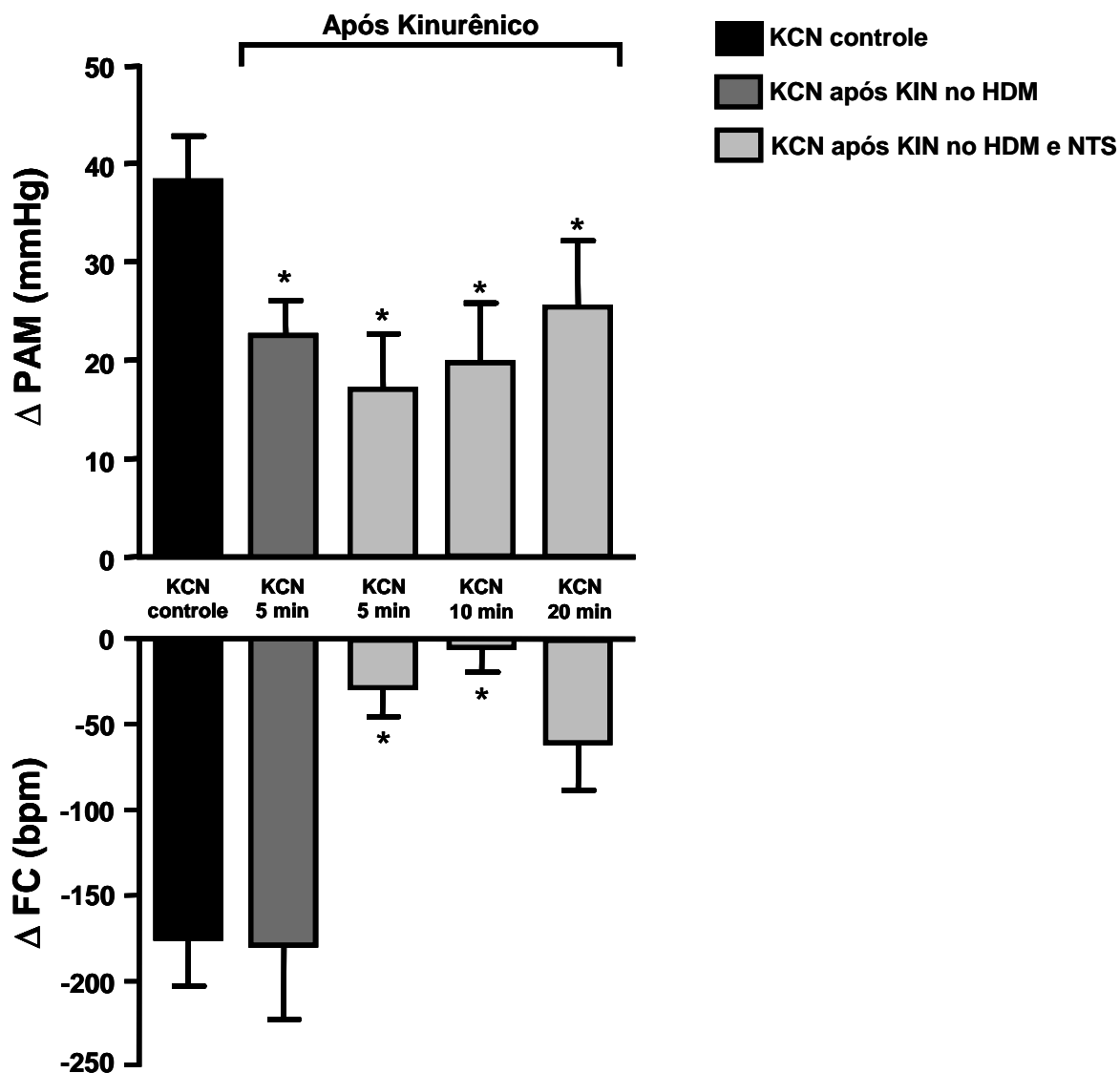


Figura 10: Alterações sobre a pressão arterial média (Δ PAM, mmHg) e frequência cardíaca (Δ FC, bpm), induzidas pela estimulação do quimiorreflexo com cianeto de potássio (KCN 40 ou 80 μ g/0,1 ml, i.v.), antes (controle), 5 min após a microinjeção bilateral do antagonista glutamatérgico ácido kinurênico (2,7 nmol/200 nl) no HDM e 5, 10 e 20 min após a microinjeção sequencial de ácido kinurênico no NTS (10 nmol/100 nl) em ratos não-anestesiados (n = 6) (*) Diferença significativa em relação ao KCN controle (ANOVA, pós-teste de Dunnet, $p < 0,05$).

6.4 – Análise histológica

A figura 11 corresponde a fotomicrografias de secções transversais do cérebro de um animal representativo do grupo estudado, mostrando a localização da microinjeção bilateral do corante Alcian Blue no HDM (painel A) e no NTS (painel B). Podemos observar que o HDM localiza-se adjacente ao terceiro ventrículo (3V), lateral ao fórnix (f) e dorsal ao hipotálamo ventromedial (VMH), localizado a 3,30 mm caudal ao bregma. O NTS localiza-se na porção dorsal do tronco cerebral, lateralmente à área postrema (AP), 14,00 mm caudal ao bregma. À esquerda da figura 11 temos as representações esquemáticas de um corte transversal do cérebro de um rato correspondente ao sítio de microinjeção no HDM (painel A) e no NTS (painel B) das fotomicrografias.

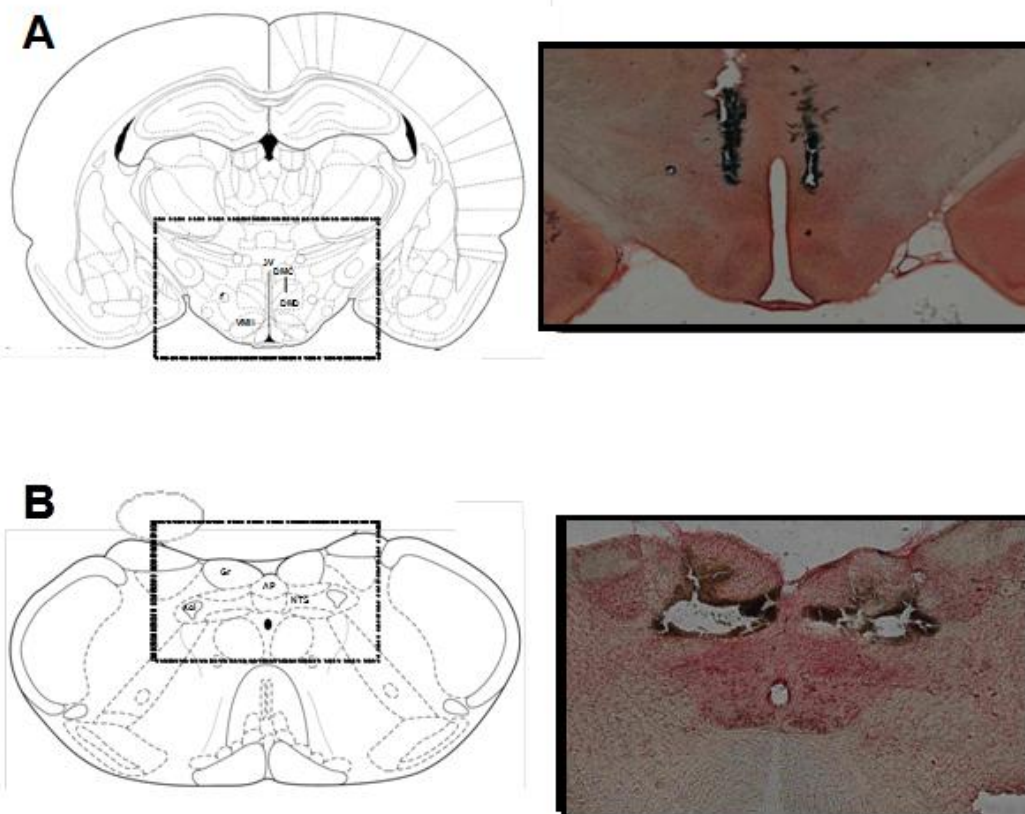


Figura 11: Desenhos esquemáticos de um corte transversal do cérebro de um rato mostrando a localização do HDM (**painel A**) e do NTS (**painel B**). Fotomicrografias de um animal representativo mostrando o local da microinjeção no HDM (**painel A**) e no NTS (**painel B**) corados pelo vermelho neutro 1% utilizando-se a técnica de Nissl. 3V: 3º ventrículo; DMC: porção compacta do HDM; DMD: porção difusa do HDM; VMH: núcleo ventromedial do hipotálamo; Gr: núcleo graciles, sol: trato solitário; AP: área postrema.

7 - DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou a contribuição da via hipotálamo dorsomedial - núcleo do trato solitário (HDM-NTS) na modulação das respostas cardiovasculares e comportamentais do quimiorreflexo em ratos não anestesiados.

Para isso nós realizamos o estímulo ou bloqueio do HDM, juntamente com o bloqueio seletivo dos receptores do NTS para elucidar se parte da neurotransmissão do quimiorreflexo no NTS em animais não-anestesiados depende da modulação do HDM. Desta forma inicialmente foram observadas as respostas cardiovasculares e comportamentais induzidas pela estimulação direta dos receptores glutamatérgicos do HDM (NMDA e não-NMDA) sob a ação do bloqueio de receptores purinérgicos do NTS. Estudos anteriores mostraram que a estimulação dos receptores glutamatérgicos do HDM promove aumento da atividade simpática além de respostas comportamentais (Soltis e DiMicco, 1991; Soltis e DiMicco, 1992) e que estas respostas são compatíveis com a facilitação do quimiorreflexo (Mifflin e cols., 1988; Silva-Carvalho e cols., 1993), sendo sugerido que estes dois estímulos possam compartilhar das mesmas vias neurais (Queiroz e cols., 2011).

Os resultados obtidos em nosso estudo mostraram que o bloqueio purinérgico do NTS reduziu significativamente as respostas cardiovasculares e comportamentais induzidas pelos agonistas glutamatérgicos microinjetados no HDM, particularmente do agonista NMDA. Deste modo estes resultados sugerem que as respostas cardiovasculares e comportamentais induzidas pela estimulação direta dos receptores glutamatérgicos do subtipo NMDA do HDM podem depender de receptores purinérgicos do NTS.

É sabido que o DMH possui, além de conexões intrahipotálâmicas, conexões com telencéfalo e com outros núcleos diencefálicos, e bulbares. Dentro do hipotálamo, o DMH envia a maioria de suas projeções para o núcleo ventromedial

(VMH). Além disso, o núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) também recebe projeções oriundas da porção anterior do DMH, e envia projeções da sua região parvocelular até a parte ventral da porção posterior do DMH. Adicionalmente, o DMH envia projeções densas para a substância cinzenta periaquedutal (PAG), no mesencéfalo, e para o NTS no bulbo (Ter Horst e Luiten, 1986; Thompson e cols, 1996). Portanto a estimulação dos neurônios do HDM pode gerar respostas cardiovasculares e comportamentais por diferentes vias neurais direta ou indiretamente. Assim, em nosso estudo, inicialmente observamos a contribuição da via entre HDM e NTS nas respostas cardiovasculares e comportamentais gerados pelo estímulo direto do HDM.

A presença de receptores NMDA e não-NMDA no HDM é bem estabelecida por uma variedade de técnicas, incluindo ensaios de ligação (Meeker e cols, 1994), estudos eletrofisiológicos (Bailey e cols, 2003) e farmacológicos (Soltis & DiMicco, 1991; Bailey & DiMicco, 2001). Estudos de Soltis & DiMicco (1991 e 1992) mostram que as respostas cardiovasculares induzidas pela desinibição do HDM ou pelo estresse experimental dependem da ativação tanto dos dois subtipos (NMDA e não-NMDA) uma vez que bloqueio de apenas um subtipo de receptores reduz parcialmente as respostas cardiovasculares, enquanto o duplo bloqueio desses receptores promove efeito adicional. Esses estudos sugerem a existência de dois componentes distintos nas respostas cardiovasculares ao estresse: um relacionado à atividade dos receptores NMDA e outro mediado por receptores não-NMDA. Estudos de Johnson e Shekhar em 2006 sugeriram que diferentes estímulos podem ativar apenas um subtipo de receptor glutamatérgico no HDM para evocar a resposta fisiológica específica no animal.

Apesar da semelhança entre as respostas cardiovasculares induzidas pelos agonistas NMDA e AMPA no HDM, o efeito do bloqueio purinérgico do NTS sobre essas respostas foi diferente. O tratamento prévio com Suramin no NTS promoveu redução de 85% da resposta pressora do NMDA e de 63% da resposta pressora do AMPA. Ainda, a taquicardia induzida pelo NMDA foi reduzida em 74%, enquanto o efeito do Suramin na taquicardia do AMPA não foi significativo. Sobre a resposta comportamental o bloqueio purinérgico aboliu a resposta comportamental induzida pelo NMDA, enquanto reduziu em 70% a resposta locomotora induzida pelo AMPA.

Estes resultados vêm de encontro com o estudo sobre síndrome do pânico realizado por Johnson e Shekhar (2006), onde foi observado que a resposta induzida pelo lactato aumenta a imunorreatividade da proteína C-Fos nos neurônios do HDM que expressam receptores NMDA, mas não nos neurônios que expressam receptores AMPA. Estes dados ainda foram confirmados farmacologicamente, nos quais microinjeções de antagonistas NMDA no HDM, mas não de antagonistas não-NMDA, resultaram em bloqueio dose dependente da resposta taquicárdica, pressora, taquipnéica e comportamental após o lactato. Assim foi observado no estudo de Johnson e Shekhar (2006) que os receptores NMDA tem papel predominante na regulação das respostas cardiovasculares, comportamentais e ventilatórias num modelo experimental de síndrome do pânico em ratos.

Os resultados do presente estudo, de forma semelhante ao observado em estudos do pânico (Shekar e cols, 2006), mostram que as respostas cardiovasculares e comportamentais induzidas por diferentes agonistas glutamatérgicos do HDM geram respostas diferentes após o bloqueio purinérgico do NTS. Desta forma é possível sugerir que as respostas cardiovasculares e

comportamentais induzidas pelo agonista NMDA do HDM podem ser mais fortemente influenciadas pelo bloqueio purinérgico do NTS.

O papel dos receptores de aminoácidos excitatórios do HDM também tem sido relacionado com a integração tanto das respostas cardiovasculares quanto das respostas comportamentais induzidas em modelos de estresse emocional. Em situações de estresse experimental, como no modelo por jato de ar ou por desinibição dos neurônios do HDM, pela microinjeção do antagonista gabaérgico bicuculina, ocorre um padrão de respostas caracterizadas por aumento da atividade simpática, aumento modesto da pressão arterial, taquicardia, elevação dos níveis circulantes de ACTH, resposta comportamental de locomoção, dentre outras (Shekhar e DiMicco, 1987; Soltis e cols., 1991; Bailey e DiMicco, 2001; Menezes e cols., 2006). Bailey e DiMicco (2001), estimulando os receptores de aminoácidos excitatórios do HDM, pela microinjeção unilateral de kainato, agonista específico dos receptores do subtipo não-NMDA, também observaram respostas de taquicardia, aumento dos níveis circulantes de ACTH e da atividade locomotora. Soltis e DiMicco (1991) também observaram que a microinjeção bilateral do agonista NMDA no HDM promoveu modesto aumento da pressão arterial e acentuada taquicardia. De forma interessante Soltis e DiMicco (1991 e 1992) observaram que o bloqueio dos receptores de aminoácidos excitatórios do HDM reduz de forma importante as respostas cardiovasculares induzidas pelo estresse por jato de ar e também as respostas induzidas pela bicuculina microinjetada no HDM. Mais recentemente, estudos de nosso laboratório mostraram que os receptores glutamatérgicos do HDM também estão envolvidos de forma importante na integração das respostas pressora e comportamental do quimiorreflexo em animais não-anestesiados (Queiroz e cols., 2011).

Estudos neuroanatômicos, empregando técnicas de marcação neuronal anterógrada, mostraram que o HDM envia projeções diretas para o NTS (Thompson e cols, 1996). Estudos funcionais mostraram que a estimulação elétrica das áreas hipotalâmicas de defesa, da qual o HDM faz parte, modula a atividade de neurônios do NTS (Silva-Carvalho e cols 1995a e Silva-Carvalho e cols., 1995b). Em outro estudo funcional foi mostrado que a estimulação elétrica do HDM bloqueia a bradicardia barorreflexa através da ativação de receptores serotoninérgicos do subtipo 5-HT₃ do NTS, mostrando uma ligação funcional entre essas áreas. (Sévoz-Couche e cols, 2003).

O presente estudo mostra ainda que, não apenas o NTS participa da expressão das respostas cardiovasculares induzidas pela estimulação dos receptores glutamatérgicos do HDM, como também os receptores purinérgicos do NTS tem importante papel nesta modulação. É possível sugerir que com a estimulação glutamatérgica do HDM, ocorra a liberação de purinas no NTS e que estas purinas podem agir diretamente ou indiretamente no próprio NTS ou através de vias eferentes, modulando a resposta pressora e comportamental do estímulo glutamatérgico do HDM. Nosso estudo, entretanto, não pode afirmar que a estimulação dos receptores glutamatérgicos do HDM ative uma via purinérgica monossináptica para o NTS, como também não define qual seria esta via.

Entretanto em estudo recente realizado por Korim e cols (2012), foi sugerida que a via NTS-RVLM atue no controle das respostas cardiovasculares observadas em situações de reação de defesa, sendo demonstrado ainda que esta via é mediada pela ativação de receptores purinérgicos P2 e receptores glutamatérgicos no tronco cerebral. Estes dados corroboram com os do presente estudo e indicam uma possível via envolvida nas respostas cardiovasculares observadas.

Hilton e Joels (1965) mostraram que a estimulação das áreas hipotalâmicas de defesa promove facilitação dos efeitos cardio-respiratórios induzidos pela ativação do quimiorreflexo. Tem sido demonstrado que esse efeito facilitatório sobre o quimiorreflexo ocorre através de uma circuitaria neuronal envolvendo uma modulação hipotalâmica sobre os neurônios do NTS (Silva-Carvalho e cols., 1993, 1995a e 1995b). Estudos realizados por Spyer e Thomas (2000) e Dale e cols. (2002) mostraram ainda que a ativação das áreas hipotalâmicas de defesa produz aumento dos níveis de adenosina no NTS, que é formada a partir da liberação e quebra do ATP. Assim é possível ainda sugerir que a ativação dos receptores de aminoácidos excitatórios do HDM pode modular, através de receptores purinérgicos, a atividade dos neurônios do NTS que recebem a informação aferente dos quimiorreceptores, facilitando a resposta quimiorreflexa.

Os estudos da neurotransmissão do quimiorreflexo em diferentes áreas e núcleos do SNC, particularmente no NTS, mostram resultados conflitantes dependendo da condição experimental do animal utilizada, isto é, anestesiado ou não-anestesiado. Por exemplo, enquanto o bloqueio dos receptores glutamatérgicos no NTS abole o quimiorreflexo em animais anestesiados (Vardan e cols., 1993; Zhang e Mifflin, 1993), o mesmo bloqueio não abole a resposta pressora do quimiorreflexo em animais não-anestesiados (Haibara e cols., 1995; Machado e Bonagamba, 2005). Da mesma forma, estudos utilizando antagonistas purinérgicos no NTS mostraram que em animais anestesiados o bloqueio purinérgico no NTS provoca uma atenuação da resposta bradicárdica (Paton e cols., 2002), ao passo que em animais não-anestesiados o antagonismo purinérgico não bloqueia as respostas pressora ou bradicárdica do quimiorreflexo (Braga e cols., 2007).

A própria ativação dos quimiorreceptores carotídeos nas condições anestesiado e não-anestesiado produz respostas reflexas diferentes. A estimulação do quimiorreflexo em animais não anestesiados produz um complexo padrão de respostas como o aumento de pressão arterial, bradicardia, taquipnéia e resposta comportamental de alerta e exploração. (Franchini e Krieger, 1993; Haibara e cols., 1995; Barros e cols., 2002; Machado e Bonagamba, 2005; Antunes e cols., 2005b, Braga e Machado, 2006). Porém sob anestesia este complexo padrão é alterado: as respostas autonômicas e respiratórias à ativação do quimiorreflexo são atenuadas e a resposta comportamental é completamente abolida. (Franchini e Krieger, 1993). Em função desses resultados fica claro que o emprego de anestésicos altera as respostas finais do quimiorreflexo, e desta forma torna-se de importante o estudo da neurotransmissão dos reflexos cardiovasculares em animais não anestesiados. Considerando que os anestésicos deprimem a atividade das áreas hipotalâmicas (Marshall, 1987), e que a integridade das áreas hipotalâmicas é importante para a expressão da resposta pressora induzida pela ativação dos quimiorreceptores (Korner e Uther, 1969), é possível que parte das diferenças encontradas nos estudos da neurotransmissão do quimiorreflexo no NTS em animais anestesiados e não-anestesiados seja decorrente da menor atividade desta modulação hipotalâmica sobre os neurônios do NTS.

Outro aspecto interessante é que na preparação “coração-tronco-cerebral” isolados, onde o experimento é realizado numa condição livre da ação de anestésicos, o bloqueio dos receptores glutamatérgicos do NTS também não bloqueia a resposta pressora do quimiorreflexo (Braga e Machado, 2006). Esse dado sugere que as diferenças encontradas nos estudos de neurotransmissão do quimiorreflexo no NTS entre os animais anestesiados (Vardhan e cols., 1993; Zhang

e Mifflin, 1993) *versus* não-anestesiados (Haibara e cols., 1999) não estão apenas relacionados a utilização ou não de agentes anestésicos, mas também a influência (ou ausência desta) de núcleos superiores sobre os neurônios do NTS.

É sabido que tanto os receptores glutamatérgicos quanto os purinérgicos do NTS são importantes na neurotransmissão do quimiorreflexo em animais não-anestesiados (Braga e cols., 2007). O bloqueio isolado dos receptores glutamatérgicos ou purinérgicos não modifica a resposta pressora à ativação do quimiorreflexo em animais não-anestesiados (Haibara e cols., 1995; Machado e Bonagamba, 2005; Braga e Machado, 2006). Entretanto quando os receptores glutamatérgicos e purinérgicos do NTS são bloqueados em conjunto a resposta pressora do quimiorreflexo é abolida em ratos não-anestesiados (Braga e cols., 2007). Estes dados suportam a hipótese que estes dois neurotransmissores possuem um papel essencial no processamento do componente simpatoexcitatório do quimiorreflexo em animais não-anestesiados.

Considerando que: **1)** os receptores glutamatérgicos do HDM fazem parte da integração das respostas pressora e comportamental do quimiorreflexo (Queiroz e cols., 2011); **2)** as áreas hipotalâmicas de defesa modulam o quimiorreflexo através de interação com neurônios do NTS (Silva-Carvalho e cols., 1995a e 1995b); **3)** as áreas hipotalâmicas de defesa liberam ATP no NTS (Spyer e Thomas, 2000); **4)** a resposta pressora do quimiorreflexo é abolida apenas quando do duplo bloqueio dos receptores glutamatérgicos e purinérgicos do NTS (Braga e cols., 2007) e **5)** as respostas cardiovasculares da estimulação do HDM dependem de receptores purinérgicos do NTS, observadas no presente estudo, é possível sugerir que em animais não-anestesiados o ATP seja liberado no NTS a partir de uma via que envolve o HDM. Em animais anestesiados o HDM não seria recrutado, e, portanto

não seria liberado ATP no NTS. Assim, nesta condição experimental, a neurotransmissão do quimiorreflexo no NTS dependeria apenas do glutamato liberado pelas aferências primárias. O presente estudo avaliou esta hipótese em animais não-anestesiados com o HDM bloqueado, o efeito do bloqueio glutamatérgico do NTS sobre as respostas cardiovasculares do quimiorreflexo. Assim o presente estudo observou que o bloqueio dos receptores glutamatérgicos do HDM promoveu redução da resposta pressora ao passo que o bloqueio sequencial dos receptores glutamatérgicos do NTS aboliu a resposta bradicárdica, ambos os resultados esperados. Porém, diferente do esperado, foi observado que o bloqueio dos receptores glutamatérgicos do NTS nos animais com o HDM bloqueado não produziu redução adicional na resposta pressora. Esse resultado sugere que a liberação de purinas no NTS durante a estimulação do quimiorreflexo pode não depender apenas da estimulação dos receptores glutamatérgicos do HDM, como também pode depender da modulação de outras áreas do SNC.

Além dos aspectos cardiovasculares e comportamentais, devemos considerar também as alterações ventilatórias do quimiorreflexo, que é principal mecanismo deste reflexo de restauração da pO_2 . A resposta ventilatória do quimiorreflexo é acompanhada de aumento da atividade simpática, e, portanto também pode influenciar de forma bastante importante as respostas cardiovasculares (Huang e cols., 1988). Essa interação cardiorrespiratória tem sido proposta através de conexões existentes entre os neurônios geradores da atividade respiratória, localizados no complexo pré-Botzinger na região do bulbo ventrolateral, com os neurônios geradores da atividade simpática, localizados no RVLN, e, portanto uma interação simpato-respiratória (Guyenet e Koshiya, 1992; Koshiya e Guyenet, 1996). Desta forma, o componente simpato-excitatório do quimiorreflexo também pode ser

modulado a partir de alterações da atividade ventilatória, o que poderia efetivamente contribuir na expressão da resposta pressora.

De fato, alguns estudos sugerem que o ATP também esteja envolvido na geração e controle do ritmo respiratório (Kanjhan e cols. 1999), inclusive na mediação da resposta ventilatória o quimiorreflexo, uma vez que camundongos deficientes de receptores purinérgicos P2x apresentaram significativa redução da resposta de taquipnéia frente à hipóxia (Rong e cols, 2003). Estudo de Antunes e cols. (2005a) demonstraram que a microinjeção de ATP no NTS de ratos não-anestesiados promove, além de aumento da pressão arterial e bradicardia, resposta de taquipnéia.

A complexidade dos mecanismos centrais envolvidos no quimiorreflexo retrata o alto nível de integração neural para a ativação das respostas necessárias frente a uma situação de hipóxia. O processamento das informações quimiorreflexas pode incluir outras regiões do SNC, caracterizando assim sistemas neurais redundantes, para garantia da ocorrência das respostas compensatórias do quimiorreflexo em situações emergenciais.

Os resultados mostrados neste estudo sugerem que as respostas cardiovasculares induzidas pela estimulação direta de receptores de aminoácidos excitatórios do HDM podem ser moduladas através de receptores purinérgicos do NTS. Porém, durante o estímulo do quimiorreflexo, outras áreas além do eixo HDM-NTS podem estar envolvidas, uma vez que o bloqueio glutamatérgico do NTS em animais com o HDM bloqueado não produziu redução adicional da resposta pressora deste reflexo. Certamente outros estudos funcionais e neuroanatômicos, deverão ser realizados para o completo entendimento da circuitaria neural do quimiorreflexo em animais não-anestesiados.

8 - SUMÁRIO E CONCLUSÃO

Os dados do presente estudo visaram mostrar a contribuição da via hipotálamo dorsomedial - núcleo do trato solitário (HDM-NTS) na modulação das respostas cardiovasculares e comportamentais do quimiorreflexo em ratos não anestesiados.

- Foi observado as respostas cardiovasculares e comportamentais induzidas pela estimulação dos receptores glutamatérgicos do HDM (NMDA e não-NMDA) sob a ação do bloqueio de receptores purinérgicos do NTS. Os resultados obtidos mostraram que o bloqueio purinérgico reduziu significativamente as respostas pressora e comportamental induzidas pelos agonistas NMDA e não-NMDA, assim como reduziu a resposta taquicárdica induzida pelo agonista NMDA microinjetado no HDM. Desta forma estes resultados sugerem que as respostas cardiovasculares induzidas pela estimulação dos receptores glutamatérgicos do HDM, particularmente dos receptores NMDA, dependem de receptores purinérgicos do NTS.
- Também observamos, em animais não anestesiados e com o HDM bloqueado pelo ácido kinurênico, o papel dos receptores glutamatérgicos do NTS nas respostas cardiovasculares e comportamentais do quimiorreflexo. O presente estudo mostrou que não houve redução adicional na resposta pressora, sugerindo que a liberação de ATP no NTS durante a estimulação do quimiorreflexo pode não depender apenas da estimulação dos receptores glutamatérgicos do HDM.

Os resultados mostrados neste estudo sugerem que as respostas cardiovasculares induzidas pelo estímulo direto do HDM dependem da liberação de

purinas no NTS, porém durante o estímulo do quimiorreflexo outras áreas além do eixo HDM-NTS podem estar envolvidas.

9 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aicher SA, Saravay RH, Cravo S, Jeske I, Morrison SF, Reis DJ, Milner TA (Monosynaptic projections from the nucleus tractus solitarii to C1 adrenergic neurons in the rostral ventrolateral medulla: comparison with input from the caudal ventrolateral medulla. *J Comp Neurol* 373:62-75.1996).
- Akemi Sato M, Vanderlei Menani J, Ubriaco Lopes O, Colombari E (Lesions of the commissural nucleus of the solitary tract reduce arterial pressure in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 38:560-564.2001).
- Antunes VR, Bonagamba LG, Machado BH (Hemodynamic and respiratory responses to microinjection of ATP into the intermediate and caudal NTS of awake rats. *Brain Res* 1032:85-93.2005a).
- Antunes VR, Braga VA, Machado BH (Autonomic and respiratory responses to microinjection of ATP into the intermediate or caudal nucleus tractus solitarius in the working heart-brainstem preparation of the rat. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 32:467-472.2005b).
- Bailey TW, Dimicco JA (Chemical stimulation of the dorsomedial hypothalamus elevates plasma ACTH in conscious rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 280:R8-15.2001).
- Bailey TW, Nicol GD, Schild JH, DiMicco JA (Synaptic and membrane properties of neurons in the dorsomedial hypothalamus. *Brain Res* 985:150-162.2003).
- Barron KW, Heesch CM (Cardiovascular effects of posterior hypothalamic stimulation in baroreflex-denervated rats. *Am J Physiol* 259:H720-727.1990).
- Barros RC, Bonagamba LG, Okamoto-Canesin R, de Oliveira M, Branco LG, Machado BH (Cardiovascular responses to chemoreflex activation with potassium cyanide or hypoxic hypoxia in awake rats. *Auton Neurosci* 97:110-115.2002).
- Bazzett T, Lumley L, Bitran D, Markowski V, Warner R, Hull E (Male rat copulation following 6-OHDA lesions of the medial preoptic area: resistance to repeated administration and rapid behavioral recovery. *Brain Res* 580:164-170.1992).
- Bernardis LL, Bellinger LL (The lateral hypothalamic area revisited: ingestive behavior. *Neurosci Biobehav Rev* 20:189-287.1996).
- Bernthal T, Woodcock CC, Jr. (Responses of the vasomotor center to hypoxia after denervation of carotid and aortic bodies. *Am J Physiol* 166:45-54.1951).
- Biscoe TJ, Bradley GW, Purves MJ (The relation between carotid body chemoreceptor activity and carotid sinus pressure in the cat. *J Physiol* 203:40P.1969).

- Biscoe TJ, Duchon MR (Cellular basis of transduction in carotid chemoreceptors. *Am J Physiol* 258:L271-278.1990).
- Biscoe TJ, Sampson SR (Stimulus response curves of single carotid body chemoreceptor afferent fibres. *Nature* 215:654-655.1967).
- Blair ML, Piekut D, Want A, Olschowka JA (Role of the hypothalamic paraventricular nucleus in cardiovascular regulation. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 23:161-165.1996).
- Blessing WW (1997) *The lower brainstem and bodily homeostasis*. New York ; Oxford: Oxford University Press.
- Blessing WW, Sved AF, Reis DJ (Destruction of noradrenergic neurons in rabbit brainstem elevates plasma vasopressin, causing hypertension. *Science* 217:661-663.1982).
- Braga VA, Machado BH (Chemoreflex sympathoexcitation was not altered by the antagonism of glutamate receptors in the commissural nucleus tractus solitarii in the working heart-brainstem preparation of rats. *Exp Physiol* 91:551-559.2006).
- Braga VA, Soriano RN, Braccialli AL, de Paula PM, Bonagamba LG, Paton JF, Machado BH (Involvement of L-glutamate and ATP in the neurotransmission of the sympathoexcitatory component of the chemoreflex in the commissural nucleus tractus solitarii of awake rats and in the working heart-brainstem preparation. *J Physiol* 581:1129-1145.2007).
- Burnstock G (Purinergic nerves. *Pharmacol Rev* 24:509-581.1972).
- Cao WH, Fan W, Morrison SF (Medullary pathways mediating specific sympathetic responses to activation of dorsomedial hypothalamus. *Neuroscience* 126:229-240.2004).
- Dale N, Gourine AV, Llaudet E, Bulmer D, Thomas T, Spyer KM (Rapid adenosine release in the nucleus tractus solitarii during defence response in rats: real-time measurement in vivo. *J Physiol* 544:149-160.2002).
- de Menezes RC, Zaretsky DV, Fontes MA, DiMicco JA (Microinjection of muscimol into caudal periaqueductal gray lowers body temperature and attenuates increases in temperature and activity evoked from the dorsomedial hypothalamus. *Brain Res* 1092:129-137.2006).
- De Novellis V, Stotz-Potter EH, Morin SM, Rossi F, DiMicco JA (Hypothalamic sites mediating cardiovascular effects of microinjected bicuculline and EAAs in rats. *Am J Physiol* 269:R131-140.1995).

- de Paula PM, Antunes VR, Bonagamba LG, Machado BH (Cardiovascular responses to microinjection of ATP into the nucleus tractus solitarii of awake rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 287:R1164-1171.2004).
- DiMicco JA, Samuels BC, Zaretskaia MV, Zaretsky DV (The dorsomedial hypothalamus and the response to stress: part renaissance, part revolution. *Pharmacol Biochem Behav* 71:469-480.2002).
- Easton J, Howe A (The distribution of thoracic glomus tissue (aortic bodies) in the rat. *Cell Tissue Res* 232:349-356.1983).
- Fontes MA, Tagawa T, Polson JW, Cavanagh SJ, Dampney RA (Descending pathways mediating cardiovascular response from dorsomedial hypothalamic nucleus. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280:H2891-2901.2001).
- Franchini KG, Krieger EM (Cardiovascular responses of conscious rats to carotid body chemoreceptor stimulation by intravenous KCN. *J Auton Nerv Syst* 42:63-69.1993).
- Guyenet, PG & koshiya, N. Respiratory-sympathetic integration in the medulla oblongata. In *Central Neural Mechanisms in Cardiovascular Regulation*, vol. II, ed. Kunos, g. & Ciriello, J., pp. 226-247. Birkhauser, Boston. (1992).
- Gonzalez C, Almaraz L, Obeso A, Rigual R (Carotid body chemoreceptors: from natural stimuli to sensory discharges. *Physiol Rev* 74:829-898.1994).
- Haibara AS, Bonagamba LG, Machado BH (Sympathoexcitatory neurotransmission of the chemoreflex in the NTS of awake rats. *Am J Physiol* 276:R69-80.1999).
- Haibara AS, Colombari E, Chianca DA, Jr., Bonagamba LG, Machado BH (NMDA receptors in NTS are involved in bradycardic but not in pressor response of chemoreflex. *Am J Physiol* 269:H1421-1427.1995).
- Hilton, S. M., W. Joels. Facilitation of chemoreceptor reflexes during the defence reaction **100**, 159–174. (Abstract).*J.physiol.Lond.* 176:20p , 1965.
- Hilton SM (1982). The defence-arousal system and its relevance for circulatory and respiratory control. *J Exp Biol* 100, 159–174.
- Huang W, Lahiri S, Mokashi A, Sherpa AK (Relationship between sympathetic and phrenic nerve responses to peripheral chemoreflex in the cat. *J Auton Nerv Syst* 25:95-105.1988).
- Jin YH, Bailey TW, Li BY, Schild JH, Andresen MC (Purinergic and vanilloid receptor activation releases glutamate from separate cranial afferent terminals in nucleus tractus solitarius. *J Neurosci* 24:4709-4717.2004).

- Johnson PL, Shekhar A (Panic-prone state induced in rats with GABA dysfunction in the dorsomedial hypothalamus is mediated by NMDA receptors. *J Neurosci* 26:7093-7104.2006).
- Kanjhan R, Housley GD, Burton LD, Christie DL, Kippenberger A, Thorne PR, Luo L, Ryan AF (Distribution of the P2X2 receptor subunit of the ATP-gated ion channels in the rat central nervous system. *J Comp Neurol* 407:11-32.1999).
- Kato F, Shigetomi E (Distinct modulation of evoked and spontaneous EPSCs by purinoceptors in the nucleus tractus solitarii of the rat. *J Physiol* 530:469-486.2001).
- Korner PI, Uther JB (Dynamic characteristics of the cardiovascular autonomic effects during severe arterial hypoxia in the unanesthetized rabbit. *Circ Res* 24:671-687.1969).
- Koshiya N, Guyenet PG (NTS neurons with carotid chemoreceptor inputs arborize in the rostral ventrolateral medulla. *Am J Physiol* 270:R1273-1278.1996).
- Loewy AD, Spyer KM (1990) Central regulation of autonomic functions. New York ; Oxford: Oxford University Press.
- Machado BH, Bonagamba LG (Antagonism of glutamate receptors in the intermediate and caudal NTS of awake rats produced no changes in the hypertensive response to chemoreflex activation. *Auton Neurosci* 117:25-32.2005).
- Marshall JM (Analysis of cardiovascular responses evoked following changes in peripheral chemoreceptor activity in the rat. *J Physiol* 394:393-414.1987).
- Marshall JM & Metcalfe JD (1988). Analysis of the cardiovascular changes induced in the rat by graded levels of systemic hypoxia. *J Physiol* **407**, 385–403.
- Marshall JM (1994). Peripheral chemoreceptors and cardiovascular regulation. *J Physiol Rev* **74**, 543–594.
- Meeker RB, Greenwood RS, Hayward JN (Glutamate receptors in the rat hypothalamus and pituitary. *Endocrinology* 134:621-629.1994).
- Mifflin SW, Spyer KM, Withington-Wray DJ (Baroreceptor inputs to the nucleus tractus solitarius in the cat: postsynaptic actions and the influence of respiration. *J Physiol* 399:349-367.1988).
- Mifflin SW (Inhibition of chemoreceptor inputs to nucleus of tractus solitarius neurons during baroreceptor stimulation. *Am J Physiol* 265:R14-20.1993).
- Nathan MA, Reis DJ (Chronic labile hypertension produced by lesions of the nucleus tractus solitarii in the cat. *Circ Res* 40:72-81.1977).

- Paton JF, De Paula PM, Spyer KM, Machado BH, Boscan P (Sensory afferent selective role of P2 receptors in the nucleus tractus solitarii for mediating the cardiac component of the peripheral chemoreceptor reflex in rats. *J Physiol* 543:995-1005.2002).
- Paxinos G, Watson C (1986) *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Sydney ; Orlando: Academic Press.
- Queiroz EA, Okada MN, Fumega U, Fontes MA, Moraes MF, Haibara AS (Excitatory amino acid receptors in the dorsomedial hypothalamus are involved in the cardiovascular and behavioural chemoreflex responses. *Exp Physiol* 96:73-84.2011).
- Ricardo JA, Koh ET (Anatomical evidence of direct projections from the nucleus of the solitary tract to the hypothalamus, amygdala, and other forebrain structures in the rat. *Brain Res* 153:1-26.1978).
- Rong W, Gourine AV, Cockayne DA, Xiang Z, Ford AP, Spyer KM, Burnstock G (Pivotal role of nucleotide P2X2 receptor subunit of the ATP-gated ion channel mediating ventilatory responses to hypoxia. *J Neurosci* 23:11315-11321.2003)
- Ross CA, Ruggiero DA, Reis DJ (Projections from the nucleus tractus solitarii to the rostral ventrolateral medulla. *J Comp Neurol* 242:511-534.1985).
- Sapru HN, Krieger AJ (Carotid and aortic chemoreceptor function in the rat. *J Appl Physiol* 42:344-348.1977).
- Shekhar A, DiMicco JA (Defense reaction elicited by injection of GABA antagonists and synthesis inhibitors into the posterior hypothalamus in rats. *Neuropharmacology* 26:407-417.1987).
- Shigetomi E, Kato F (Action potential-independent release of glutamate by Ca²⁺ entry through presynaptic P2X receptors elicits postsynaptic firing in the brainstem autonomic network. *J Neurosci* 24:3125-3135.2004).
- Silva-Carvalho L, Dawid-Milner MS, Goldsmith GE, Spyer KM (Hypothalamic-evoked effects in cat nucleus tractus solitarius facilitating chemoreceptor reflexes. *Exp Physiol* 78:425-428.1993).
- Silva-Carvalho L, Dawid-Milner MS, Goldsmith GE, Spyer KM (Hypothalamic modulation of the arterial chemoreceptor reflex in the anaesthetized cat: role of the nucleus tractus solitarii. *J Physiol* 487 (Pt 3):751-760.1995 A).
- Silva-Carvalho L, Dawid-Milner MS, Spyer KM (The pattern of excitatory inputs to the nucleus tractus solitarii evoked on stimulation in the hypothalamic defence area in the cat. *J Physiol* 487 (Pt 3):727-737.1995 B).

- Soltis RP, DiMicco JA (Interaction of hypothalamic GABAA and excitatory amino acid receptors controlling heart rate in rats. *Am J Physiol* 261:R427-433.1991).
- Soltis RP, DiMicco JA (Hypothalamic excitatory amino acid receptors mediate stress-induced tachycardia in rats. *Am J Physiol* 262:R689-697.1992).
- Spyer KM, Thomas T (A role for adenosine in modulating cardio-respiratory responses: a mini-review. *Brain Res Bull* 53:121-124.2000).
- Stuesse SL, Fish SE (Projections to the cardioinhibitory region of the nucleus ambiguus of rat. *J Comp Neurol* 229:271-278.1984).
- Stuesse SL, Powell KS (1982) Cardiac vagal preganglionic fibers in neonatal rats: a comparison with cervical vagal components. In: *Neurosci Lett*, vol. 34, pp 7-12.
- Sun MK, Spyer KM (Responses of rostroventrolateral medulla spinal vasomotor neurones to chemoreceptor stimulation in rats. *J Auton Nerv Syst* 33:79-84.1991).
- Swanson LW, Sawchenko PE (Paraventricular nucleus: a site for the integration of neuroendocrine and autonomic mechanisms. *Neuroendocrinology* 31:410-417.1980).
- Talman WT (Kynurenic acid microinjected into the nucleus tractus solitarius of rat blocks the arterial baroreflex but not responses to glutamate. *Neurosci Lett* 102:247-252.1989).
- Talman WT, Perrone MH, Reis DJ (Evidence for L-glutamate as the neurotransmitter of baroreceptor afferent nerve fibers. *Science* 209:813-815.1980).
- ter Horst GJ, Luiten PG (The projections of the dorsomedial hypothalamic nucleus in the rat. *Brain Res Bull* 16:231-248.1986).
- Thompson RH, Canteras NS, Swanson LW (Organization of projections from the dorsomedial nucleus of the hypothalamus: a PHA-L study in the rat. *J Comp Neurol* 376:143-173.1996).
- Urbanski RW, Sapru HN (Evidence for a sympathoexcitatory pathway from the nucleus tractus solitarii to the ventrolateral medullary pressor area. *J Auton Nerv Syst* 23:161-174.1988).
- Vardhan A, Kachroo A, Sapru HN (Excitatory amino acid receptors in the nucleus tractus solitarius mediate the responses to the stimulation of cardio-pulmonary vagal afferent C fiber endings. *Brain Res* 618:23-31.1993).
- Wible JH, Jr., Luft FC, DiMicco JA (Hypothalamic GABA suppresses sympathetic outflow to the cardiovascular system. *Am J Physiol* 254:R680-687.1988).

Yardley CP & Hilton SM (1986). The hypothalamic and brainstem areas from which the cardiovascular and behavioural components of the defence reaction are elicited in the rat. *J Auton Nerv Syst* **15**, 227–244.

Zhang W, Mifflin SW (Excitatory amino acid receptors within NTS mediate arterial chemoreceptor reflexes in rats. *Am J Physiol* 265:H770-773.1993).

