

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA E BIOFÍSICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:  
FISILOGIA E FARMACOLOGIA

***EFEITOS DO ATP E DOS RECEPTORES  
PURINÉRGICOS DA ÁREA A5 NA  
NEUROTRANSMISSÃO DO QUIMIORREFLEXO EM  
RATOS NÃO-ANESTESIADOS***

***SÍLVIA AMARAL ZEBRAL***

**BELO HORIZONTE - MG**

**2015**

**SÍLVIA AMARAL ZEBRAL**

***EFEITOS DO ATP E DOS RECEPTORES  
PURINÉRGICOS DA ÁREA A5 NA  
NEUROTRANSMISSÃO 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 título de Mestre em Ciências Biológicas.*

***Orientadora: Prof. Dra. Andréa Siqueira Haibara***

**Belo Horizonte - MG**

**2015**

043

Zebral, Sílvia Amaral.

Efeitos do ATP e dos receptores purinérgicos da área A5 na neurotransmissão do quimiorreflexo em ratos não-anestesiados [manuscrito] / Sílvia Amaral Zebral. – 2015.

83 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Andréa Siqueira Haibara.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Fisiologia e Biofísica.

1. Sistema cardiovascular - Teses. 2. Quimiorreflexo. 3. Receptores purinérgicos P2. 4. Fisiologia – Teses. I. Haibara, Andréa Siqueira. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Departamento de Fisiologia e biofísica. IV. Título.

CDU: 612

# "EFEITOS DO ATP E DOS RECEPTORES PURINÉRGICOS DA ÁREA A5 NA NEUROTRANSMISSÃO DO QUIMIORREFLEXO EM RATOS NÃO-ANESTESIADOS"

**SILVIA AMARAL ZEBRAL**

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia 21 de maio de 2015, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:



**PROFA. DR.ª. ANDRÉIA CARVALHO ALZAMORA**  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO



**PROFA. DR.ª. LÍGIA ARAÚJO NAVES KUSHMERICK**  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



**PROFA. DR.ª. ANDREA SIQUEIRA HAIBARA**  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
ORIENTADORA

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Fisiologia e Farmacologia  
Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

**Belo Horizonte, 21 de maio de 2015**

*“Quando amamos e acreditamos do fundo de nossa alma, em algo, nos sentimos mais fortes que o mundo, e somos tomados de uma serenidade que vem da certeza de que nada poderá vencer a nossa fé. Esta força estranha faz com que sempre tomemos a decisão certa, na hora exata e, quando atingimos nossos objetivos, ficamos surpresos com nossa própria capacidade.”*

*(Paulo Coelho)*

## **AGRADECIMENTOS**

Meus sinceros agradecimentos:

À Deus, por me dar coragem para seguir em frente em meio às tantas dificuldades que apareceram em meu caminho. Depois de certo tempo consegui compreender que esses obstáculos surgiram para acrescentar sabedoria à minha vida.

À minha família, pela torcida constante. Em especial aos meus pais, Amauri e Marta, por me ensinarem a agir com dignidade, honestidade e respeito, por nunca medirem esforços para que eu conseguisse alcançar os meus sonhos, sempre me incentivaram, lutaram junto comigo e vibraram com minhas conquistas.

À minha orientadora, Prof. Dra. Andréa Siqueira Haibara, por ter me concedido, mesmo que em um momento difícil, a oportunidade de fazer o mestrado e por todo o apoio e paciência, pelo exemplo de profissionalismo e pela amizade. Muito obrigada!

Ao meu namorado, Jhonny, por ser tão paciente e sempre acreditar que tudo daria certo, pelas palavras de incentivo nas horas mais difíceis, por estar sempre ao meu lado e pelo seu amor sem fim.

À todos os professores e colegas do Laboratório de Hipertensão, pela ótima receptividade, pelo apoio e pelos bons momentos de convivência. Em especial, à Nathália Teodoro, por me ensinar as técnicas que utilizei em meus experimentos.

Aos colegas de mestrado Héric e Jônathas, pela amizade, ajuda e pelas boas conversas. Em especial à minha amiga Cris, por sempre me ouvir, ajudar e torcer por mim.

Aos docentes do departamento de Fisiologia e Biofísica, pelos ensinamentos compartilhados e por ampliarem meus conhecimentos na área de fisiologia.

Ao Zezé, pelo auxílio imprescindível no início dessa caminhada e ao longo dela.

Aos funcionários da secretaria da pós-graduação e do CEBIO, sempre disponíveis para esclarecerem minhas dúvidas e auxiliarem no que fosse preciso.

Às professoras da banca examinadora, Dra. Andréia Carvalho Alzamora e Dra. Lígia Araújo Naves Kushmerick, pelo tempo investido na análise deste trabalho e pela fundamental contribuição intelectual para a conclusão do mesmo.

À Universidade Federal de Minas Gerais e a CAPES, agência de fomento financiadora da minha bolsa de mestrado.

Aos animais de laboratório, que, involuntariamente, contribuem para a pesquisa.

Enfim, a todos aqueles que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho e torceram por mim: *Meus sinceros agradecimentos a todos vocês!*



# SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	1
<b>ABSTRACT</b> .....	3
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	5
1.1. Quimiorreceptores Periféricos .....	6
1.2. Vias neurais do quimiorreflexo .....	10
1.3. Área A5 .....	12
1.4. Área A5 e quimiorreflexo .....	15
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	20
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	22
3.1. Implante de cânulas-guia na área A5 .....	23
3.2. Canulação da artéria e veia femoral .....	25
3.3. Registro da pressão arterial e da frequência cardíaca .....	26
3.4. Estimulação dos quimiorreceptores periféricos .....	26
3.5. Técnica para microinjeção de drogas na área A5 .....	27
3.6. Drogas utilizadas .....	27
3.7. Histologia .....	28
3.8. Análise estatística .....	29
3.9. Protocolos experimentais .....	29
3.9.1. Alterações na pressão arterial e na frequência cardíaca induzidas pela microinjeção unilateral do agonista dos receptores purinérgicos P2, $\alpha,\beta$ -metileno ATP, na área A5 de ratos não-anestesiados .....	29

3.9.2. Alterações na pressão arterial e na frequência cardíaca induzidas pela microinjeção unilateral de $\alpha,\beta$ -metileno ATP na área A5 de ratos não-anestesiados antes e após a microinjeção unilateral de PPADS.....	30
3.9.3. Respostas cardiovasculares à ativação do quimiorreflexo em ratos não-anestesiados antes e após o bloqueio bilateral dos receptores purinérgicos P2 da área A5 com o antagonista PPADS. ....	31
3.9.4. Respostas cardiovasculares à ativação do quimiorreflexo em ratos não-anestesiados antes e após o bloqueio bilateral simultâneo dos receptores purinérgicos P2 e dos receptores glutamatérgicos da área A5. ....	32
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>34</b>
4.1. Efeitos cardiovasculares induzidos pela microinjeção unilateral do agonista purinérgico ionotrópico $\alpha,\beta$ -metileno ATP na área A5 em ratos não-anestesiados.....	35
4.2. Efeito da microinjeção de PPADS na área A5 sobre as respostas cardiovasculares induzidas pela microinjeção de $\alpha,\beta$ -metileno ATP nessa mesma região em ratos não-anestesiados. ....	38
4.3. Efeito da microinjeção bilateral de PPADS na área A5 sobre as respostas cardiovasculares induzidas pela estimulação do quimiorreflexo em ratos não-anestesiados.....	42
4.4. Efeito da microinjeção bilateral de PPADS e ácido kinurênico na área A5 sobre as respostas cardiovasculares induzidas pela estimulação do quimiorreflexo em ratos não-anestesiados.....	47
4.5. Análise histológica.....	52
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>54</b>
<b>6. SUMÁRIO E CONCLUSÃO.....</b>	<b>63</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>65</b>
<b>8. APÊNDICE .....</b>	<b>76</b>

## RESUMO

O objetivo do presente estudo foi avaliar a possível participação dos receptores purinérgicos P2 da área A5 no controle da pressão arterial e da frequência cardíaca e nas respostas cardiovasculares à ativação do quimiorreflexo periférico em ratos não-anestesiados. Observamos que a microinjeção de  $\alpha,\beta$ -metileno ATP [0,625 e 1,25 nmol/100nl - agonista dos receptores P2X) promoveu aumento da pressão arterial média ( $+0,0\pm 0,5$  vs.  $+25\pm 5$  e  $+25\pm 3$  mmHg) e da frequência cardíaca ( $+0,9\pm 2$  vs.  $+39\pm 9$  e  $+56\pm 10$  bpm) em comparação aos efeitos induzidos pelo veículo ( $n=8$ ,  $p<0,05$ ). As respostas pressora e taquicárdica induzidas pelo agonista  $\alpha,\beta$ -metileno ATP (1,25nmol/100nl) foram reduzidas ( $+33\pm 6$  vs.  $+14\pm 5$  mmHg e  $+70\pm 11$  vs.  $+27\pm 13$  bpm) pela microinjeção prévia na área A5 do antagonista de receptores P2, o PPADS (Pyridoxal-phosphate-6-azophenyl-2',4'-disulfonate - 0,5nmol/100nl). Entretanto, a microinjeção bilateral do PPADS (0,5nmol/100nl) na área A5 não promoveu nenhuma alteração nas respostas pressora ( $+38\pm 6$  vs.  $+39\pm 6$ ;  $+43\pm 4$ ;  $+41\pm 3$ ;  $+40\pm 2$  e  $+37\pm 5$  mmHg) e bradicárdica ( $-253\pm 8$  vs.  $-237\pm 25$ ;  $-248\pm 12$ ;  $-250\pm 17$ ;  $-251\pm 13$  e  $-253\pm 17$  bpm) do quimiorreflexo em relação à resposta controle ( $n=5$ ,  $p>0,05$ ). De forma semelhante ao observado durante o bloqueio isolado, o bloqueio simultâneo dos receptores purinérgicos P2 e glutamatérgicos ionotrópicos através da microinjeção sequencial dos antagonistas PPADS (0,25nmol/50nl) e ácido kinurênico (2nmol/50nl) na área A5 de ratos não-anestesiados também não promoveu alterações significativas nas respostas pressora ( $+49\pm 3$  vs.  $+41\pm 4$ ;  $+46\pm 5$ ;  $+47\pm 4$ ;  $+44\pm 3$ ;  $+47\pm 4$  mmHg) e bradicárdica ( $-252\pm 23$  vs.  $-259\pm 28$ ;  $-250\pm 11$ ;  $-268\pm 11$ ;  $-260\pm 10$ ;  $-259\pm 14$  bpm) do quimiorreflexo ( $n=6$ ,  $p>0,05$ ). Nossos resultados mostram pela primeira vez que os receptores purinérgicos P2 da área A5 participam do controle da pressão arterial e da frequência cardíaca. Entretanto, os receptores

purinérgicos, isoladamente ou combinados com os receptores glutamatérgicos ionotrópicos, parecem não participar da integração das respostas cardiovasculares do quimiorreflexo na área A5 em ratos não-anestesiados.

Palavras-chave: Quimiorreflexo, Área A5, Receptores purinérgicos.

## ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the possible involvement of purinergic P2 receptors in the A5 area on arterial blood pressure and heart rate control and on cardiovascular responses to peripheral chemoreflex activation in non-anesthetized rats. We observed that the microinjection of  $\alpha,\beta$ -methylene ATP [0.625 and 1.25 nmol/100nl - P2X receptor agonist) induced an increase in mean arterial pressure (+0.0 $\pm$ 0.5 vs. +25 $\pm$ 5 and +25 $\pm$ 3 mmHg) and heart rate (+0.9 $\pm$ 2 vs. +39 $\pm$ 9 and +56 $\pm$ 10 bpm) when compared to the effects induced by the vehicle (n=8, p<0.05). The pressor and tachycardia responses induced by  $\alpha,\beta$ -methylene ATP (1.25nmol/100nl) were reduced (+33 $\pm$ 6 vs. +14 $\pm$ 5 mmHg and +70 $\pm$ 11 vs. +27 $\pm$ 13 bpm) by the previous microinjection of the P2 receptors antagonist, PPADS (Pyridoxal-phosphate-6-azophenyl-2',4'-disulfonate - 0.5nmol/100nl). However, bilateral microinjection of PPADS (0.5nmol/100nl) in the A5 area produced no changes in pressor (+38 $\pm$ 6 vs. +39 $\pm$ 6; +43 $\pm$ 4; +41 $\pm$ 3; +40 $\pm$ 2; +37 $\pm$ 5 mmHg) and bradycardic responses (-253 $\pm$ 8 vs. -237 $\pm$ 25; -248 $\pm$ 12; -250 $\pm$ 17; -251 $\pm$ 13 and -253 $\pm$ 17 bpm) of the chemoreflex when compared with the control response (n=5, p>0.05). Similarly to the isolated blockade, the simultaneous blockade of purinergic P2 and ionotropic glutamate receptors by sequential microinjection of the antagonists PPADS (0.25nmol/50nl) and kinurenic acid (2nmol/50nl) in the A5 area of non-anesthetized rats promoted no significant changes in pressor (+49 $\pm$ 3 vs +41 $\pm$ 4; +46 $\pm$ 5; +47 $\pm$ 4; +44 $\pm$ 3, +47 $\pm$ 4 mmHg) and bradycardic (-252 $\pm$ 23 vs -259 $\pm$ 28; -250 $\pm$ 11; -268 $\pm$ 11; -260 $\pm$ 10; -259 $\pm$ 14 bpm) responses of chemoreflex (n=6, p>0.05). Our results show for the first time that purinergic P2 receptors in the A5 area participate of blood pressure and heart rate control. However, the purinergic

receptors, alone or combined with ionotropic glutamate receptors, do not participate in the integration of cardiovascular responses of the chemoreflex in non-anesthetized rats.

Keywords: Chemoreflex, A5 area, Purinergic receptors.

# **1. INTRODUÇÃO**

A função primordial do sistema cardiovascular é promover a perfusão sanguínea adequada a todos os territórios vasculares do organismo, controlando o fornecimento de oxigênio e nutriente para as células e tecidos, mantendo assim a condição de homeostase. Para tanto, o sistema cardiovascular possui mecanismos de controle, que podem ser locais, humorais ou neurais (Guyenet, 2006).

Os mecanismos neurais de controle do sistema cardiovascular envolvem a ativação de vários grupos de sensores periféricos, dentre eles, os quimiorreceptores, barorreceptores e receptores cardiopulmonares (Loewy e Spyer, 1990). Esses sensores transmitem por meio de suas aferências as informações captadas para regiões específicas do sistema nervoso central (SNC). Nestas regiões, as informações são integradas, promovendo ajustes rápidos da pressão arterial, frequência cardíaca e ventilação por meio de alterações nas atividades eferentes autonômicas simpática e parassimpática e respiratórias (Guyenet, 2006). Dentre os sistemas sensoriais mais importantes para o controle da função cardiovascular destacam-se os quimiorreceptores periféricos.

### **1.1. Quimiorreceptores Periféricos**

Os quimiorreceptores periféricos estão 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) (Comroe, 1939; Sapru e Krieger, 1977). Entretanto, de acordo com Easton e Howe (1983) os corpúsculos aórticos estão geralmente ausentes no coelho, rato e camundongo, assim como no humano. Os quimiorreceptores periféricos são estruturas especializadas em detectar alterações na pressão parcial de oxigênio ( $pO_2$ ), na pressão parcial de gás carbônico ( $pCO_2$ ) e



na concentração de íons hidrogênio (pH) do sangue (Heymans e Bouckaert, 1930; Biscoe, 1971).

O quimiorreflexo pode ser ativado regularmente em determinadas situações fisiopatológicas, como na apneia do recém-nascido e na apneia obstrutiva do sono (OSA), onde cada período de apneia pode gerar uma hipoxemia acentuada (Carlson e cols., 1993). Na apneia obstrutiva do sono repetidos episódios noturnos de bloqueio das vias aéreas causa asfixia periódica, levando a episódios de aumento da pressão arterial. A elevação aguda da pressão arterial está associada com o aumento da atividade nervosa simpática, que resulta da ativação dos quimiorreceptores periféricos devido à diminuição da concentração de O<sub>2</sub> do sangue. A asfixia intermitente pode contribuir para a elevação crônica da atividade simpática, uma vez que a asfixia sensibiliza os quimiorreceptores carotídeos à hipóxia e faz com que os aferentes dos quimiorreceptores se tornem tonicamente ativos mesmo quando a concentração de oxigênio no sangue é normal (Wolk e cols., 2003; Prabhakar e cols., 2005; Prabhakar e cols., 2015).

As células quimiossensíveis localizadas nos corpúsculos carotídeos recebem irrigação por meio de uma pequena artéria, irrigação esta que lhes confere a maior relação perfusão sanguínea por grama de tecido quando comparada com outros tecidos do corpo (MacDonald, 1981). Estudos morfológicos de Pallot e cols. (1987) sugeriram que o corpúsculo carotídeo possui dois tipos celulares distintos: células do tipo I, ou células glomus, e células do tipo II ou de sustentação. As células do tipo I apresentam-se em maior número e encontram-se envolvidas por células do tipo II. A inervação sensorial do corpúsculo carotídeo é realizada por meio do nervo do seio carotídeo, cujos terminais aferentes formam sinapses químicas com as células do tipo I (MacDonald, 1981).

Quando um animal é submetido a situações de hipóxia, o decréscimo na  $pO_2$  é detectado pelas células glomus dos quimiorreceptores e, devido à presença de canais de potássio sensíveis ao  $O_2$  em sua membrana celular ocorre, sequencialmente, inibição dos canais de  $K^+$  impedindo a saída do potássio para o meio extracelular, despolarização da membrana e ativação dos canais de  $Ca^{+2}$  voltagem-dependentes, o que leva ao aumento de  $Ca^{+2}$  intracelular, resultando na liberação de neurotransmissores por vesículas. Os neurotransmissores despolarizam a terminação do nervo do seio carotídeo e geram potenciais de ação que se propagam pelo nervo em direção ao SNC (González e cols., 1995). Alguns estudos foram realizados com o objetivo de identificar qual neurotransmissor seria liberado pelas células do tipo I. Foi observado que o corpúsculo carotídeo sintetiza e estoca uma variedade de neurotransmissores e neuromoduladores, como dopamina, acetilcolina, ATP, GABA, serotonina, óxido nítrico entre outros (Nurse & Zhang, 1999; Fitzgerald, 2000; Shriahata et al., 2007; Nurse, 2010, Prabhakar e cols., 2015). Assim, em resumo, as células glomus são capazes de traduzir a redução na  $pO_2$  em sinais nervosos aferentes que conduzem as informações para o SNC desencadeando as respostas do quimiorreflexo.

Heymans e Bockaert (1930) demonstraram em um estudo clássico que, em cães, a estimulação dos quimiorreceptores carotídeos realizada por meio da oclusão das artérias carótidas, promoveu aumento da pressão arterial e da frequência e amplitude da respiração desses animais. Da mesma forma, Bernthal (1938) evidenciou que a estimulação química dos quimiorreceptores carotídeos por meio da infusão de cianeto de sódio (NaCN) em cães promoveu vasoconstrição periférica, a qual foi também acompanhada por um aumento da frequência respiratória. A estimulação dos quimiorreceptores, além de promover respostas reflexas

ventilatórias, também induz alterações cardiovasculares. Franchini & Krieger (1993) mostraram que a injeção intravenosa de cianeto de potássio (KCN) em ratos não-anestesiados é capaz de ativar o quimiorreflexo, promovendo elevação significativa da pressão arterial e intensa bradicardia. Além disso, um estudo de Barros e cols. (2002) mostrou que a injeção intravenosa de KCN produz um padrão de respostas cardiovasculares, respiratórias e comportamentais semelhantes àquelas induzidas pela hipóxia hipóxica e mostrou também que essas respostas são abolidas após a ligadura da artéria que irriga os corpúsculos carotídeos.

Estudos mostram que a ativação do quimiorreflexo promove duas respostas autonômicas independentes, uma vez que a administração de prazosin, um antagonista  $\alpha$ -1 adrenérgico é capaz de bloquear o aumento da pressão arterial, sem alterar a bradicardia promovida pela administração de KCN, a qual foi abolida pelo tratamento prévio dos animais com metil-atropina, o que indica que a resposta pressora depende da atividade eferente simpática vascular (resposta simpatoexcitatória) e que a bradicardia é dependente da ativação parassimpática (resposta parassimpatoexcitatória) e não é secundária à ativação dos barorreceptores decorrentes da elevação da pressão arterial (Franchini & Krieger, 1993; Haibara e cols., 1995; Machado e cols, 2006).

É importante destacar o fato de que as respostas cardiovasculares e respiratórias promovidas pela ativação do quimiorreflexo em ratos anestesiados podem ser diferentes daquelas promovidas em ratos não-anestesiados. Estudos de Franchini e Krieger (1993) demonstraram que o anestésico pentobarbital atenuou significativamente a resposta bradicárdica decorrente da ativação do quimiorreflexo e que, de modo similar ao anestésico cloralose, bloqueou a resposta pressora. Isso indica que os diferentes anestésicos podem afetar a transmissão das respostas

cardiovasculares e respiratória decorrentes da ativação do quimiorreflexo. 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, caracterizada por estado de alerta e reação de defesa, decorrente da ativação de diferentes áreas prosencefálicas e mesencefálicas (Marshall, 1987; Franchini e Krieger, 1993), resposta essa que é ausente em animais anestesiados. Portanto, os estudos envolvendo a neurotransmissão desse reflexo devem ser realizados, preferencialmente, em modelos experimentais nos quais não sejam utilizados anestésicos.

## **1.2. Vias neurais do quimiorreflexo**

A ativação do quimiorreflexo periférico produz respostas respiratórias, autonômicas e comportamentais, como citado anteriormente (Haibara et al., 1995; Haibara et al., 1999; Machado, 2001; Barros, 2002; Machado, 2004). As células quimiossensíveis do corpúsculo carotídeo, quando estimuladas, liberam neurotransmissores resultando na estimulação do nervo do seio carotídeo, que irá conduzir esse sinal em direção ao SNC fazendo sua primeira sinapse no núcleo do trato solitário (NTS). O NTS é formado por um conjunto heterogêneo de neurônios localizado na porção dorso-medial do bulbo (Mifflin, 1992; Gonzalez e cols., 1994; Andresen & Kunze, 1994; Sapru, 1996) e pode ser considerado uma das mais importantes estações sinápticas do tronco cerebral que integra informações sensoriais aferentes do sistema cardiovascular, produzindo ajustes autonômicos e ventilatórios adequados às diferentes situações fisiológicas (Mifflin, 1992; Chitravanshi e Sapru, 1995; Machado, 2001; Costa-Silva e cols., 2010).

Estudos mostram que após a integração dessas respostas, o NTS envia projeções para centros simpáticos e respiratórios do bulbo ventrolateral rostral (RVLM) (Urbanski and Sapru, 1988; Aicher e cols., 1996; Koshiya and Guyenet, 1996). No RVLM existem neurônios que se projetam diretamente para a coluna intermédialateral da medula espinhal fazendo sinapses com os neurônios pré-ganglionares simpáticos, ou neurônios pré-simpáticos (Dampney e cols., 2003). O NTS também envia projeções diretas para o núcleo ambíguo (NA), uma área que constitui a origem das fibras pré-ganglionares parassimpáticas (Stuesse e Powell, 1982). 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 aumento da atividade simpática vascular e conseqüentemente aumento da pressão arterial, quanto para o NA, determinando aumento da atividade eferente parassimpática, e conseqüente bradicardia.

Anormalidades nas aferências dos quimiorreceptores, ou no seu processamento no NTS, podem contribuir para o desenvolvimento de hipertensão neurogênica. A hipertensão é, por definição, uma elevação crônica da pressão arterial, e é considerada neurogênica se a sua provável causa for alguma anormalidade do sistema nervoso autônomo (Guyenet, 2006).

Apesar de ser estabelecido que as fibras aferentes primárias dos quimiorreceptores terminem no NTS, as projeções a partir desse núcleo para outras áreas do cérebro envolvidas com o componente simpatoexcitatório do quimiorreflexo ainda não foram completamente caracterizadas. Estudos de Sun e Spyer (1991), Koshiya e cols. (1993) e Koshiya e Guyenet (1996) suportam a hipótese que o RVLM participa, ao menos em parte, da resposta simpatoexcitatória do quimiorreflexo. No entanto, estudos de Amaral (1999) e Mauad e Machado (2001),

realizados em ratos não-anestesiados, mostraram que o bloqueio do RVLM com ácido kinurênico ou muscimol, não alterou a resposta pressora à ativação dos quimiorreceptores carotídeos, sugerindo que o RVLM, nesta condição experimental, não participa de forma importante da resposta simpatoexcitatória do quimiorreflexo.

Dessa forma, pode-se sugerir que outras áreas do SNC estariam envolvidas na resposta simpatoexcitatória do quimiorreflexo, uma vez que já foi demonstrado que áreas como o núcleo paraventricular do hipotálamo (Cruz e cols., 2008; King e cols., 2012), núcleo parabraquial (Haibara e cols., 2002) e área A5 (Guyenet e cols., 1993; Koshiya & Guyenet, 1994; Kanbar *et al.* 2011) são ativadas em situações de hipóxia. Além disso, estudos também mostram que existem outros grupamentos neuronais, além do RVLM, presentes no tronco cerebral e no hipotálamo que também se projetam diretamente para a medula espinhal e fazem sinapses com os neurônios pré-ganglionares simpáticos, podendo desempenhar importante papel no controle simpático vasomotor. Dentre essas áreas podemos citar o núcleo paraventricular, o bulbo ventromedial rostral e a área A5 (Byrum & Guyenet, 1987; Strack e cols.; 1989).

### **1.3. Área A5**

A área A5 está localizada na região ventrolateral da ponte, entre o núcleo da oliva superior e fibras do nervo facial (Dahlström e Fuxe, 1964). A maioria dos neurônios da área A5 é constituída por células que contém a enzima dopamina  $\beta$ -hidroxilase, mas não a enzima feniletanolamina-N-metil-transferase (PNMT), caracterizando-se, assim, como uma área predominantemente de células noradrenérgicas (Swanson e Hartman, 1975).

Estudos neuroanatômicos mostram que a área A5 faz conexões com diferentes regiões do SNC sabidamente envolvidas no controle cardiovascular. A área A5 recebe aferências do núcleo hipotalâmico paraventricular, área hipotalâmica perifornical, núcleo parabraquial, NTS, núcleos da rafe, substância cinzenta periaquedutal, bulbo ventrolateral caudal (CVLM) e RVLM (Byrum e Guyenet, 1987, Abbott e cols., 2012; Bajic e cols., 2012; López-González, 2013). A área A5 envia projeções para o NTS, área hipotalâmica lateral, núcleo hipotalâmico paraventricular, substância cinzenta periaquedutal, núcleo central da amígdala, RVLM, CVLM, dentre outras (Byrum e Guyenet, 1987). Além disso, a área A5 também envia densas projeções (cerca de 90% dos neurônios) para a coluna intermédialateral (CIML) na medula espinhal torácica e lombar (Loewy e cols., 1979; e Westlund e cols., 1983). Essas conexões com regiões do SNC envolvidas na regulação cardiorrespiratória são indicativas do papel da área A5 no controle tanto da atividade simpática quanto da função cardiorrespiratória (Spyer, 1994; Dampney e cols., 2003, Taxini e cols., 2011).

Trabalhos recentes demonstraram que os neurônios da área A5 participam das respostas cardiovasculares evocadas a partir da estimulação elétrica da área hipotalâmica de defesa, uma vez que a inibição da área A5 com muscimol reduziu a taquicardia e a resposta pressora causadas pela estimulação da área hipotalâmica de defesa (López-González e cols., 2013). Além disso, foi observado que a estimulação dos neurônios C1, um grupamento de neurônios adrenérgicos localizados no RVLM que participa da ativação do tônus simpático, produz aumento da frequência de disparos dos neurônios da área A5 (Abbott e cols., 2012).

Estudos funcionais em ratos anestesiados mostram a participação direta da área A5 na modulação cardiovascular. Estudos utilizando estimulação elétrica

sugerem que a área A5 tenha papel simpatoexcitatório, uma vez que a estimulação desta área promove resposta pressora (Loewy e cols. 1979; Andrade e Aghajanian, 1982; Byrum e cols. 1984; Woodruff e cols. 1986; Huangfu e cols. 1991; Huangfu e cols. 1992). Kanbar e cols. (2011) em seus experimentos optogenéticos, observaram que a fotoestimulação dos neurônios noradrenérgicos da área A5 produz aumento na atividade simpática renal e na cadeia simpática lombar. Por outro lado, trabalhos realizados por Neil e cols. (1982); Stanek e cols. (1984); Drye e cols. (1990); Huangfu e cols. (1992) e Dickerson e cols. (1997) utilizando microinjeções de aminoácidos excitatórios diretamente na área A5 sugerem um papel simpatoinibitório dessa área. Embora a microinjeção de L-glutamato na área A5 de ratos anestesiados promova hipotensão, indicando que esta área tenha função predominantemente simpatoinibitória, estudos analisando o registro da atividade eferente simpática em diferentes leitos vasculares confrontam essa hipótese. Nesses estudos, Stanek e cols. (1984) e Huangfu e cols. (1992) mostraram que a estimulação da área A5 com L-glutamato em ratos anestesiados diminuiu a atividade simpática lombar, enquanto a atividade eferente simpática renal e esplâncnica aumentou. Diante dessas evidências é razoável sugerir que seja possível a ativação tanto de uma via simpatoinibitória quanto de uma via simpatoexcitatória a partir da área A5, pelo menos no que diz respeito ao efeito da estimulação da área A5 em animais anestesiados.

Em relação a estudos com animais não-anestesiados, Ramos (2002) observou que a microinjeção de L-glutamato na área A5 de ratos acordados promoveu aumento da pressão arterial e taquicardia de forma dose-dependente. Estes resultados indicam que a área A5, quando estimulada numa condição experimental fisiologicamente mais adequada, evitando-se a possível interferência



dos efeitos dos anestésicos no processamento das informações no SNC, apresenta-se preferencialmente como uma área pressora, sugerindo um importante papel desse conjunto de neurônios no controle e/ou modulação da atividade eferente simpática.

#### **1.4. Área A5 e quimiorreflexo**

Em relação à participação da área A5 nos reflexos cardiovasculares, estudos imunohistoquímicos de Erickson e Millhorn (1994) e de Hirooka e cols. (1997) demonstraram a expressão da proteína Fos nos neurônios noradrenérgicos da área A5 em animais submetidos à hipóxia, sugerindo que esses neurônios são estimulados durante a ativação do quimiorreflexo. Estudos eletrofisiológicos de Guyenet e cols. (1993) mostraram ainda que a hipóxia aumenta a frequência de disparos dos neurônios da área A5, acompanhado ainda de aumento da pressão arterial e da atividade do nervo frênico, o que não foi observado em animais quimiodesnervados. Estudos mais recentes de Kanbar e cols. (2011) mostraram que os neurônios noradrenérgicos da área A5 são vigorosamente ativados pela estimulação do corpúsculo carotídeo, sugerindo que esses neurônios contribuem para a estimulação cardiovascular causada pela hipóxia aguda. Estudos funcionais de Koshiya e Guyenet (1994a) demonstraram que a microinjeção de muscimol na A5 promoveu redução de 68% do aumento da atividade simpática induzida pela estimulação dos quimiorreceptores periféricos. Ramos (2002) utilizando muscimol e lidocaína microinjetadas bilateralmente na área A5 de ratos não-anestesiados, observou atenuação significativa (82% e 86%, respectivamente) da resposta pressora do quimiorreflexo induzido por KCN. Quando os neurônios noradrenérgicos dessa área foram lesados bilateralmente com a neurotoxina 6-hidroxidopamina (6-

OHDA) a resposta pressora quimiorreflexa foi praticamente abolida, ao passo que a resposta bradicárdica permaneceu inalterada. Dessa forma, esses resultados em conjunto sugerem que os neurônios noradrenérgicos da área A5 desempenham papel essencial na resposta simpatoexcitatória do quimiorreflexo.

Com relação à neurotransmissão das sinapses envolvidas na mediação das informações aferentes dos quimiorreceptores periféricos na área A5, ainda não está esclarecido qual ou quais seriam os neurotransmissores, bem como os subtipos de receptores que participam das mesmas. Vários estudos têm sido feitos com o objetivo de identificar os neurotransmissores e/ou neuromoduladores envolvidos no processamento sináptico das vias ativadas pelo quimiorreflexo. Sabe-se que o aminoácido L-glutamato é o principal neurotransmissor excitatório no cérebro e sua ação ocorre através da ligação com receptores metabotrópicos, ligados à proteína G, e/ou receptores ionotrópicos, ligados a canais iônicos (Stone & Burton, 1988; Collingridge & Lester, 1989).

Estudo anterior realizado em nosso laboratório por Santos (2007) mostrou que a inibição dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos, com ácido kinurênico, ou metabotrópicos, com MCPG ( $\alpha$ -metil-4-carboxifenilglicina) da área A5, não promoveu alterações das respostas pressora e bradicárdica do quimiorreflexo, sugerindo que a neurotransmissão do quimiorreflexo na área A5 não ocorre através de sinapses glutamatérgicas. Nesse mesmo trabalho também foi observado que a desinibição dos neurônios da área A5 com o antagonista GabaA, bicuculina, também não modificou as respostas cardiovasculares do quimiorreflexo.

Yao e cols. (2000) identificaram através de imunohistoquímica a presença de receptores purinérgicos do tipo P2X nos neurônios noradrenérgicos da área A5. Os receptores P2X são receptores de membrana ligados a canais iônicos, ativados pela

molécula de ATP, conferindo assim a propriedade de neurotransmissor de ação rápida à molécula de ATP extracelular (Burnstock, 2007).

O conceito da neurotransmissão purinérgica, onde o ATP e a adenosina são as principais substâncias ativas, foi introduzido por Burnstock, em 1972. Os receptores purinérgicos foram divididos bioquímica e farmacologicamente por Burnstock (1972) em 2 classes: P1 e P2. De acordo com esta classificação os receptores P1 são exclusivos para a adenosina e são acoplados à proteína G. Além disso, eles são antagonizados por metilxantinas e seus derivados. Os receptores P2 são exclusivos para o ATP e são subdivididos em 2 tipos: P2X, que são dependentes de canais iônicos (ionotrópicos), e P2Y, que são acoplados à proteína G (metabotrópicos) (Burnstock, 2007). O ATP é o agonista natural para os receptores P2, porém a sua meia-vida é muito curta, ou seja, o ATP é muito instável e é rapidamente degradado na fenda sináptica por ecto-nucleotidases, sendo a adenosina o seu principal metabólito. Os receptores purinérgicos P2X são ativados por análogos ou agonistas mais estáveis do que o ATP, como o  $\alpha,\beta$ -metileno ATP e o BzATP [2,3-O-(4-benzoylbenzoyl)-ATP], enquanto os receptores P2Y tem como agonista o 2-metilthio-ATP (Burnstock, 2007; Jarvis e Khakh, 2009).

Os receptores P2X são encontrados em vários locais do SNC, dentre esses, áreas relacionadas com controle motor, processos sensoriais e áreas relacionadas com a regulação cardiovascular (Yao e cols., 2000; Burnstock, 2007). Alguns estudos indicam ainda que o ATP, via seus receptores P2, esteja envolvido no processamento das respostas autonômicas do quimiorreflexo. Estudos de Zhang e Nurse (2004) e Gourine e cols. (2005) demonstraram que o ATP participa da transdução da quimiorrecepção central na RVLM. No NTS também foi demonstrado que o antagonismo dos receptores P2 bloqueou a resposta bradicárdica do

quimiorreflexo, sem alterar a resposta simpatoexcitatória (Paton e cols., 2002). De forma interessante, estudos de Braga e cols. (2007), em ratos não-anestesiados, mostraram que o bloqueio isolado dos receptores purinérgicos ou glutamatérgicos do NTS não foi capaz de reduzir a resposta simpatoexcitatória do quimiorreflexo, no entanto, quando o bloqueio simultâneo desses receptores foi realizado houve redução da resposta pressora do quimiorreflexo. Já a resposta bradicárdica foi vista ser mediada por receptores de aminoácidos excitatórios do subtipo N-metil-D-aspartato (NMDA) no NTS (Haibara e cols., 1999; Machado e Bonagamba, 2005; Braga e Machado, 2006). 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.

Estudos presentes na literatura já demonstraram 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). De acordo com os estudos de Gu e Macdeermott (1997), os receptores P2X localizados pré-sinápticamente em terminais de neurônios excitatórios podem facilitar a liberação do L-glutamato, sendo o ATP, neste caso, um neuromodulador da liberação do L-glutamato.

Desta forma, considerando a existência de receptores glutamatérgicos e purinérgicos P2X na área A5, e ainda que o bloqueio isolado dos receptores glutamatérgicos nesta região não modificou as respostas cardiovasculares do quimiorreflexo, é possível sugerir que o ATP também possa atuar como neuromodulador da liberação de L-glutamato na informação aferente dos quimiorreceptores na área A5.

Sendo assim, neste estudo foi avaliado o papel dos receptores purinérgicos da área A5 na integração das respostas cardiovasculares do quimiorreflexo, bem como a possível interação entre o ATP e o glutamato em mediar essas respostas.

O conhecimento detalhado dos mecanismos de ativação simpática durante episódios de hipóxia é de fundamental importância para melhor compreensão de doenças como a apneia obstrutiva do sono, que é um problema de saúde que afeta aproximadamente 5% da população mundial e pode causar patologias cardiovasculares como a hipertensão (Prabhakar e cols., 2015).

## **2. OBJETIVOS**

O objetivo principal desse estudo foi avaliar o papel dos receptores purinérgicos P2 da área A5 no controle da pressão arterial e da frequência cardíaca, bem como nas respostas cardiovasculares induzidas pela ativação do quimiorreflexo em ratos não-anestesiados. Também avaliamos a possibilidade da neuromodulação purinérgica sobre os receptores glutamatérgicos na integração do quimiorreflexo na área A5. Para isso foram utilizadas as seguintes estratégias experimentais:

- Avaliar os efeitos na pressão arterial e na frequência cardíaca induzidos pela microinjeção unilateral do agonista dos receptores purinérgicos P2  $\alpha,\beta$ -metileno ATP na área A5 em ratos não-anestesiados;
- Avaliar o efeito do bloqueio bilateral dos receptores purinérgicos P2 da área A5 sobre as respostas cardiovasculares induzidas pela estimulação do quimiorreflexo em ratos não-anestesiados;
- Avaliar o efeito do duplo bloqueio bilateral dos receptores glutamatérgicos e purinérgicos P2 da área A5 sobre as respostas cardiovasculares induzidas pela estimulação do quimiorreflexo em ratos não-anestesiados.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**



### **3.1. Modelo animal**

Foram utilizados ratos Wistar com peso entre 270 - 310g, provenientes do Centro de Bioterismo (CEBIO) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (ICB-UFMG). Os animais foram mantidos em ambiente adequado com temperatura e luminosidade controladas, alimentados com ração e água à vontade. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com os princípios éticos adotados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG) sob protocolo nº 277/2013.

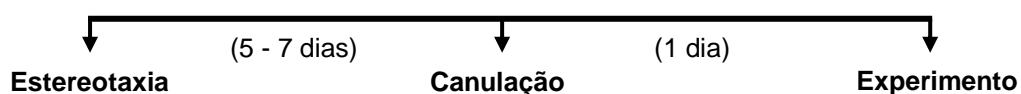
#### **3.1. Implante de cânulas-guia na área A5**

As cânulas-guia foram confeccionadas utilizando-se agulhas hipodérmicas de aço inoxidável (25x7mm) ajustadas até o comprimento de 15mm por eletrocorrosão. Através de um aparelho estereotáxico digital para animais de pequeno porte, essas cânulas foram implantadas uni ou bilateralmente em direção à área A5 de acordo com o protocolo experimental. Para isso os animais foram previamente anestesiados com uma solução preparada a partir da combinação de 7,5ml de xilazina 2% adicionados a 10,0ml de ketamina 10%, administrada no volume de 0,1ml/100g de peso corporal do animal (i.p.). Em seguida os animais foram submetidos à tricotomia da região dorsal da cabeça e posicionados no aparelho estereotáxico. Através de duas barras auriculares a cabeça do animal foi colocada em posição fixa. Após a assepsia da pele com solução de álcool iodado foi injetado subcutaneamente na região do escalpo a ser aberta o anestésico local xilocaína contendo vasoconstritor (cloridrato de lidocaína 2% + epinefina 1:200000), que foi utilizado para evitar sangramento excessivo na região a ser aberta e assim facilitar a localização do bregma. A seguir foi realizada uma incisão longitudinal na pele e tecido subcutâneo

expondo a calota craniana. Com o auxílio de uma broca odontológica foram feitos dois orifícios na calota craniana onde se fixaram parafusos de aço inox, que serviram de suporte para o capacete de acrílico. A torre do aparelho estereotáxico, onde as cânulas-guia foram posicionadas em suporte adequado, foi colocada em posição vertical e angulação zero. A partir do bregma foram realizadas as leituras das coordenadas Ântero-posterior (AP), Latero-lateral (LL) e Dorso-ventral (DV). O ponto de introdução das cânulas-guia em direção à área A5 foi determinado a partir das coordenadas estereotáxicas obtidas com o atlas de Paxinos e Watson (2007), sendo AP= -9,3mm, LL= -2,2mm e DV= -6,5mm. Determinado o ponto de introdução das cânulas-guia, foram feitos dois orifícios na calota craniana por onde as mesmas foram introduzidas bilateralmente em direção à área A5, sendo que a extremidade inferior destas ficou 3,6mm acima da área A5. As cânulas-guia foram então fixadas ao crânio do animal através de resina acrílica auto-polimerizante de uso odontológico. Anestesia adicional foi providenciada sempre que necessário. Após a completa fixação das cânulas, a torre do estereotáxico foi removida e, para evitar obstrução das cânulas-guias, foi introduzido nas mesmas um mandril (oclusor de 15mm de comprimento) também de aço inoxidável, o qual foi mantido dentro das cânulas até a realização dos experimentos. Após a cirurgia estereotáxica todos os animais receberam 0,2ml de pentabiótico veterinário (48.000U – Pentabiótico Veterinário Pequeno Porte) por via intramuscular e 0,1ml de analgésico (Banamine injetável; 1,1 mg/Kg de peso corporal) por via subcutânea como medida profilática. Feito isso, os animais foram mantidos em caixas coletivas, em salas com temperatura e luminosidade controladas, com água e ração à vontade, por um período de recuperação 5 a 7 dias.

### **3.2. Canulação da artéria e veia femoral**

As cânulas foram confeccionadas a partir de um tubo de polietileno PE-10 (4cm para a artéria e 2cm para a veia) fixado a um tubo de polietileno PE-50 de 15cm. Antes de serem implantadas, as cânulas foram preenchidas com solução salina (0,9%) e obstruídas na extremidade livre do PE-50 com pinos de metal. Passado o período de recuperação da cirurgia estereotáxica previamente realizada (5 a 7 dias), os animais foram novamente anestesiados com solução de ketamina e xilazina para o implante de cânulas na artéria e veia femoral. Foi realizada tricotomia da região inguinal e da região interescapular do animal, seguida de assepsia destes locais com álcool iodado. Através de uma pequena incisão na região inguinal, o trígono femoral foi exposto, os vasos femorais identificados e separados do nervo femoral. A cânula arterial foi inserida na artéria femoral até a aorta abdominal e a cânula venosa inserida na veia femoral. Em seguida, as cânulas foram conduzidas subcutaneamente com o auxílio de um trocater e exteriorizadas na região interescapular - essa disposição permitiu o registro e a administração de drogas com livre movimentação do animal. Terminado o procedimento, os locais de incisão foram suturados e os animais mantidos em caixas individuais por um período de 24h até a realização dos experimentos. A cânula arterial foi utilizada para registro direto da pressão arterial e da frequência cardíaca e a cânula venosa para administração sistêmica de drogas.



### **3.3. Registro da pressão arterial e da frequência cardíaca**

Os registros da pressão arterial e da frequência cardíaca foram realizados no dia seguinte ao da canulação, em animais não-anestesiados e com livre movimentação. 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 MP 150). Foi utilizado o programa de computador Acqknowledge (Biopac Systems, Inc.), após prévia calibração do equipamento, para o registro da pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC). A PAM e a FC foram calculadas pelo programa de computador a partir dos valores de PAP.

### **3.4. Estimulação dos quimiorreceptores periféricos**

Para a estimulação dos quimiorreceptores periféricos foi utilizada uma solução de KCN (40µg/0,1ml/injeção), a qual foi administrada através da cânula previamente implantada na veia femoral acoplada a uma cânula extensora constituída de um tubo de polietileno (P-50) com volume interno de aproximadamente 0,2ml. O uso desta cânula extensora visou proporcionar ao animal o mínimo de estresse possível, visto que a mesma possibilitou administrar a droga sem que fosse necessário um contato muito próximo com o animal. O KCN é descrito na literatura como um potente estímulo para os quimiorreceptores periféricos, interferindo na utilização tecidual de oxigênio através da inibição da enzima citocromo-oxidase, envolvida na cadeia respiratória (Biscoe e Duchon, 1990; Franchini e Krieger, 1993). Como consequência, ocorre um déficit energético celular associado à indisponibilidade de O<sub>2</sub>, promovendo uma hipóxia citotóxica, o que leva à estimulação das células quimiossensíveis do corpúsculo carotídeo. Barros e cols.

(2002) demonstraram que as respostas cardiovasculares produzidas pela injeção intravenosa de KCN na dose utilizada neste estudo (40µg/0,1ml) foram abolidas após a ligadura bilateral da artéria do corpúsculo carotídeo, indicando que o KCN é um estímulo adequado para a ativação do quimiorreflexo periférico.

### **3.5. Técnica para microinjeção de drogas na área A5**

As drogas utilizadas foram dissolvidas em salina fisiológica estéril (NaCl 0,9%) e manualmente injetadas na área A5 utilizando-se uma seringa de 1µL Hamilton (Hamilton, Reno, NV) conectada por meio de um tubo de polietileno PE-10 à uma agulha injetora. A fim de que as microinjeções atingissem diretamente a área A5 o comprimento da agulha injetora foi 3,6 mm mais longo que a cânula-guia, ou seja, o tamanho da agulha injetora foi de 18,6mm. O volume microinjetado na área A5 foi de 100nl e as injeções foram uni- ou bilaterais, de acordo com o protocolo experimental. As injeções bilaterais foram realizadas de modo sequenciado, ou seja, injeção de um lado da área A5 seguida da injeção do lado contralateral.

### **3.6. Drogas utilizadas**

- Solução fisiológica estéril (NaCl 154 mM) - 0,9% (veículo);
- Cianeto de potássio (KCN) - 40µg/0,1ml i.v. (inibidor da citocromo oxidase);
- $\alpha,\beta$ -metileno ATP ( $\alpha,\beta$ -meATP) - 0,625 e 1,25 nmol/100nl (agonista seletivo de receptores purinérgicos P2);
- Pyridoxal-phosphate-6-azophenyl-2',4'-disulfonate (PPADS) - 0,5nmol/100nl (antagonista de receptores purinérgicos P2);

- Ácido Kinurênico (KIN) - 4nmol/100nl (antagonista não-seletivo de receptores glutamatérgicos).

As doses utilizadas de  $\alpha,\beta$ -metileno ATP, PPADS e KIN foram baseadas em estudos anteriores presentes na literatura (de Paula e cols., 2004; Braga e cols., 2007).

### **3.7. Histologia**

Ao final dos experimentos os animais foram profundamente anestesiados com Tiopental (120mg/kg i.v.) e, posteriormente, foi microinjetado bilateralmente 100nl do corante Alcian Blue na área A5 para subsequente confirmação dos sítios das microinjeções. Em seguida, os animais foram submetidos à abertura da região torácica para a exposição do coração, o qual foi perfundido com solução fisiológica (NaCl 0,9%), seguido de solução de formaldeído (10%) injetados a partir do ventrículo esquerdo. Para facilitar a perfusão cerebral, a aorta descendente dos animais foi bloqueada com o auxílio de uma pinça hemostática. Os cérebros foram removidos e armazenados em formaldeído 10% por no mínimo 24 horas. Posteriormente, os cérebros foram transferidos para uma solução de sacarose 20% por 24 horas. Após esse período, foram feitos cortes transversais de 60 $\mu$ m da região da área A5 em criostato. Os cortes foram colocados em lâminas previamente gelatinizadas e corados com vermelho neutro 1% através da técnica de Nissl. Os mesmos foram analisados por microscopia óptica para confirmação histológica. Os sítios de microinjeção foram confirmados utilizando como referência o Atlas de Paxinos e Watson (2007). Somente os ratos nos quais o local da injeção estava situado corretamente na área A5 foram utilizados para a análise estatística dos dados.

### **3.8. *Análise estatística***

Os resultados apresentados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Para análise estatística, os parâmetros cardiovasculares basais (PAM e FC) foram analisados imediatamente antes da ativação do quimiorreflexo ou das microinjeções na área A5 e comparados com os respectivos tempos e grupos controles determinados em cada protocolo experimental. Para a análise estatística dos resultados dentro de cada grupo experimental foi utilizado o teste *t* de Student pareado. Para comparação entre grupos foi utilizada a análise de variância para medidas repetidas (ANOVA One-way), seguido pelo pós-teste de Dunnett ou Bonferroni. O nível de significância foi fixado em  $P < 0,05$ .

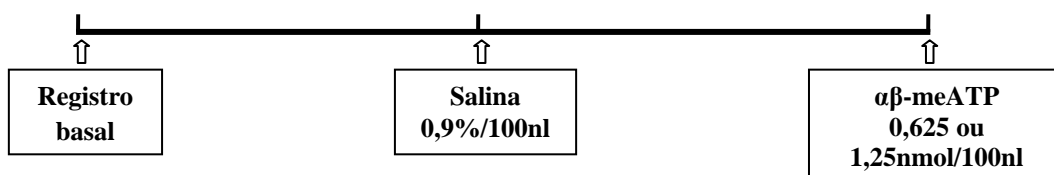
### **3.9. *Protocolos experimentais***

#### **3.9.1. *Alterações na pressão arterial e na frequência cardíaca induzidas pela microinjeção unilateral do agonista dos receptores purinérgicos P2, $\alpha,\beta$ -metileno ATP, na área A5 de ratos não-anestesiados.***

Com o objetivo de avaliar as alterações na pressão arterial e na frequência cardíaca induzidas pela microinjeção do agonista dos receptores purinérgicos P2,  $\alpha,\beta$ -metileno ATP, na área A5, foi realizado um protocolo no qual o  $\alpha,\beta$ -metileno ATP foi microinjetado unilateralmente na área A5 e as alterações cardiovasculares foram registradas. Para isso, foram utilizados animais previamente submetidos ao implante bilateral de cânulas-guia em direção à área A5 e implante de cânula na artéria femoral. Por se tratar de ser uma área relativamente pequena e bilateral, a porcentagem de acerto das microinjeções na área A5 são baixas, por isso as

cânulas-guia foram implantadas bilateralmente para aumentar a possibilidade de que, em pelo menos um dos lados, a cânula-guia estivesse corretamente posicionada em direção à área A5. Dessa forma, somente o lado responsivo à microinjeção foi utilizado nas microinjeções seguintes.

No dia do experimento, após um período de adaptação do animal frente às novas condições ambientais, o veículo salina (NaCl 0,9%/100nl) ou o agonista dos receptores purinérgicos P2,  $\alpha,\beta$ -metileno ATP (0,625 ou 1,25 nmol/100nl), foram microinjetados na área A5 (conforme representado no esquema abaixo), com intervalo entre cada microinjeção de, no mínimo, 10 minutos. A magnitude das respostas cardiovasculares decorrentes da microinjeção unilateral do agonista P2 foi comparada com as respostas controle por meio de testes estatísticos previamente descritos. Neste protocolo é importante ressaltar que cada rato recebeu apenas uma dose de  $\alpha,\beta$ -metileno ATP, formando, portanto, dois grupos distintos.



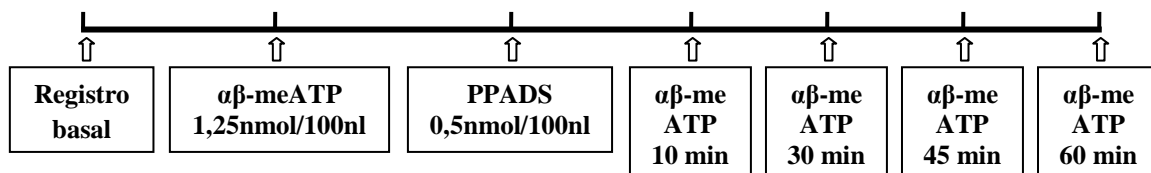
### **3.9.2. Alterações na pressão arterial e na frequência cardíaca induzidas pela microinjeção unilateral de $\alpha,\beta$ -metileno ATP na área A5 de ratos não-anestesiados antes e após a microinjeção unilateral de PPADS.**

Para avaliar se as respostas cardiovasculares induzidas pelo agonista  $\alpha,\beta$ -metileno ATP são dependentes da ativação de receptores purinérgicos P2, o agonista  $\alpha,\beta$ -metileno ATP foi microinjetado antes e após a microinjeção do antagonista PPADS na área A5. Foram utilizados animais previamente submetidos ao implante bilateral de cânula-guia em direção à área A5 e implante de cânula na



artéria femoral. Da mesma forma que no protocolo anterior, as cânulas-guia foram implantadas bilateralmente para aumentar a possibilidade de que, em pelo menos um lado, ela estivesse corretamente posicionada em direção à área A5. Somente o lado responsivo à microinjeção de  $\alpha,\beta$ -metileno ATP foi utilizado nas microinjeções seguintes.

No dia do experimento, após um período de adaptação do animal frente às novas condições ambientais, o  $\alpha,\beta$ -metileno ATP (a dose foi definida em função do protocolo anterior) foi microinjetado na área A5. Após o retorno da pressão arterial média e frequência cardíaca aos valores basais, o antagonista dos receptores purinérgicos P2, PPADS (0,5nmol/100nl), foi microinjetado ipsilateralmente na área A5. Dez, trinta, quarenta e cinco e sessenta minutos após a microinjeção do antagonista, o  $\alpha,\beta$ -metileno ATP foi novamente microinjetado e essas respostas comparadas com as respostas cardiovasculares observadas antes da microinjeção do PPADS. O esquema a seguir resume os procedimentos descritos acima.

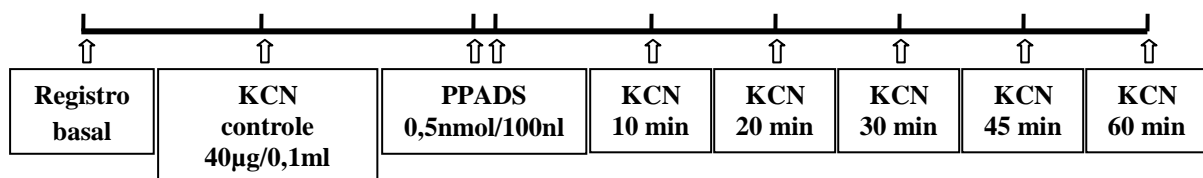


### **3.9.3. Respostas cardiovasculares à ativação do quimiorreflexo em ratos não-anestesiados antes e após o bloqueio bilateral dos receptores purinérgicos P2 da área A5 com o antagonista PPADS.**

Com o objetivo de avaliar a participação dos receptores purinérgicos do tipo P2 da área A5 na integração das respostas cardiovasculares induzidas pela estimulação dos quimiorreceptores periféricos, o antagonista PPADS foi microinjetado bilateralmente na área A5 e o quimiorreflexo estimulado antes e após

esta microinjeção. Para isso, foram utilizados animais previamente submetidos ao implante bilateral de cânulas-guia em direção à área A5 e implante de cânulas na artéria e veia femoral.

No dia do experimento, após um período de adaptação do animal frente às novas condições ambientais, o quimiorreflexo foi testado através da injeção de KCN (40µg/0,1ml i.v.). Após o retorno da pressão arterial e frequência cardíaca aos valores basais, o antagonista dos receptores purinérgicos P2, PPADS (0,5nmol/100 nl), foi microinjetado bilateralmente na área A5. Dez, vinte, trinta, quarenta e cinquenta e sessenta minutos após a microinjeção do antagonista, o quimiorreflexo foi novamente testado com KCN e essas respostas foram comparadas com as respostas cardiovasculares obtidas antes da microinjeção do PPADS. O esquema a seguir resume o procedimento descrito acima.

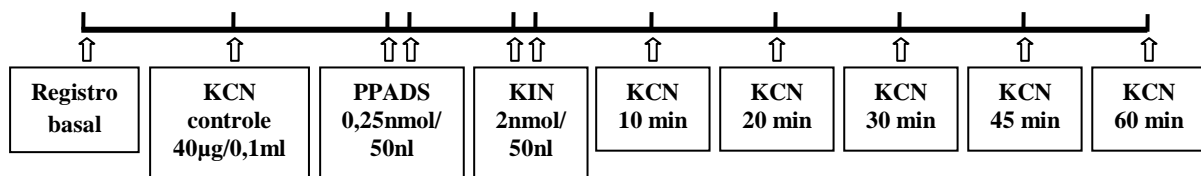


#### **3.9.4. Respostas cardiovasculares à ativação do quimiorreflexo em ratos não-anestesiados antes e após o bloqueio bilateral simultâneo dos receptores purinérgicos P2 e dos receptores glutamatérgicos da área A5.**

Com o objetivo de avaliar a participação tanto dos receptores purinérgicos quanto dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos da área A5 na integração das respostas cardiovasculares induzidas pelo quimiorreflexo, os antagonistas PPADS (0,25nmol/50nl) e ácido kinurênico (KIN; 2,0nmol/50nl) foram microinjetados bilateralmente nessa região e o quimiorreflexo estimulado antes e após esta

microinjeção. Para isso, foram utilizados animais previamente submetidos ao implante bilateral de cânulas-guia em direção à área A5 e implante de cânulas na artéria e veia femoral.

No dia do experimento, após um período de adaptação do animal frente às novas condições ambientais, o quimiorreflexo foi testado através de injeção intravenosa de KCN (40 $\mu$ g/0,1ml). Após o retorno da pressão arterial e da frequência cardíaca aos valores basais, o antagonista dos receptores purinérgicos P2, PPADS, foi microinjetado bilateralmente na área A5 e, após aproximadamente um minuto, o antagonista glutamatérgico, KIN, também foi microinjetado bilateralmente na área A5. Dez, vinte, trinta, quarenta e cinco e sessenta minutos após as microinjeções na área A5, o quimiorreflexo foi novamente estimulado com KCN (conforme esquematizado abaixo) e essas respostas foram comparadas com a primeira. A ordem da microinjeção do PPADS e do KIN variou entre os animais e, como não foi observada diferença significativa nos valores de  $\Delta$ PAM e  $\Delta$ FC obtidos quando o quimiorreflexo foi estimulado em relação à ordem das microinjeções, os resultados foram apresentados agrupados.



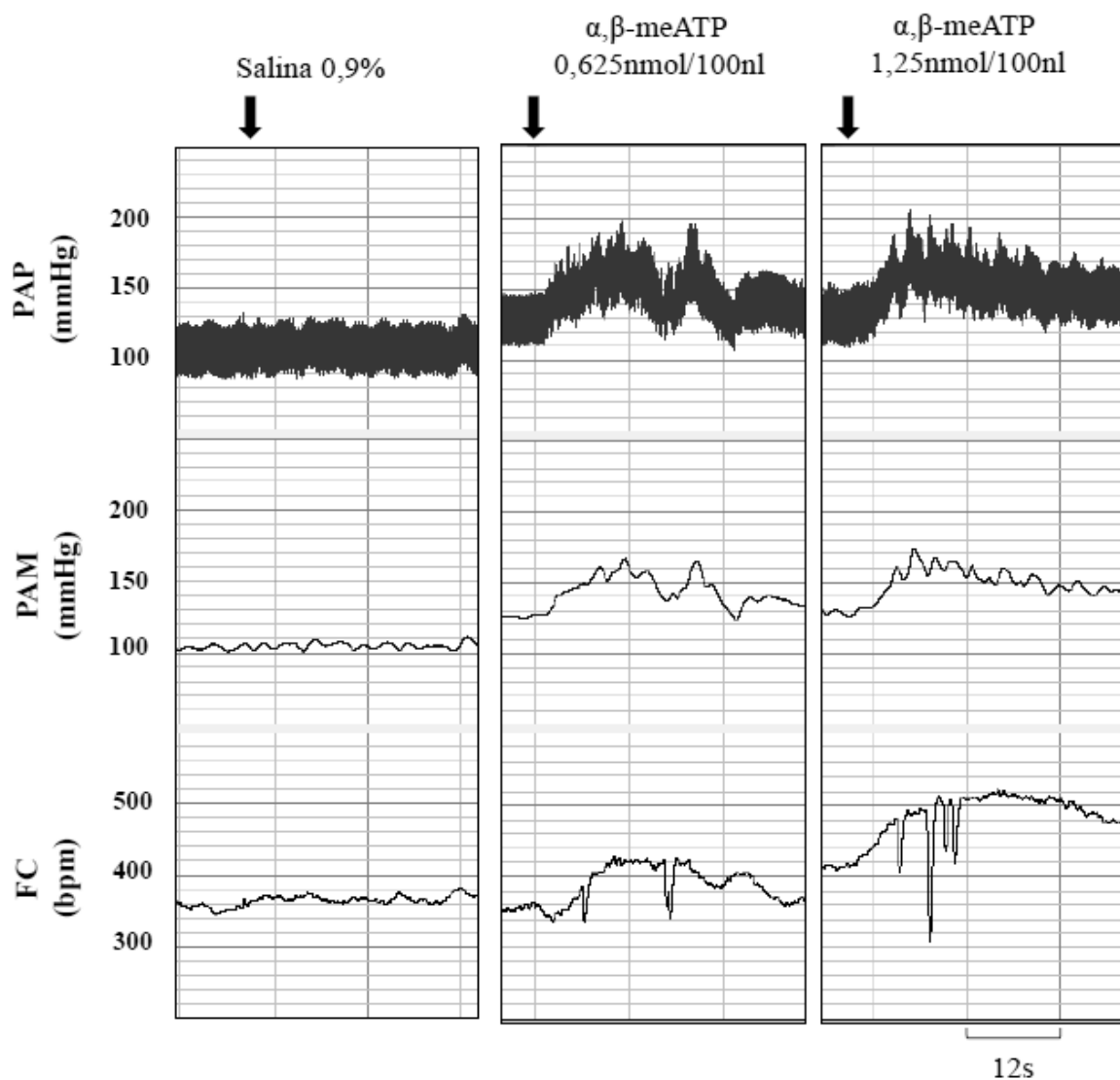
## **4. RESULTADOS**

#### **4.1. Efeitos cardiovasculares induzidos pela microinjeção unilateral do agonista purinérgico ionotrópico $\alpha,\beta$ -metileno ATP na área A5 em ratos não-anestesiados.**

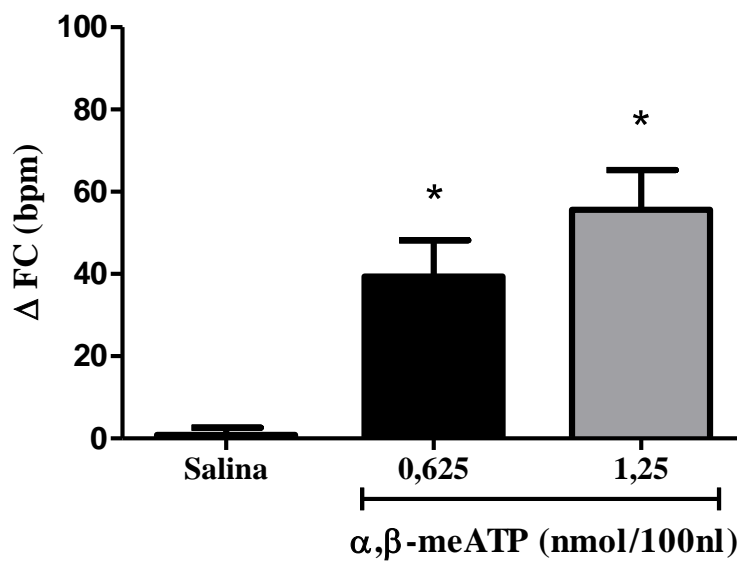
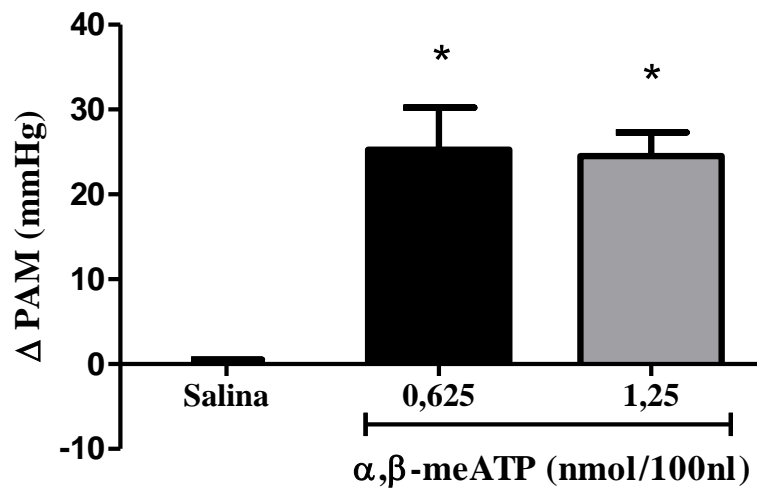
Com o objetivo de avaliar se os receptores purinérgicos da área A5 teriam papel relevante no controle cardiovascular, as respostas cardiovasculares induzidas pela ativação dos receptores purinérgicos ionotrópicos da área A5, através da microinjeção unilateral do agonista  $\alpha,\beta$ -metileno ATP nessa região, foram observadas.

A Figura 1 corresponde a traçados representativos de dois animais dos grupos estudados mostrando as alterações da pressão arterial pulsátil (PAP, mmHg), pressão arterial média (PAM, mmHg) e da frequência cardíaca (FC, bpm) em resposta à microinjeção unilateral de salina (0,9%/100nl) ou  $\alpha,\beta$ -metileno ATP (0,625 e 1,25 nmol/100nl). Podemos observar que o  $\alpha,\beta$ -metileno ATP microinjetado na área A5 promove aumento da pressão arterial e da frequência cardíaca.

Os valores médios das alterações da PAM e FC induzidas pela microinjeção unilateral de salina 0,9%/100nl e de  $\alpha,\beta$ -metileno ATP nas doses de 0,625 e 1,25 nmol/100nl são mostrados na Figura 2. A microinjeção do  $\alpha,\beta$ -metileno ATP nas doses de 0,625 e 1,25 nmol/100nl promoveu alterações significativas sobre a pressão arterial (+0,0 $\pm$ 0,5 vs. +25 $\pm$ 5 e +25 $\pm$ 3 mmHg) e frequência cardíaca (+0,9 $\pm$ 2 vs. +39 $\pm$ 9 e +56 $\pm$ 10 bpm) quando comparadas às alterações observadas pela microinjeção do veículo salina [(n=8) Tabela I]. No entanto, esses efeitos não foram dose-dependentes, uma vez que não houve diferença significativa entre as respostas pressora ou taquicárdica nas duas doses utilizadas.



**Figura 1.** Traçados representativos dos grupos estudados ilustrando as alterações na pressão arterial pulsátil (PAP, mmHg), pressão arterial média (PAM, mmHg) e frequência cardíaca (FC, bpm) em resposta à microinjeção unilateral do veículo salina (NaCl 0,9%/100nl) e do agonista P2  $\alpha,\beta$ -metileno ATP (0,625 e 1,25 nmol/100nl) na área A5 de ratos não-anestesiados.



**Figura 2.** Alterações na pressão arterial média ( $\Delta$ PAM, mmHg) e frequência cardíaca ( $\Delta$ FC, bpm) induzidas pela microinjeção unilateral de salina (n=8) ou  $\alpha,\beta$ -metileno ATP [(0,625 e 1,25 nmol/100nl) n=8] na área A5 de ratos não-anestesiados. (\*) Diferença significativa em relação ao grupo salina ( $p < 0,05$ ; One-way ANOVA seguido de pós-teste de Bonferroni).

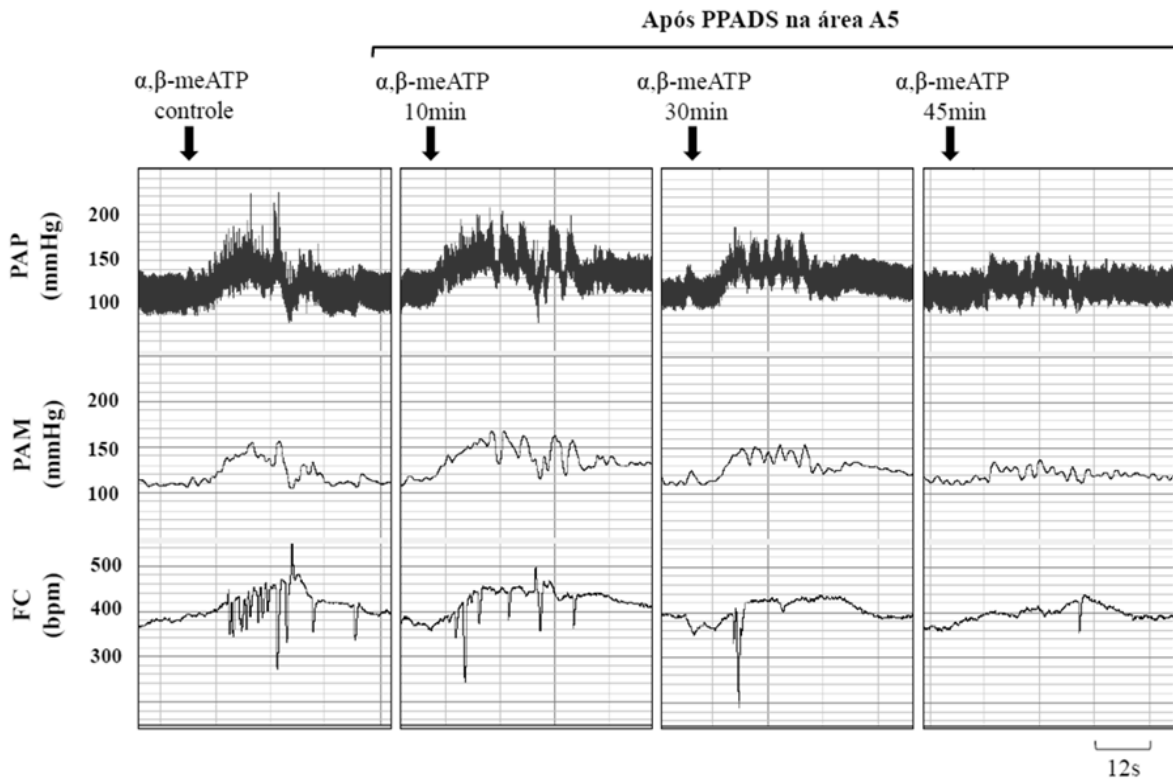
#### **4.2. Efeito da microinjeção de PPADS na área A5 sobre as respostas cardiovasculares induzidas pela microinjeção de $\alpha,\beta$ -metileno ATP nessa mesma região em ratos não-anestesiados.**

Com o objetivo de avaliar se as respostas cardiovasculares induzidas pela microinjeção do agonista  $\alpha,\beta$ -metileno ATP são decorrentes da sua interação com receptores purinérgicos P2, o antagonista dos receptores purinérgicos P2 (PPADS) foi microinjetado na área A5 e as respostas induzidas pelo  $\alpha,\beta$ -metileno ATP foram comparadas. A Figura 3 é um traçado representativo de um animal do grupo estudado mostrando as alterações cardiovasculares induzidas pela microinjeção de  $\alpha,\beta$ -metileno ATP (1,25nmol/100nl) na área A5 de um rato não-anestesiado antes e após 10, 30 e 45 minutos do bloqueio ipsilateral dos receptores purinérgicos P2 com o antagonista PPADS (0,5nmol/100nl). Como demonstrado anteriormente, a microinjeção de  $\alpha,\beta$ -metileno ATP na área A5 de ratos não-anestesiados promoveu elevação da pressão arterial e da frequência cardíaca e essas respostas se mostraram atenuadas após o bloqueio dos receptores purinérgicos P2 da área A5 com o PPADS.

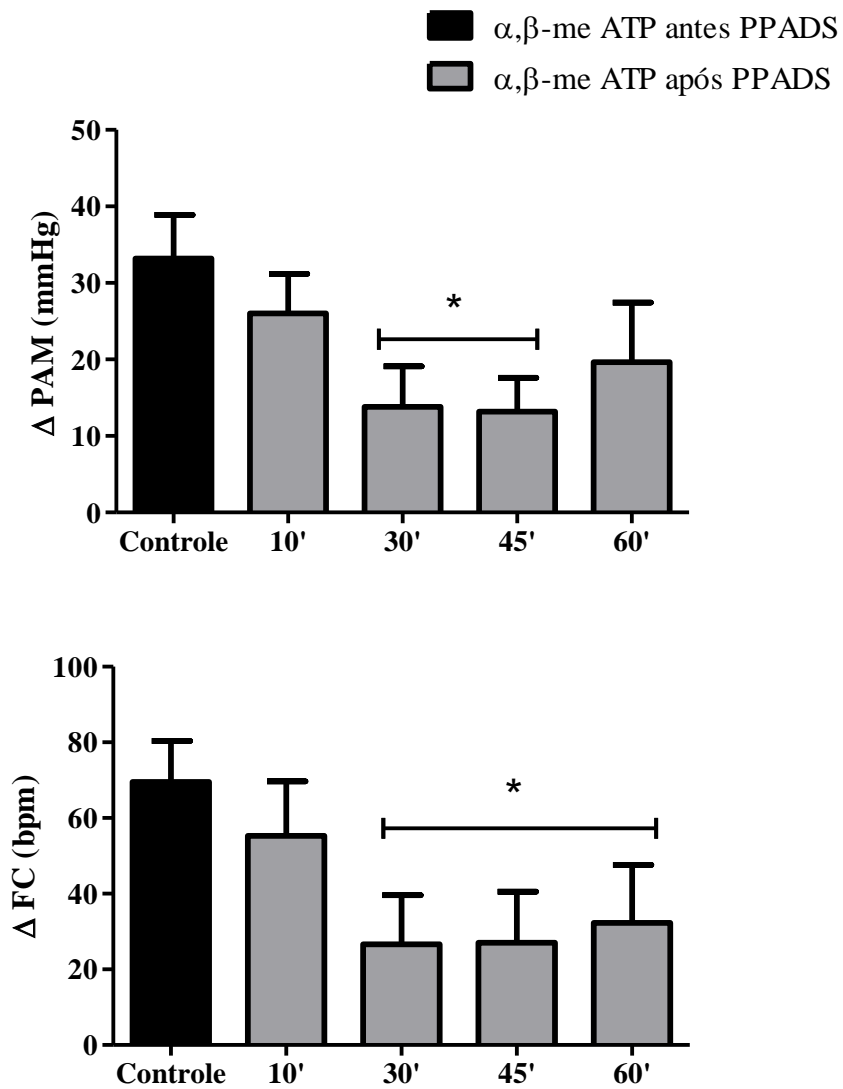
O conjunto desses resultados está representado na Figura 4, que mostra os valores médios das alterações da PAM e FC induzidas pela microinjeção de  $\alpha,\beta$ -metileno ATP antes e após 10, 30, 45 e 60 minutos da microinjeção ipsilateral do antagonista PPADS na área A5 de ratos não-anestesiados. Podemos observar que o PPADS reduziu significativamente a resposta pressora do  $\alpha,\beta$ -metileno ATP nos tempos de 30 e 45 minutos ( $+33\pm 6$  vs.  $+14\pm 5$ ;  $+13\pm 4$  mmHg) em relação ao período controle. A resposta taquicárdica do  $\alpha,\beta$ -metileno ATP também se mostrou reduzida



nos tempos de 30, 45 e 60 minutos ( $+70\pm 11$  vs.  $+27\pm 13$ ;  $+27\pm 14$ ;  $+32\pm 15$  bpm) em relação ao período controle [(n=6) Tabela II].



**Figura 3.** Traçado de um rato representativo do grupo estudado mostrando as alterações na pressão arterial pulsátil (PAP, mmHg), pressão arterial média (PAM, mmHg) e frequência cardíaca (FC, bpm) causadas pela microinjeção de  $\alpha,\beta$ -metileno ATP (1,25nmol/100nl) na área A5 de um rato não-anestesiado antes (controle) e após (10, 30 e 45 minutos) o bloqueio unilateral dos receptores purinérgicos P2 da área A5 com o antagonista PPADS (0,5nmol/100nl).



**Figura 4.** Alterações na pressão arterial média ( $\Delta$ PAM, mmHg) e frequência cardíaca ( $\Delta$ FC, bpm), produzidas pela microinjeção unilateral de  $\alpha,\beta$ -metileno ATP (1,25nmol/100nl) antes (controle) e após (10, 30, 45 e 60 minutos) a microinjeção unilateral de PPADS (0,5nmol/100nl) na área A5 de ratos não-anestesiados (n=6). (\*) Diferença significativa em relação ao grupo controle (p<0,05; One-way ANOVA seguido de pós-teste de Dunnett).

#### **4.3. Efeito da microinjeção bilateral de PPADS na área A5 sobre as respostas cardiovasculares induzidas pela estimulação do quimiorreflexo em ratos não-anestesiados.**

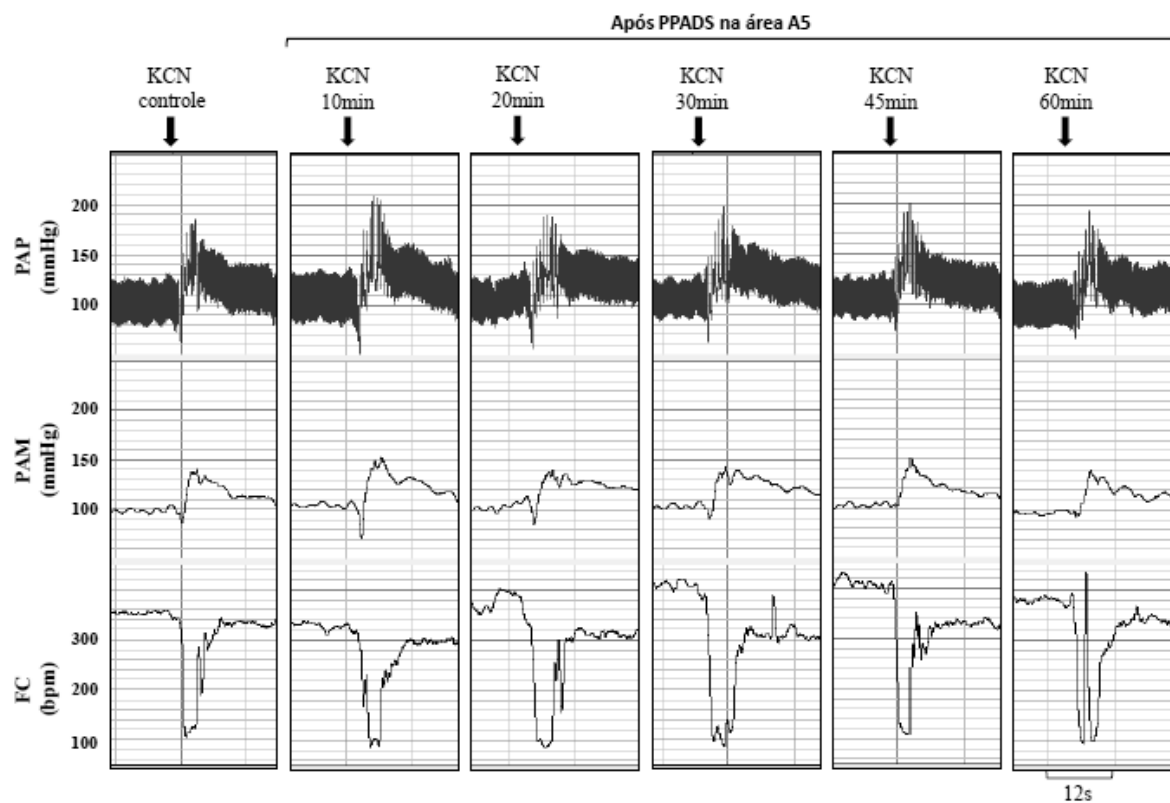
Com o objetivo de avaliar a participação dos receptores purinérgicos do tipo P2 da área A5 na integração das respostas cardiovasculares do quimiorreflexo, o antagonista purinérgico PPADS foi microinjetado bilateralmente nessa área e o quimiorreflexo testado antes e 10, 20, 30, 45 e 60 minutos após a microinjeção.

A Figura 5 corresponde a um traçado representativo de um animal do grupo estudado mostrando os efeitos cardiovasculares induzidos pela estimulação do quimiorreflexo, através da injeção intravenosa de KCN (40µg/0,1ml), antes e após a microinjeção bilateral de PPADS (0,5nmol/100nl) na área A5 de um rato não-anestesiado. Como esperado, podemos observar que a estimulação dos quimiorreceptores periféricos com KCN promoveu resposta pressora e bradicárdica, entretanto essas respostas não foram alteradas após a microinjeção do PPADS na área A5.

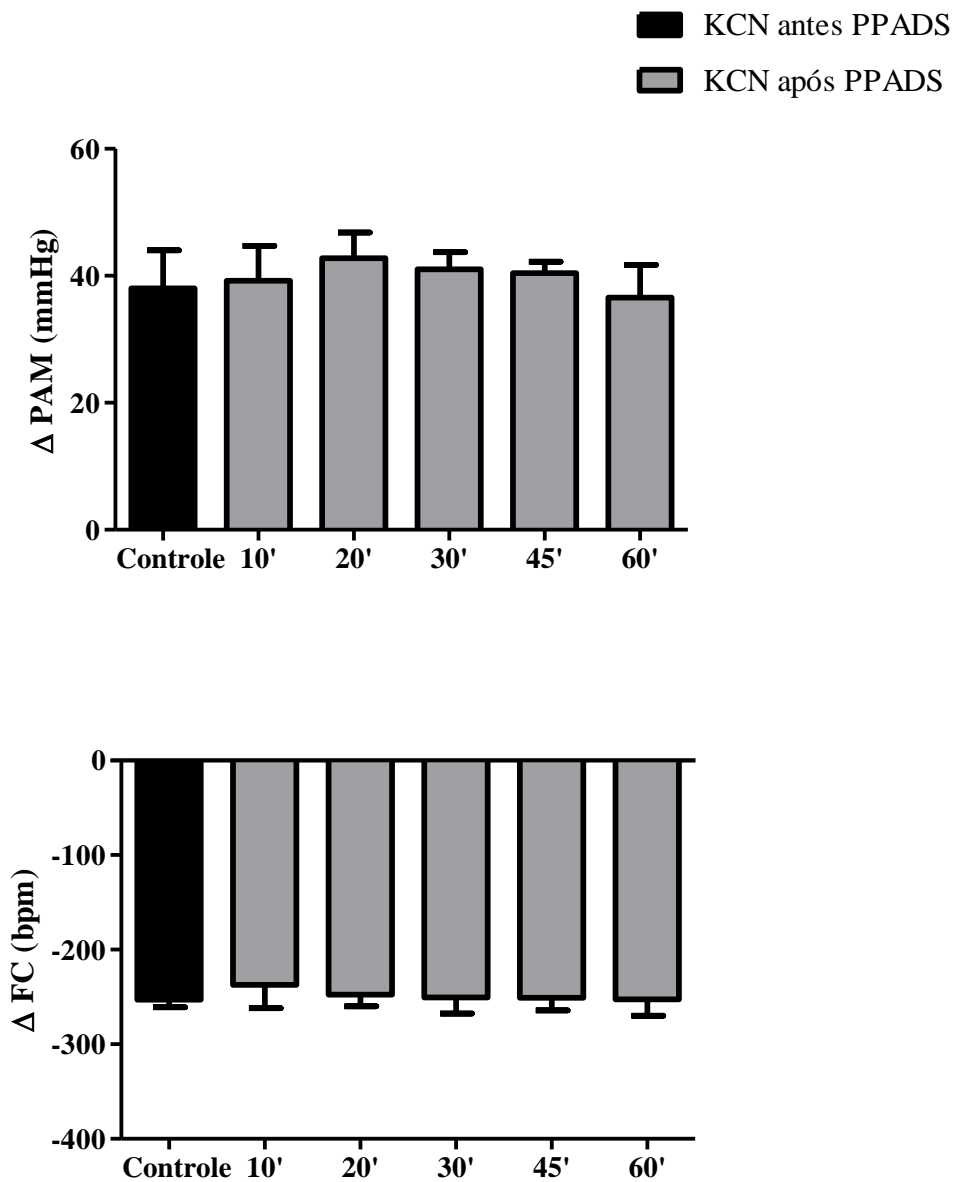
O conjunto dos dados obtidos nesse grupo experimental é representado na Figura 6, mostrando que a microinjeção bilateral de PPADS na área A5 não promoveu alterações significativas sobre as respostas pressora (+38±6 vs. +39±6; +43±4; +41±3; +40±2 e +37±5 mmHg) e bradicárdica (-253±8 vs. -237±25; -248±12; -250±17; -251±13 e -253±17 bpm) do quimiorreflexo nos intervalos de tempo analisados em relação à resposta controle [(n=5) Tabela III].

Em relação aos parâmetros cardiovasculares basais (Figura 7), a microinjeção bilateral de PPADS não alterou significativamente os valores de pressão arterial média (110±3 vs. 116±4 mmHg) e de frequência cardíaca (352±9 vs.

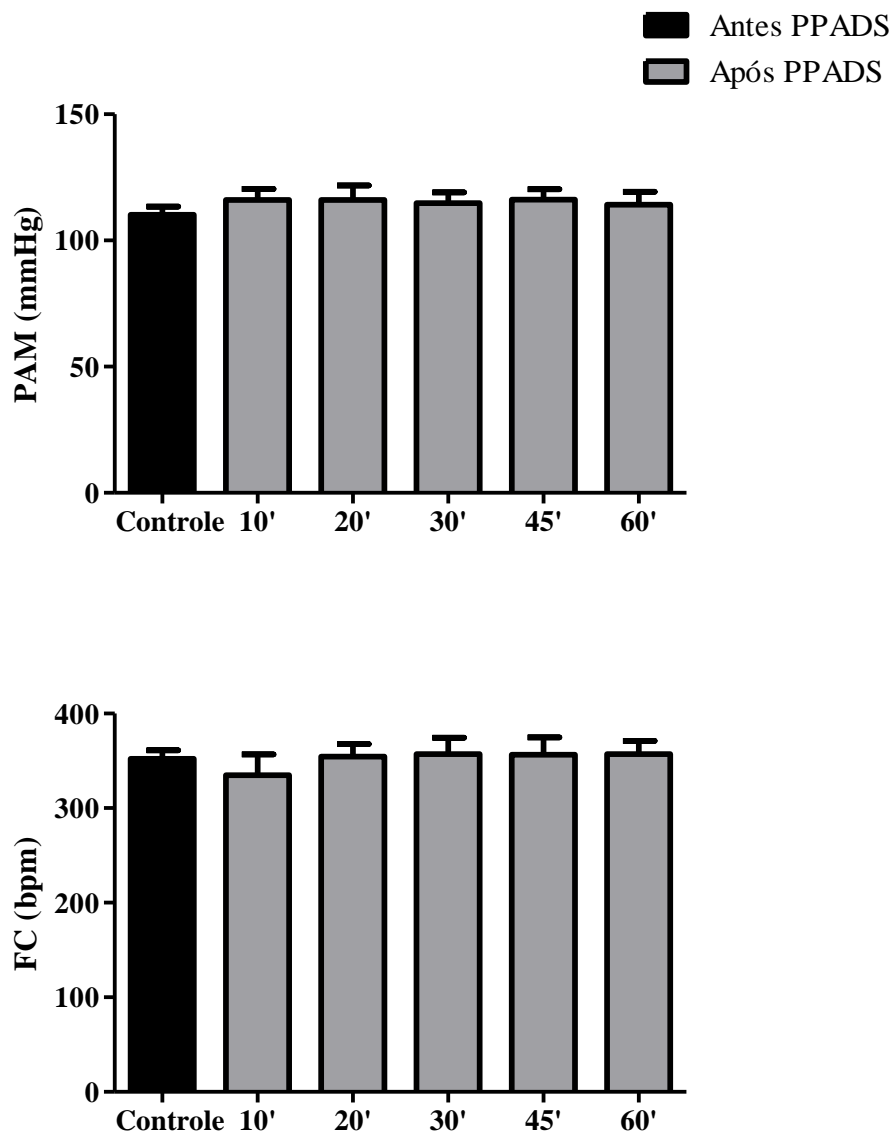
335±22 bpm), quando comparados com o período controle, ou seja, anterior à microinjeção do antagonista (Tabela IV).



**Figura 5.** Traçado de um rato, representativo do grupo estudado, mostrando as alterações na pressão arterial pulsátil (PAP, mmHg), pressão arterial média (PAM, mmHg) e frequência cardíaca (FC, bpm) em resposta à estimulação do quimiorreflexo com KCN ( $40\mu\text{g}/0,1\text{ml}$  i.v.), antes (controle) e após (10, 20, 30, 45 e 60 minutos) a microinjeção bilateral de PPADS ( $0,5\text{nmol}/100\text{nl}$ ) na área A5.



**Figura 6.** Alterações na pressão arterial média ( $\Delta$ PAM, mmHg) e frequência cardíaca ( $\Delta$ FC, bpm), produzidas pela injeção i.v. de KCN ( $40\mu\text{g}/0,1\text{ml}$ ) antes (controle) e após (10, 20, 30, 45 e 60 minutos) a microinjeção bilateral de PPADS ( $0,5\text{nmol}/100\text{nl}$ ) na área A5 de ratos não anestesiados ( $n=5$ ) (One-way ANOVA seguido de pós-teste de Dunnett).



**Figura 7.** Alterações nos parâmetros cardiovasculares basais de pressão arterial média (PAM, mmHg) e de frequência cardíaca (FC, bpm) antes e após a microinjeção bilateral de PPADS (0,5nmol/100nl) na área A5 de ratos não-anestesiados (n=5) (One-way ANOVA seguido de pós-teste de Dunnett).



#### **4.4. Efeito da microinjeção bilateral de PPADS e ácido kinurênico na área A5 sobre as respostas cardiovasculares induzidas pela estimulação do quimiorreflexo em ratos não-anestesiados.**

Com o objetivo de avaliar a participação conjunta dos receptores purinérgicos e dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos da área A5 na integração das respostas cardiovasculares produzidas pela estimulação do quimiorreflexo, o antagonista não seletivo de receptores de aminoácidos excitatórios, ácido kinurênico (KIN - 2,0nmol/50nl), e o antagonista de receptores purinérgicos P2, PPADS (0,25nmol/50nl) foram microinjetados bilateralmente nessa região, com intervalo entre as microinjeções de cerca de um minuto, e o quimiorreflexo estimulado (KCN 40µg/0,1ml) antes e após (10, 20, 30, 45 e 60 minutos) estas microinjeções.

A Figura 8 corresponde a um traçado representativo de um animal do grupo estudado mostrando as respostas cardiovasculares induzidas pela estimulação do quimiorreflexo antes e após as microinjeções bilaterais dos antagonistas PPADS e KIN na área A5 de um rato não-anestesiado.

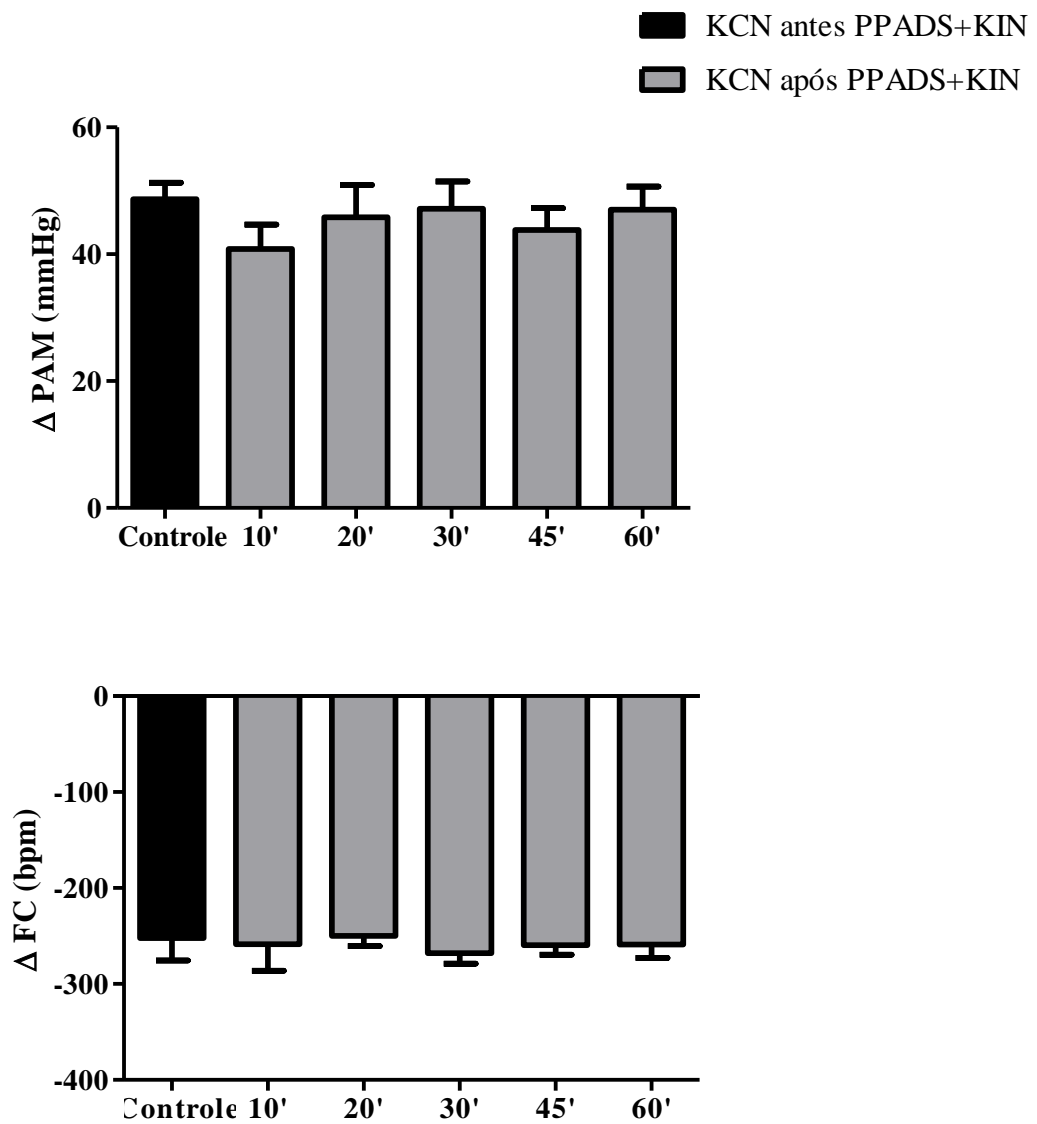
A Figura 9 representa os dados obtidos nesse grupo. Podemos observar que a estimulação dos quimiorreceptores periféricos com KCN promoveu resposta pressora e bradicárdica. Entretanto, a microinjeção bilateral de PPADS e KIN na área A5 não promoveu alterações significativas sobre a resposta pressora (+49±3 vs. +41±4; +46±5; +47±4; +44±3; +47±4 mmHg) e bradicárdica (-252±23 vs. -259±28; -250±11; -268±11; -260±10; -259±14 bpm) do quimiorreflexo em ratos não-anestesiados [(n=6) Tabela V].

Em relação aos parâmetros cardiovasculares basais (Figura 10), as microinjeções bilaterais de PPADS e KIN na área A5 alteraram significativamente o

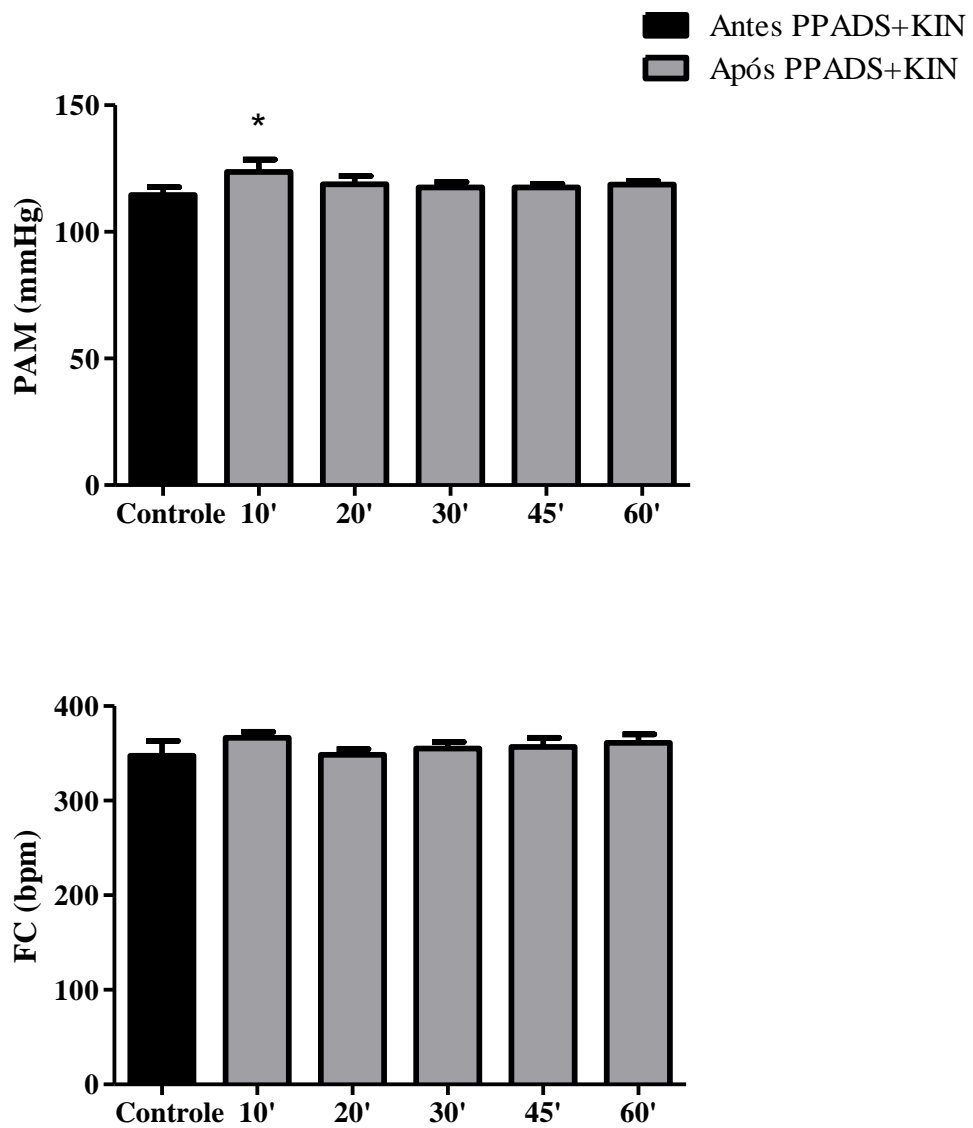
valor de pressão arterial média, quando comparado ao período controle, apenas no tempo de 10 minutos após a microinjeção dos antagonistas ( $115\pm 3$  vs.  $124\pm 5$  mmHg). Já os valores de frequência cardíaca não foram significativamente diferentes em nenhum dos tempos em relação ao controle [ $(348\pm 16$  vs.  $367\pm 6$  bpm) Tabela VI].



**Figura 8.** Traçado de um rato, representativo do grupo estudado, mostrando as alterações na pressão arterial pulsátil (PAP, mmHg), pressão arterial média (PAM, mmHg) e frequência cardíaca (FC, bpm) em resposta à estimulação do quimiorreflexo com KCN ( $40\mu\text{g}/0,1\text{ml}$  i.v.) antes (controle) e após (10, 20, 30, 45 e 60 minutos) a microinjeção bilateral de PPADS ( $0,25\text{nmol}/50\text{nl}$ ) e KIN ( $2,0\text{nmol}/50\text{nl}$ ) na área A5 de um rato não-anestesiado.



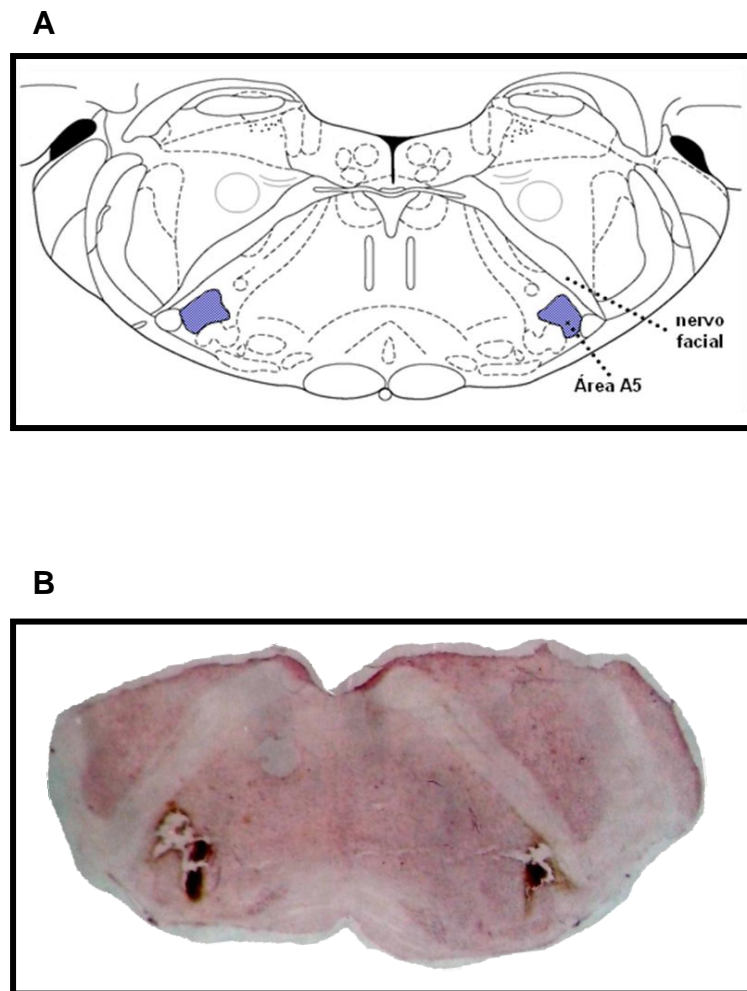
**Figura 9.** Alterações na pressão arterial média ( $\Delta$ PAM, mmHg) e frequência cardíaca ( $\Delta$ FC, bpm) produzidas pela injeção i.v. de KCN (40 $\mu$ g/0,1ml) antes (controle) e após (10, 20, 30, 45 e 60 minutos) a microinjeção bilateral de PPADS (0,25nmol/50nl) seguida da microinjeção de KIN (2,0nmol/50nl) na área A5 de ratos não-anestesiados (n=6) (One-way ANOVA seguido de pós-teste de Dunnett).



**Figura 10.** Alterações nos parâmetros cardiovasculares basais de pressão arterial média (PAM, mmHg) e de frequência cardíaca (FC, bpm) antes e após as microinjeções bilaterais de PPADS (0,25nmol/50nl) e KIN (2,0nmol/50nl) na área A5 de ratos não-anestesiados (n=6) (One-way ANOVA seguido de pós-teste de Dunnett).

#### **4.5. Análise histológica**

O painel A da Figura 11 corresponde à representação esquemática de um corte transversal do tronco cerebral de rato correspondente ao sítio de microinjeção na área A5. Nesta figura é possível observar que a área A5 localiza-se na região ventrolateral da ponte, entre as raízes do nervo facial. O painel B da Figura 11 corresponde à fotomicrografia de uma secção transversal do tronco cerebral de um animal representativo do grupo estudado, mostrando a localização de um sítio típico de microinjeção na área A5.



**Figura 11.** *Painel A:* representação esquemática de um corte transversal do tronco cerebral de rato mostrando as regiões correspondentes aos sítios de microinjeção na área A5 (Modificado de Paxinos e Watson, 1986). *Painel B:* fotomicrografia de uma secção transversal do tronco cerebral de um animal representativo do grupo estudado, mostrando os sítios típicos de microinjeção na área A5.

## **5. DISCUSSÃO**



O principal objetivo do nosso estudo foi avaliar o papel dos receptores purinérgicos P2 da área A5 na regulação do sistema cardiovascular e também avaliar a sua participação isolada ou em conjunto com os receptores glutamatérgicos ionotrópicos nas respostas cardiovasculares do quimiorreflexo em ratos não-anestesiados. Nossos resultados mostraram pela primeira vez que os receptores purinérgicos da área A5 participam do controle da pressão arterial e da frequência cardíaca, porém não estão envolvidos no controle tônico da pressão arterial ou na integração das respostas cardiovasculares do quimiorreflexo. Nossos dados também sugerem que a neurotransmissão do quimiorreflexo na área A5 não ocorre através da neuromodulação purinérgica sobre a neurotransmissão glutamatérgica.

Para avaliar a participação dos receptores purinérgicos P2 da área A5 na regulação do sistema cardiovascular, nós partimos da evidência que os neurônios noradrenérgicos dessa área enviam densas projeções para a medula espinhal alcançando a CIML (Bruinstroop e cols., 2012), demonstrando assim o seu papel na regulação simpática. Além disso, já foi observado através de estudos imunohistoquímicos que a área A5 possui uma grande porcentagem de neurônios noradrenérgicos que expressam todos os subtipos de receptores purinérgicos P2X (Yao e cols., 2001). Sendo assim, realizamos a microinjeção unilateral do agonista purinérgico  $\alpha,\beta$ -metileno ATP na área A5 de ratos acordados. Nossos resultados demonstraram que a microinjeção de  $\alpha,\beta$ -metileno ATP promoveu respostas simpatoexcitatórias caracterizadas por aumento da pressão arterial e taquicardia, sendo essas respostas atenuadas pelo antagonista purinérgico PPADS. Foi realizado ainda um protocolo para avaliar se as sucessivas microinjeções do agonista  $\alpha,\beta$ -metileno ATP na área A5 poderiam por si só levar à redução das respostas desse agonista por dessensibilização dos receptores P2 (dados parciais

não mostrados). Observamos que as respostas cardiovasculares produzidas pelo  $\alpha,\beta$ -metileno ATP na área A5 não foram modificadas pelas microinjeções sucessivas, o que sugere que o antagonista PPADS foi efetivo em bloquear os receptores P2. Entretanto, é importante ressaltar que a liberação endógena de ATP na área A5 não necessariamente produz o mesmo padrão de respostas que observamos, uma vez que a liberação endógena do ATP pode não estimular todos os neurônios da área A5. Já no protocolo que realizamos, foi utilizado um volume relativamente grande de  $\alpha,\beta$ -metileno ATP (100nl) com a intenção de que esse volume se espalhasse por toda a área A5, atingindo um grande número de neurônios e, assim, pudesse ser avaliado o papel dos receptores purinérgicos dessa área. Esta é uma limitação técnica que se observa quando se estuda uma transmissão sináptica específica no sistema nervoso central (de Paula e cols., 2004).

Estudos presentes na literatura já demonstraram que a área A5 envia e recebe projeções de diferentes regiões do sistema nervoso central, dentre elas regiões sabidamente envolvidas no controle cardiovascular, como o núcleo do trato solitário, bulbo ventrolateral rostral e caudal, núcleo parabraquial e paraventricular, substância cinzenta periaquedutal e área hipotalâmica de defesa (Byrum e Guyenet, 1987; Nicholas e Hancock, 1991, Li e cols., 1992, Bajic e cols., 2012; Abbott e cols., 2012, López-González e cols. 2013). Em relação às projeções eferentes, cerca de 90% dos neurônios noradrenérgicos da área A5 se projetam para a coluna intermédialateral da medula espinhal (Loewy e cols., 1979; Westlund e cols., 1983; Byrum e cols., 1984; Bruinstroop e cols., 2012), sugerindo, dessa forma, o importante papel dessa região na regulação de funções autonômicas simpáticas em geral e, em particular, da pressão arterial.

Dados presentes na literatura corroboram com nosso resultado, uma vez que já foi demonstrado que a estimulação elétrica e química da área A5 resulta em respostas cardiovasculares. Close e cols. (1982) e Drye e cols. (1990) observaram em seus estudos que a microinjeção de aminoácidos excitatórios, como o L-glutamato, na área A5 promove respostas cardiovasculares, as quais são abolidas quando da microinjeção prévia dos seus antagonistas seletivos. Estudos utilizando estimulação elétrica sugerem que a área A5 tenha papel simpatoexcitatório, uma vez que a estimulação desta área promove resposta pressora (Loewy e cols. 1979; Andrade e Aghajanian, 1982; Byrum e cols. 1984; Woodruff e cols. 1986; Huangfu e cols. 1991; Huangfu e cols. 1992).

Já em outros trabalhos utilizando microinjeções de aminoácidos excitatórios diretamente na área A5, foi observado um papel simpatoinibitório dessa área (Neil e cols., 1982; Stanek e cols., 1984; Drye e cols., 1990; Huangfu e cols., 1992; Dickerson e cols., 1997). Por outro lado, Ramos (2002), em seu estudo no qual utilizou ratos não-anestesiados, demonstrou que a microinjeção de L-glutamato na área A5 promove respostas cardiovasculares simpatoexcitatórias (aumento da pressão arterial e taquicardia) como as que observamos no nosso trabalho após a microinjeção de  $\alpha,\beta$ -metileno ATP. Estes resultados indicam que a área A5, quando estimulada numa condição experimental fisiologicamente mais adequada, evitando-se a possível interferência dos efeitos dos anestésicos no processamento das informações no SNC, apresenta-se preferencialmente como uma área pressora, sugerindo um importante papel desse conjunto de neurônios no controle e/ou modulação da atividade eferente simpática. Adicionalmente, em estudo mais recente de Kanbar e cols., em animais anestesiados com isoflurano (1,8 - 2%), foi observado que a fotoestimulação dos neurônios noradrenérgicos da área A5 através da técnica

de optogenética, que é uma técnica de extrema seletividade, causa aumento do tônus simpático visceral. Nesse mesmo estudo também foi sugerido que os neurônios noradrenérgicos da área A5 contribuem para a estimulação cardiovascular causada pela hipóxia aguda, uma vez que esses neurônios foram ativados pela estimulação do corpo carotídeo (Kanbar e cols., 2011).

O passo seguinte do presente estudo foi avaliar se os receptores purinérgicos P2 da área A5 participam da neurotransmissão das respostas cardiovasculares do quimiorreflexo em ratos não-anestesiados. A participação da área A5 na regulação das respostas reflexas à estimulação dos quimiorreceptores periféricos já é bem estabelecida na literatura. Já foi demonstrado através da técnica de imunohistoquímica para c-fos que os neurônios da área A5 encontram-se ativos em situações de hipóxia, sugerindo que esses neurônios são estimulados durante a ativação do quimiorreflexo (Erickson e Millhorn, 1994; Hirooka e cols., 1997). Guyenet e cols. (1993) demonstraram que a estimulação dos quimiorreceptores carotídeos através da inalação de  $N_2$  aumenta significativamente a atividade espontânea dos neurônios da área A5, além de promover aumento da descarga do nervo frênico e aumento moderado da pressão arterial. Koshiya e Guyenet (1994) observaram que a inibição da área A5 pela microinjeção de muscimol, um agonista gabaérgico, em ratos anestesiados, reduz aproximadamente 65% a resposta simpatoexcitatória do quimiorreflexo. Já Ramos (2002) observou em seu estudo com ratos não-anestesiados que o bloqueio da atividade neuronal da área A5 com lidocaína promoveu uma redução significativa da resposta pressora induzida pela estimulação dos quimiorreceptores carotídeos com KCN, mas não alterou a bradicardia. Nesse mesmo estudo, foi realizada a lesão bilateral seletiva dos neurônios noradrenérgicos da área A5 com a neurotoxina 6-hidroxi-dopamina (6-

OHDA). Como resultado, a resposta pressora do quimiorreflexo foi abolida. Esses dados em conjunto, sugerem que a área A5 participa de forma importante das respostas cardiovasculares do quimiorreflexo, em especial, na resposta simpatoexcitatória. No entanto, a neurotransmissão da informação aferente dos quimiorreceptores na área A5 ainda não foi suficientemente explorada.

Com base nos dados anteriormente apresentados que mostraram que: 1) a estimulação dos receptores purinérgicos da área A5 causa resposta pressora e 2) nos dados da literatura que mostram que essa área atua de forma importante na expressão da resposta simpatoexcitatória do quimiorreflexo, no protocolo subsequente foi realizado o bloqueio específico dos receptores purinérgicos P2 da área A5 através da microinjeção bilateral do antagonista purinérgico PPADS e os quimiorreceptores carotídeos ativados através da injeção i.v. de KCN antes e após esse bloqueio. Nossos resultados mostraram que o PPADS na área A5 não promoveu alterações nas respostas pressora e bradicárdica evocadas pela ativação do quimiorreflexo com KCN, o mesmo foi observado ao utilizar outro antagonista purinérgico P2, o suramin (dados parciais não mostrados), sugerindo que os receptores P2, apesar de participarem da regulação da pressão arterial e da frequência cardíaca, não participariam da integração do quimiorreflexo na área A5 de ratos não-anestesiados.

Entretanto, vale ressaltar que a atenuação da resposta pressora e taquicárdica causada pela microinjeção do  $\alpha,\beta$ -metileno ATP na área A5 ocorreu apenas 30 minutos após a microinjeção do antagonista purinérgico PPADS. Trabalhos presentes na literatura mostram que o PPADS possui ação rápida em bloquear os receptores P2. de Paula e cols. (2004) observaram redução da bradicardia evocada pela microinjeção de ATP no NTS após 2 minutos da

microinjeção de PPADS (0,25nmol/50nl) em ratos acordados. Da mesma forma, Passamani e cols. (2014) também observaram um rápido efeito do PPADS (500pmol/100nl) em bloquear a bradicardia evocada pela microinjeção de ATP no núcleo ambíguo de ratos anestesiados. Além disso, no nosso estudo, o antagonista purinérgico PPADS promoveu redução apenas parcial, cerca de 50%, da resposta pressora induzida pelo agonista  $\alpha,\beta$ -metileno ATP microinjetado na área A5. Isto sugere que poderia haver a participação de outros receptores ativados pelo  $\alpha,\beta$ -metileno ATP e que não foram bloqueados pelo PPADS ou sugere ainda que não foi utilizada a dose máxima de PPADS capaz de bloquear todos os subtipos de receptores purinérgicos. Sendo assim, não podemos ainda descartar totalmente a participação dos receptores purinérgicos da área A5 na neurotransmissão do quimiorreflexo. Dessa forma, experimentos complementares são ainda necessários para a melhor caracterização do papel dos receptores purinérgicos da área A5 na integração do quimiorreflexo.

A possibilidade de que o ATP poderia atuar como um neurotransmissor/neuromodulador foi sugerida originalmente por Burnstock em 1972. Há uma série de evidências que mostram que o ATP pode atuar como co-transmissor de transmissores clássicos em nervos do sistema nervoso periférico e central (Burnstock, 1972; Burnstock & Sneddon, 1985; Lundberg, 1996). O ATP pode agir tanto no terminal pré-sináptico, modulando a liberação de outro transmissor quanto no pós-sináptico, melhorando a ação do transmissor (Burnstock, 2004). Já a ideia da neuromodulação purinérgica em relação às respostas cardiovasculares do quimiorreflexo surgiu devido a uma série de estudos envolvendo o ATP e o L-glutamato no NTS.

Inicialmente, Haibara e cols. (1995) demonstraram que o antagonismo dos receptores NMDA do NTS comissural atenuou apenas a bradicardia do quimiorreflexo, sem afetar a resposta pressora. Em seguida, foi demonstrado que o antagonismo dos receptores ionotrópicos glutamatérgicos do NTS comissural produziu apenas uma redução parcial da resposta pressora do quimiorreflexo em ratos acordados (Haibara e cols., 1999; Machado e Bonagamba, 2005). Além disso, o antagonismo dos receptores glutamatérgicos tanto ionotrópicos quanto metabotrópicos do NTS comissural também falhou em reduzir a simpatoexcitação reflexa causada pela ativação do quimiorreflexo em WHPB (preparação coração-tronco cerebral) (Braga e Machado, 2006). Paton e cols. (2002) mostraram que a microinjeção dos antagonistas purinérgicos PPADS e suramin no NTS atenua somente a bradicardia do quimiorreflexo em WHPB. Dessa forma, esses resultados sugeriram que a neurotransmissão do componente simpatoexcitatório do quimiorreflexo envolveria outros neurotransmissores além do L-glutamato no NTS.

Ainda em relação à neuromodulação purinérgica, posteriormente, em estudo realizado por Braga e cols. (2007) foi demonstrado que o bloqueio isolado dos receptores P2 no NTS comissural não causou alterações nas respostas cardiovasculares do quimiorreflexo em ratos acordados ou em WHBP. No entanto, nesse mesmo estudo foi observado que a microinjeção sequencial do antagonista de receptor purinérgico (PPADS) e do antagonista glutamatérgico (KIN) levou a uma significativa atenuação das respostas pressora (simpatoexcitatória) e bradicárdica (parassimpatoexcitatória) do quimiorreflexo. Esta foi a primeira evidência de que as respostas cardiovasculares do quimiorreflexo seriam mediadas tanto por receptores purinérgicos P2 quanto por receptores ionotrópicos glutamatérgicos.

Com base nas evidências citadas acima e nos estudos anteriores realizados em nosso laboratório que mostraram que a microinjeção de L-glutamato na área A5 promove respostas pressora e taquicárdica (Ramos, 2002) e que o bloqueio isolado dos receptores glutamatérgicos da área A5 não altera as respostas cardiovasculares do quimiorreflexo em ratos não-anestesiados (Santos, 2007), nós decidimos investigar a possível interação entre ATP e glutamato através do bloqueio simultâneo dos receptores purinérgicos P2 e dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos da área A5 em ratos não-anestesiados. Observamos que o duplo bloqueio dos receptores purinérgicos e glutamatérgicos, realizado através da microinjeção bilateral dos antagonistas PPADS e KIN também falhou em alterar as respostas cardiovasculares do quimiorreflexo. Dessa forma, diferente do que foi visto em relação ao NTS, podemos sugerir que na área A5 as respostas cardiovasculares do quimiorreflexo não são mediadas por receptores purinérgicos P2 ou por receptores glutamatérgicos.



## **6. SUMÁRIO E CONCLUSÃO**

- A microinjeção do agonista purinérgico P2  $\alpha,\beta$ -metileno ATP na área A5 de ratos não-anestesiados produz resposta pressora e taquicárdica;
- O bloqueio bilateral dos receptores purinérgicos P2 da área A5 com PPADS não promove alterações dos valores basais de pressão arterial ou de frequência cardíaca;
- O bloqueio dos receptores purinérgicos da área A5, isoladamente ou em combinação com o bloqueio dos receptores glutamatérgicos, não altera as respostas cardiovasculares do quimiorreflexo em ratos não-anestesiados.

O conjunto desses resultados nos permite sugerir que em ratos não-anestesiados a neurotransmissão das respostas cardiovasculares do quimiorreflexo não são mediadas por receptores purinérgicos ou glutamatérgicos da área A5.

## **7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- ABBOTT, S. B.; KANBAR, R.; BOCHORISHVILI, G.; COATES, M. B.; STORNETTA, R. L.; GUYENET, P. G. C1 neurons excite locus coeruleus and A5 noradrenergic neurons along with sympathetic outflow in rats. *J Physiol.* **590**.12: 2897–2915, 2012.
- AICHER, S. A.; SARAVAY, R. H.; CRAVO, S.; JESKE, L.; MORRISONN, S. F.; REIS, D. J.; MILNER, T; A. Monosynaptic projections from nucleus tractus solitarii to C1 adrenergic neurons in the rostral ventrolateral medulla: comparison with input from the caudal ventrolateral medulla. *J Comp Neurol*, **373**, pp. 62-75, 1996.
- AMARAL, F. T. Estudo da neurotransmissão da área bulbar ventral e da substância cinzenta periaquedutal dorsolateral sobre o componente simpato-excitatório do quimiorreflexo em ratos não anestesiados. In: *Centro Biomédico*. Vitória: Universidade Federal do Espírito Santo, p.135, 1999.
- ANDRADE, R. & AGHAJANIAN, G. K. Single cell activity in the noradrenergic A-5 region: responses to drugs and peripheral manipulations of blood pressure. *Brain Research* **242**: 125-135, 1982.
- ANDRESEN, M.C. & KUNZE, D. L. Nucleus tractus solitarius– gateway to neural circulatory control. *Annu Rev Physiol* **56**: 93–116, 1994.
- BAJIC, D.; BOCKSTAELE, E. J. V.; PROUDFIT, H. K. Ultrastructural analysis of rat ventrolateral periaqueductal gray projections to the A5 cell group. *Neuroscience*; **224C**: 145–159, 2012.
- BARROS, R. A.; BONAGAMBA, L. G. H.; OKAMOTO-CANESIN, R.; DE OLIVEIRA, M.; BRANCO, L. G. S.; MACHADO, B. H. Cardiovascular responses to chemoreflex activation with potassium cyanide or hypoxic hypoxia in awake rats. *Auton. Neurosci.: Basic Clin.* **97**, 110-115, 2002.
- BERNTHAL, T. Chemo-reflex control of vascular reactions through the carotid body. *AM. J Physiol.* **121** (1): 1-19, 1938.
- BISCOE, T. J. Carotid body: structure and function. *Physiology Reviews* **51**: 437-495, 1971.
- BISCOE, T. J. E. & DUCHEN, M. R. Responses of type I cells dissociated from the rabbit carotid body to hypoxia. *Journal of Physiology* **428**: 39-59, 1990.

- BRAGA, V. A.; SORIANO, R. N.; BRACCIALLI, A. L.; DE PAULA, P. M.; BONAGAMBA, L. G.; PATON, J. F.; MACHADO, B. H. 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. *Journal of Physiology* **581**: 1129-1145, 2007.
- BRAGA, V. A. & MACHADO, B. H. 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. *Experimental Physiology* **91**: 551-559, 2006.
- BRUINSTROOP, E.; CANO, G.; VANDERHORST, V. G. J. M.; CAVALCANTE, J. C.; WIRTH, J.; SENA-ESTEVES, M.; SAPER, C. B. Spinal projections of the A5, A6 (locus coeruleus), and A7 noradrenergic cell groups in rats. *J Comp Neurol.* **520(9)**: 1985–2001, 2012.
- BURNSTOCK, G. Purinergic nerves. *Pharmacol Rev* **24**, 509–581, 1972.
- BURNSTOCK, G. Purinergic receptors. *J Theor Biol* **62**, 491–503, 1976.
- BURNSTOCK, G. Cotransmission. *Curr Opin Pharmacol.* **4**:47-52, 2004.
- BURNSTOCK, G. Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. *Physiol Rev*, **87**:659-797, 2007.
- BURNSTOCK, G. & SNEDDON, P. Evidence for ATP and noradrenaline as cotransmitters in sympathetic nerves. *Clin Sci (Lond)* **68**(Suppl. 10), 89s–92s, 1985.
- BYRUM, C. E. & GUYENET, P. G. Afferent and efferent connections of the A5 noradrenergic cell group in the rat. *The Journal of Comparative Neurology* **261**: 529-542, 1987.
- BYRUM, C. E.; STORNETTA, R.; GUYENET, P. G. Electrophysiological properties of spinally-projecting A5 noradrenergic neurons. *Brain Res.* **303**: 15–29, 1984.
- CARLSON, J. T.; HEDNER, J.; ELAM, M.; EJNELL, H.; SELLGREN, J.; WALLIN, B. G. Augmented resting sympathetic activity in awake patients with obstructive sleep apnea. *Chest.*; **103**(6):1763-8, 1993.

- CHITRAVANSHI, V. C. & SAPRU, H. N. Chemoreceptor-sensitive neurons in commissural subnucleus of nucleus tractus solitarius of the rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **268**, R851–R858, 1995.
- CLOSE, J. M.; NEIL, J. J.; LOEWY, A. D. Actions of N-methyl aspartate and its antagonist aminophosphonovalerate on the A5 catecholamine cell group in rat. *Brain Research* **249**: 393-396, 1982.
- COLLINGRIDGE, G. L. & LESTER, R. A. Excitatory amino acid receptors in the vertebrate central nervous system. *Pharmacol* **41**(2):143-210, 1989.
- COMROE Jr, J. H. The location and function of the chemoreceptors of aorta. *Am J Physiol*. **127**: 176-190, 1939.
- COSTA-SILVA, J. H.; ZOCCAL, D. B.; MACHADO, B. H. Glutamatergic antagonism in the NTS decreases post-inspiratory drive and changes phrenic and sympathetic coupling during chemoreflex activation. *J Neurophysiol*, **103** (4), pp. 2095-2106, 2010.
- CRUZ, J.C.; BONAGAMBA, L.G.H.; MACHADO, B.H.; BIANCARDI, V.C.; STERN, J. E. intermittent activation of peripheral chemoreceptors in awake rats induces fos expression in RVLM-projecting neurons in the PVN. *Neuroscience*, **157**(2): 463-472, 2008.
- DAHLSTROM, A. & FUXE, K. Localization of monoamines in the lower brain stem. *Experientia* **20**: 398-399, 1964.
- DAMPNEY, R. A. L.; HORIUCHI, J.; TAGAWA, T.; FONTES, M. A. P.; POTTS, P. D.; J. W. POLSON. Medullary and supramedullary mechanisms regulating sympathetic vasomotor tone. *Acta Physiol Scand*, **177**, 209–218, 2003.
- DE PAULA, P. M.; ANTUNES, V. R.; BONAGAMBA, L. G. H.; MACHADO, B. H. Cardiovascular responses to microinjection of ATP into the nucleus tractus solitarii of awake rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **287**: R1164-R1171, 2004.
- DICKERSON, L. W.; PANICO, W. H.; KUHN, F. E.; WILLIS, A. C.; FITZGERALD, J. F.; MEYER, E. L.; NORMAN, W. P.; GILLIS, R. A. Stimulation of dog RVLM and A5 area changes sympathetic outflow to vascular beds without effect on the heart. *American Journal of Physiology* **272**: R821-839, 1997.

- DRYE, R. G.; BAISDEN, R. H.; WHITTINGTON, D. L.; WOODRUFF, M. L. The effects of stimulation of the A5 region on blood pressure and heart rate in rabbits. *Brain Research Bulletin* **24**: 33-39, 1990.
- EASTON, J.; HOWE, A. The distribution of thoracic glomus tissue (aortic bodies) in the rat. *Cell Tissue Res* **232**: 349-356, 1983.
- ERICKSON, J. T. & MILLHORN, D. E. Hypoxia and electrical stimulation of the carotid sinus nerve induce Fos-like immunoreactivity within catecholaminergic and serotonergic neurons of the rat brainstem. *The Journal of Comparative Neurology* **348**: 161-182, 1994.
- FITZGERALD, R. S. Oxygen and carotid body chemotransduction: the cholinergic hypothesis—a brief history and new evaluation. *Respir Physiol* **120**, 89–104, 2000.
- FRANCHINI, K. G. & KRIEGER, E. M. Cardiovascular responses of conscious rats to carotid body chemoreceptor stimulation by intravenous KCN. *Journal of the Autonomic Nervous System* **42**: 63-69, 1993.
- GONZALEZ, C.; ALMARAZ, L.; OBESO, A.; RIGUAL, R. Carotid body chemoreceptors: from natural stimuli to sensory discharges. *Physiol Rev* **74**:829-898, 1994.
- GONZALES, C.; LOPEZ-LOPEZ, J. R.; OBESO, A.; PEREZ-GARCIA, M. T.; ROCHER, A. Cellular mechanisms of oxygen chemoreception in the carotid body. *Respir Physiol*. 102 (2-3): 137-147, 1995.
- GOURINE, A. V.; LLAUDET, E.; DALE, N.; SPYER, K. M. ATP is a mediator of chemosensory transduction in the central nervous system. *Nature* **436**: 108-111, 2005.
- GU, J. G. & MACDERMOTT, A. B. Activation of ATP P2X receptors elicits glutamate release from sensory neuron synapses. *Nature* **389**: 749-753, 1997.
- GUYENET, P. G.; KOSHIYA, N.; HUANGFU, D.; VERBERNE, A. J.; RILEY, T. A. Central respiratory control of A5 and A6 pontine noradrenergic neurons. *American Journal of Physiology* **264**: R1035-1044, 1993.
- GUYENET, P. G. The sympathetic control of blood pressure. *Nat Rev Neurosci*, v. 7, n. 5, p. 335-46, 2006.

- HAIBARA, A. S.; COLOMBARI, E.; CHIANCA Jr, D. A.; BONAGAMBA, L. G.; MACHADO, B. H. NMDA receptors in NTS are involved in bradycardic but not in pressor response of chemoreflex. *American Journal of Physiology* **269**: H1421-1427, 1995.
- HAIBARA, A. S.; BONAGAMBA, L. G.; MACHADO, B. H. Sympathoexcitatory neurotransmission of the chemoreflex in the NTS of awake rats. *Am J Physiol*, **276**, pp. R69-R80, 1999.
- HAIBARA, A. S.; TAMASHIRO, E.; OLIVAN, M. V.; BONAGAMBA, L. G. H.; MACHADO, B. H. Involvement of the parabrachial nucleus in the pressor response to chemoreflex activation in awake rats. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical* **101**; 60 – 67, 2002.
- HEYMANS, C. & BOUCKAERT, J. J. Sinus caroticus and respiratory reflexes: I. Cerebral blood flow and respiration. Adrenaline apnoea. *Journal of Physiology* **69**: 254-266, 1930.
- HIROOKA, Y.; POLSON, J. W.; POTTS, P. D.; DAMPNEY, R. A. Hypoxia-induced Fos expression in neurons projecting to the pressor region in the rostral ventrolateral medulla. *Neuroscience* **80**: 1209-1224, 1997.
- HUANGFU, D.; HWANG, L. J.; RILEY, T. A.; GUYENET, P. G. Splanchnic nerve response to A5 area stimulation in rats. *American Journal of Physiology* **263**: R437-446, 1992.
- HUANGFU, D. H.; KOSHIYA, N.; GUYENET, P. G. A5 noradrenergic unit activity and sympathetic nerve discharge in rats. *American Journal of Physiology* **261**: R393-402, 1991.
- JARVIS, M. F. & KHAKH, B.S. ATP-gated P2X cation-channels. *Neuropharmacology* **56**: 208–215, 2009.
- JIN, Y. H.; BAILEY, T. W.; LI, B. Y.; SCHILD, J. H.; ANDRESEN, M. C. Purinergic and vanilloid receptor activation releases glutamate from separate cranial afferent terminals in nucleus tractus solitarius. *J Neurosci* **24**:4709-4717, 2004.
- KANBAR, R.; DEPUY, S. D.; WEST, G. H.; STORNETTA, R. L.; GUYENET, P. G. Regulation of visceral sympathetic tone by A5 noradrenergic neurons in rodents. *J Physiol* **589.4**, pp 903–917, 2011.



- 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.
- KING, T. L.; HEESCH, C. M.; CLARK, C. G.; KLINE, D. D.; HASSER, E. M. Hypoxia activates nucleus tractus solitarii neurons projecting to the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 302(10): R1219–R1232, 2012.
- KOSHIYA, N. & GUYENET, P. G. A5 noradrenergic neurons and the carotid sympathetic chemoreflex. *American Journal of Physiology* **267**: R519-526, 1994.
- KOSHIYA, N. & GUYENET, P.G. Role of the pons in the carotid sympathetic chemoreflex. *American Journal of Physiology* 267: R508-518, 1994a.
- KOSHIYA, N. & GUYENET, P. G. NTS neurons with carotid chemoreceptors inputs arborize in the rostral ventrolateral medulla. *Am J Physiol*, **270**, pp. R1273-R1278, 1996.
- KOSHIYA, N.; HUANGFU, D.; GUYENET, P. G. Ventrolateral medulla and sympathetic chemoreflex in the rat. *Brain Research* **609**: 174-184, 1993.
- LI, Y. W.; WESSELINGH, S. L.; BLESSING, W. W. Projections from rabbit caudal medulla to C1 and A5 sympathetic premotor neurons, demonstrated with phaseolus leucoagglutinin and herpes simplex virus. *J. Comp. Neurol.* **317**: 317–379, 1992.
- LOEWY, A. D.; GREGORIE, E. M.; MCKELLAR, S.; BAKER, R. P. Electrophysiological evidence that the A5 catecholamine cell group is a vasomotor center. *Brain Research* **178**: 196-200, 1979.
- LOEWY, A. D. & SPYER, K. M. Central regulation of autonomic functions. New York; Oxford: Oxford University Press, 1990.
- LÓPEZ-GONZÁLEZ, M. V.; DÍAZ-CASARES, A.; PEINADO-ARAGONÉS, C. A.; LARA, J. P.; BARBANCHO, M. A.; DAWID-MILNER, M. S. Neurons of the A5 region are required for the tachycardia evoked by electrical stimulation of the hypothalamic defence area in anaesthetized rats. *Exp Physiol* **98.8**: pp 1279–1294, 2013.

- LUNDBERG, J. M. Pharmacology of cotransmission in the autonomic nervous system: integrative aspects on amines, neuropeptides, adenosine triphosphate, amino acids and nitric oxide. *Pharmacol Rev* **48**, 113–178, 1996.
- McDONALD, D. M. Peripheral chemoreceptors. In *Regulation of Breathing*, part I, ed. Hornbein TF, pp. 105–319. Marcel Dekker Inc., New York, 1981.
- MACHADO, B. H. Neurotransmission of the cardiovascular reflexes in the nucleus tractus solitarius of awake rats. *Ann N Y Acad Sci*, **940**, pp. 179-196, 2001.
- MACHADO, B. H. & BONAGAMBA, L. G. 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.
- MACHADO, B. H.; DUN, N. J.; PILOWSKY, P. M. Neural mechanisms of cardiovascular regulation. *Kluwer Academic Publishers*, Boston, Ma, pp. 31-58, 2004.
- MARSHALL, J. M. Analysis of cardiovascular responses evoked following changes in peripheral chemoreceptor activity in the rat. *J Physiol* **394**:393-414, 1987.
- MAUAD, H. & MACHADO, B. H. Pressor response to unilateral carotid chemoreceptor activation is not affected by ipsilateral antagonism of excitatory amino acid receptors in the rostral ventrolateral medulla of awake rats. *Autonomic Neuroscience* **91**: 26-31, 2001.
- MIFFLIN, S. W. Arterial chemoreceptor input to nucleus tractus solitarius. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **263**, R368–R375, 1992.
- NEIL, J. J. & LOEWY, A. D. Decreases in blood pressure in response to L-glutamate microinjections into the A5 catecholamine cell group. *Brain Research* **241**: 271-278, 1982.
- NICHOLAS, A. P. & HANCOCK, M. B. Projections from the rostral ventrolateral medulla to brainstem monoamine neurons in the rat. *Neurosci. Lett.* **122**: 91–95, 1991.
- NURSE, C. A. Neurotransmitter and neuromodulatory mechanisms at peripheral arterial chemoreceptors. *Exp Physiol* **95.6** pp 657–667, 2010.

- NURSE, C. A. & ZHANG, M. Acetylcholine contributes to hypoxic chemotransmission in co-cultures of rat type 1 cells and petrosal neurons. *Respir Physiol* **115**, 189–199, 1999.
- PALLOT, D. J. The mammalian carotid body. *Advances in Anatomy, Embryology and cell biology*, 102, 1-90, 1987.
- PASSAMANI, L. M.; PEDROSA, D. F.; MAUAD, H.; SCHENBERG, L. C.; PATON, J. F. R.; SAMPAIO, K. N. Involvement of the purinergic system in central cardiovascular modulation at the level of the nucleus ambiguus of anaesthetized rats. *Exp Physiol* **96.3**, pp 262–274, 2010.
- PATON, J. F.; DE PAULA, P. M.; SPYER, K. M.; MACHADO, B. H.; 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. *Journal of Physiology* **543**: 995-1005, 2002.
- PAXINOS, G. & WATSON, C. The rat brain in stereotaxic coordinates. *Academic Press*, New York, 2007.
- PRABHAKAR, N. R.; PENG, Y. J.; JACONO, F. J.; KUMAR, G. K.; DICK, T. E. Cardiovascular alterations by chronic intermittent hypoxia: importance of carotid body chemoreflexes. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **32**, 447–449, 2005.
- PRABHAKAR, N. R.; PENG, Y. J.; KUMAR, G. K.; NANDURI, J. Peripheral Chemoreception and Arterial Pressure Responses to Intermittent Hypoxia. *Compr Physiol.* **5(2)**: 561–577, 2015.
- RAMOS, A. S. Papel da área A5 na resposta simpato-excitatória do quimiorreflexo em ratos não-anestesiados. In: *Departamento de Fisiologia e Biofísica*. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 2002.
- SANTOS, G. M. Estudo da neurotransmissão do quimiorreflexo e do barorreflexo na área A5 de ratos não-anestesiados. In: *Departamento de Fisiologia e Biofísica*. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 2007.
- SAPRU, H. N. Carotid chemoreflex. Neural pathways and transmitters. *Adv Exp Med Biol.* **410**: 357-64, 1996.

- SAPRU, H. N. & KRIEGER, A. J. Carotid and aortic chemoreceptor function in the rat. *Journal of Applied Physiology: Respiratory, Environmental and Exercise Physiology* **42**: 344-348, 1977.
- SHIGETOMI, E. & KATO, F. Action potential-independent release of glutamate by Ca<sup>2+</sup> entry through presynaptic P2X receptors elicits postsynaptic firing in the brainstem autonomic network. *J Neurosci* **24**:3125-3135, 2004.
- SHRIAHATA, M.; BALBIR, A.; OTSUBO, T.; FITZGERALD, R. S. Role of acetylcholine in neurotransmission of the carotid body. *Respir Physiol Neurobiol* **157**, 93–105.
- SPYER, K. M. Annual review prize lecture. Central nervous mechanisms contributing to cardiovascular control. *J Physiol* **474**, 1–19, 1994.
- STANEK, K. A.; NEIL, J. J.; SAWYER, W. B.; LOEWY, A. D. Changes in regional blood flow and cardiac output after L-glutamate stimulation of A5 cell group. *American Journal of Physiology* **246**: H44-51, 1984.
- STONE, T. W. & BURTON, N. R. NMDA receptors and ligands in the vertebrate CNS. *Prog Neurobiol* **30**(4): 333- 68, 1988.
- STRACK, A. M.; SAWYER, W. B.; PLATT, K. B.; LOEWY, A. D. CNS cell groups regulating the sympathetic outflow to adrenal gland as revealed by transneuronal cell body labeling with pseudorabies virus. *Brain Research* **491**: 274-296, 1989.
- STUESSE, S. L. Origins of cardiac vagal preganglionic fibers: a retrograde transport study. *Brain Research* **236**: 15-25, 1982.
- SUN, M. K. & SPYER, K. M. Responses of rostroventrolateral medulla spinal vasomotor neurones to chemoreceptor stimulation in rats. *Journal of the Autonomic Nervous System* **33**: 79-84, 1991.
- SWANSON, L. W. & HARTMAN, B. K. The central adrenergic system. An immunofluorescence study of the location of cell bodies and their efferent connections in the rat utilizing dopamine-beta-hydroxylase as a marker. *The Journal of Comparative Neurology* **163**: 467-505, 1975.

- TAXINI, C. L.; TAKAKURA, A. C.; GARGAGLIONI, L. H.; MOREIRA, T. S. Control of the central chemoreflex by A5 noradrenergic neurons in rats. *Neuroscience* **199**, 177–186, 2011.
- URBANSKI, R. W.; SAPRU, H. N. Evidence for a sympathoexcitatory pathway from the nucleus tractus solitarius to the ventrolateral medullary pressor area. *J Auton Nerv Syst*, **23**, pp. 161-174, 1988.
- WESTLUND, K. N.; BOWKER, R. M.; ZIEGLER, M. G.; COULTER, J. D. Noradrenergic projections to the spinal cord of the rat. *Brain Research* **263**: 15-31, 1983.
- WOLK, R.; SHAMSUZZAMAN, A. S. M. & SOMERS, V. K. Obesity, sleep apnea, and hypertension. *Hypertension* **42**, 1067–1074, 2003.
- WOODRUFF, M. L.; BAISDEN, R. H.; WHITTINGTON, D. L. Effects of electrical stimulation of the pontine A5 cell group on blood pressure and heart rate in the rabbit. *Brain Research* **379**: 10-23, 1986.
- YAO, S. T.; BARDEN, J. A.; FINKELSTEIN, D. I.; BENNETT, M. R.; LAWRENCE, A. J. Comparative study on the distribution patterns of P2X(1)-P2X(6) receptor immunoreactivity in the brainstem of the rat and the common marmoset (*Callithrix jacchus*): association with catecholamine cell groups. *The Journal of Comparative Neurology* **427**: 485-507, 2000.
- ZHANG, M. & NURSE, C. A. CO<sub>2</sub>/pH chemosensory signaling in co-cultures of rat carotid body receptors and petrosal neurons: role of ATP and ACh. *Journal Neurophysiology* **92**: 3433-3445, 2004.

## **8. APÊNDICE**

**Tabela I. Efeito da microinjeção de  $\alpha,\beta$ -metileno ATP, em duas doses, na área A5 sobre a pressão arterial média ( $\Delta$ PAM, mmHg) e a frequência cardíaca ( $\Delta$ FC, bpm) em ratos não-anestesiados.**

$\Delta$ PAM (mmHg)	Controle	$\alpha,\beta$ -metileno ATP
<b>Ratos</b>	<b>Salina</b>	<b>0,625 nmol</b>
105	-1	11
106	0	26
109		13
110	-2	55
111		22
113		30
114	2	30
120		15
<b>x<math>\pm</math>epm</b>		<b>25<math>\pm</math>5*</b>
<b>Ratos</b>	<b>Salina</b>	<b>1,25 nmol</b>
104		19
115		14
117	-1	28
118		28
119	1	35
121	-1	34
123		16
124	2	22
<b>x<math>\pm</math>epm</b>	<b>0<math>\pm</math>0,5</b>	<b>25<math>\pm</math>3*</b>

<b>ΔFC (bpm)</b>	<b>Controle</b>	<b>α,β-metileno ATP</b>
<b>Rato #</b>	<b>Salina</b>	<b>0,625 nmol</b>
<b>105</b>	-4	43
<b>106</b>	5	23
<b>109</b>		34
<b>110</b>	2	23
<b>111</b>		69
<b>113</b>		83
<b>114</b>	4	31
<b>120</b>		9
<b>x±epm</b>		<b>39±9*</b>
<b>Rato #</b>	<b>Salina</b>	<b>1,25 nmol</b>
<b>104</b>		32
<b>115</b>		65
<b>117</b>	-2	79
<b>118</b>		22
<b>119</b>	4	99
<b>121</b>	6	74
<b>123</b>		39
<b>124</b>	-8	35
<b>x±epm</b>	<b>0,9±2</b>	<b>56±10*</b>

(\*) Diferença em relação ao grupo controle salina ( $p < 0,05$ ; ANOVA)



**Tabela II. Efeito da microinjeção de  $\alpha,\beta$ -metileno ATP (1,25nmol/100nl) na área A5 sobre a pressão arterial média ( $\Delta$ PAM, mmHg) e a frequência cardíaca ( $\Delta$ FC, bpm) antes e após a microinjeção de PPADS na mesma área em ratos não-anestesiados.**

$\Delta$ PAM (mmHg)	$\alpha,\beta$ -metileno ATP				
	Antes PPADS	Após PPADS			
Rato #	Controle	10'	30'	45'	60'
117	27	39	35	15	36
119	34	11	21	28	46
121	32	16	-1	0	1
123	17	17	4	1	-1
124	30	39	14	16	24
133	59	34	10	19	12
<b>x<math>\pm</math>epm</b>	<b>33<math>\pm</math>6</b>	<b>26<math>\pm</math>5</b>	<b>14<math>\pm</math>5*</b>	<b>13<math>\pm</math>4*</b>	<b>20<math>\pm</math>8</b>

$\Delta$ FC (bpm)	$\alpha,\beta$ -metileno ATP				
	Antes PPADS	Após PPADS			
Rato #	Controle	10'	30'	45'	60'
117	85	79	59	32	25
119	100	52	55	68	91
121	73	40	0	3	-10
123	40	36	3	5	1
124	34	112	52	64	59
133	85	13	-9	-10	28
<b>x<math>\pm</math>epm</b>	<b>70<math>\pm</math>11</b>	<b>55<math>\pm</math>14</b>	<b>27<math>\pm</math>13*</b>	<b>27<math>\pm</math>14*</b>	<b>32<math>\pm</math>15*</b>

(\*) Diferença em relação ao grupo  $\alpha,\beta$ -metileno ATP controle ( $p < 0,05$ ; ANOVA).

**Tabela III. Efeitos da microinjeção bilateral de PPADS (0,5nmol/100nl) na área A5 sobre as alterações da pressão arterial média ( $\Delta$ PAM, mmHg) e da frequência cardíaca ( $\Delta$ FC, bpm) induzidas pela injeção i.v. de KCN (40 $\mu$ g/0,1ml) em ratos não-anestesiados.**

$\Delta$ PAM (mmHg)	KCN					
	Antes PPADS	Após PPADS				
Rato #	Controle	10'	20'	30'	45'	60'
43	45	50	43	47	47	48
52	14	25	34	38	37	29
55	44	28	56	48	37	46
58	44	52	46	37	41	21
59	43	41	35	35	40	39
<b>x<math>\pm</math>epm</b>	<b>38<math>\pm</math>6</b>	<b>39<math>\pm</math>6</b>	<b>43<math>\pm</math>4</b>	<b>41<math>\pm</math>3</b>	<b>40<math>\pm</math>2</b>	<b>37<math>\pm</math>5</b>

$\Delta$ FC (bpm)	KCN					
	Antes PPADS	Após PPADS				
Rato #	Controle	10'	20'	30'	45'	60'
43	-274	-197	-247	-228	-215	-220
52	-258	-212	-229	-217	-226	-271
55	-256	-332	-283	-277	-267	-296
58	-225	-208	-215	-225	-262	-205
59	-251	-237	-264	-305	-285	-271
<b>x<math>\pm</math>epm</b>	<b>-253<math>\pm</math>8</b>	<b>-237<math>\pm</math>25</b>	<b>-248<math>\pm</math>12</b>	<b>-250<math>\pm</math>17</b>	<b>-251<math>\pm</math>13</b>	<b>-253<math>\pm</math>17</b>

**Tabela IV. Efeito da microinjeção bilateral de PPADS (0,5nmol/100nl) na área A5 sobre os parâmetros basais de pressão arterial média (PAM, mmHg) e frequência cardíaca (FC, bpm).**

<b>PAM basal (mmHg)</b>	<b>Antes PPADS</b>	<b>Após PPADS</b>				
<b>Rato #</b>	<b>Controle</b>	<b>10'</b>	<b>20'</b>	<b>30'</b>	<b>45'</b>	<b>60'</b>
<b>43</b>	121	127	134	127	126	124
<b>52</b>	107	120	123	121	123	126
<b>55</b>	111	122	114	113	117	113
<b>58</b>	111	107	108	110	112	110
<b>59</b>	101	104	101	103	103	98
<b>x±epm</b>	<b>110±3</b>	<b>116±4</b>	<b>116±6</b>	<b>115±4</b>	<b>116±4</b>	<b>114±5</b>

<b>FC basal (bpm)</b>	<b>Antes PPADS</b>	<b>Após PPADS</b>				
<b>Rato #</b>	<b>Controle</b>	<b>10'</b>	<b>20'</b>	<b>30'</b>	<b>45'</b>	<b>60'</b>
<b>43</b>	324	304	364	309	303	315
<b>52</b>	340	341	340	336	348	382
<b>55</b>	365	415	393	387	386	386
<b>58</b>	372	289	314	349	339	335
<b>59</b>	360	325	362	405	407	368
<b>x±epm</b>	<b>352±9</b>	<b>335±22</b>	<b>355±13</b>	<b>357±17</b>	<b>357±18</b>	<b>357±14</b>

**Tabela V. Efeitos da microinjeção bilateral de PPADS (0,25nmol/50nl) e KIN (2,0nmol/50nl) na área A5 sobre as alterações da pressão arterial média ( $\Delta$ PAM, mmHg) e da frequência cardíaca ( $\Delta$ FC, bpm) induzidas pela injeção i.v. de KCN (40 $\mu$ g/0,1ml) em ratos não-anestesiados.**

$\Delta$ PAM (mmHg)	KCN					
	Antes PPADS+KIN	Após PPADS+KIN				
Rato #	Controle	10'	20'	30'	45'	60'
67	56	52	66	66	55	58
68	47	29	50	44	51	40
70	43	33	52	46	35	49
74	57	42	34	40	45	52
141	47	51	35	51	43	50
154	42	38	38	36	34	33
<b>x<math>\pm</math>epm</b>	<b>49<math>\pm</math>3</b>	<b>41<math>\pm</math>4</b>	<b>46<math>\pm</math>5</b>	<b>47<math>\pm</math>4</b>	<b>44<math>\pm</math>3</b>	<b>47<math>\pm</math>4</b>

$\Delta$ FC (bpm)	KCN					
	Antes PPADS+KIN	Após PPADS+KIN				
Rato #	Controle	10'	20'	30'	45'	60'
67	-218	-273	-234	-239	-239	-255
68	-248	-325	-273	-313	-242	-226
70	-201	-238	-264	-282	-250	-246
74	-255	-289	-251	-267	-299	-274
141	-230	-133	-206	-249	-248	-234
154	-361	-293	-271	-258	-280	-319
<b>x<math>\pm</math>epm</b>	<b>-252<math>\pm</math>23</b>	<b>-259<math>\pm</math>28</b>	<b>-250<math>\pm</math>11</b>	<b>-268<math>\pm</math>11</b>	<b>-260<math>\pm</math>10</b>	<b>-259<math>\pm</math>14</b>

**Tabela VI. Efeito da microinjeção bilateral de PPADS (0,25nmol/50nl) e KIN (2,0nmol/50nl) na área A5 sobre os parâmetros basais de pressão arterial média (PAM, mmHg) e frequência cardíaca (FC, bpm).**

PAM basal (mmHg)	Antes PPADS+KIN	Após PPADS+KIN					
		Rato #	Controle	10'	20'	30'	45'
67	120		128	122	122	120	122
68	117		145	127	122	119	123
70	125		123	126	119	117	119
74	111		120	118	120	122	116
141	111		115	113	113	115	115
154	103		111	107	109	112	117
<b>x±epm</b>	<b>115±3</b>		<b>124±5*</b>	<b>119±3</b>	<b>118±2</b>	<b>118±1</b>	<b>119±1</b>

FC basal (bpm)	Antes PPADS+KIN	Após PPADS+KIN					
		Rato #	Controle	10'	20'	30'	45'
67	306		356	330	345	320	349
68	346		395	367	380	350	327
70	319		352	355	351	353	353
74	337		370	339	356	391	373
141	364		366	362	368	370	384
154	414		361	337	331	357	381
<b>x±epm</b>	<b>348±16</b>		<b>367±6</b>	<b>348±6</b>	<b>355±7</b>	<b>357±10</b>	<b>361±9</b>

(\*) Diferença em relação ao grupo controle (p<0,05; ANOVA)

