

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Fisiologia e Biofísica
Programa de pós-graduação em Ciências Biológicas:
Fisiologia e Farmacologia

**PAPEL DOS RECEPTORES GLUTAMATÉRGICOS
IONOTRÓPICOS DO HIPOTÁLAMO DORSOMEDIAL NA
REGULAÇÃO DAS RESPOSTAS CARDIOVASCULARES E
COMPORTAMENTAL DO QUIMIORREFLEXO**

Nathália Teodoro da Silva

Belo Horizonte – MG
2012

Nathália Teodoro da Silva

**PAPEL DOS RECEPTORES GLUTAMATÉRGICOS
IONOTRÓPICOS DO HIPOTÁLAMO DORSOMEDIAL NA
REGULAÇÃO DAS RESPOSTAS CARDIOVASCULARES E
COMPORTAMENTAL DO QUIMIORREFLEXO**

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

Orientadora: Profa. Dra. Andréa Siqueira Haibara

043

Silva, Nathália Teodoro da.

Papel dos receptores glutamatérgicos inotrópicos do hipotálamo dorsomedial na regulação das respostas cardiovasculares e comportamental do quimiorreflexo. [manuscrito] / Nathália Teodoro da Silva. – 2012.

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

Orientadora: Andréa Siqueira Haibara.

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

1. Núcleo hipotalâmico dorsomedial. 2. Quimiorreflexo. 3. Receptores glutamatérgicos. 4. Receptores de N-Metil-D-Aspartato. 5. Respostas cardiovasculares. 6. Fisiologia – Teses. I. Haibara, Andréa Siqueira. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Departamento de Fisiologia e Biofísica III. Título.

CDU: 612

“A ciência humana de maneira nenhuma nega a existência de Deus. Quando considero quantas e quão maravilhosas coisas o homem compreende, pesquisa e consegue realizar, então reconheço claramente que o espírito humano é obra de Deus, e a mais notável.”
(Galileu Galilei)

*Dedico esse trabalho a duas pessoas muito queridas:
minha tia Graça e a minha vó Zizinha,
que me apoiaram e me ajudaram
de todas as formas possíveis na Terra
e hoje são meus anjos no Céu.*

AGRADECIMENTOS

Os meus mais sinceros agradecimentos:

À Deus, pelo dom da vida, por me guiar e me mostrar sempre o melhor caminho a seguir. Por me reservar saúde e proteção e por me cercar de tantas pessoas maravilhosas.

Aos meus pais, que me deram a vida e me ensinaram a vivê-la com dignidade. Aos meus pais, que se doaram inteiros e renunciaram aos seus sonhos para que, muitas vezes, eu pudesse realizar os meus, não bastaria um obrigado. Não tenho palavras para agradecer.

À minha orientadora Andréa, pela oportunidade, pelos ensinamentos, pelo voto de confiança, pela orientação sempre presente, pela paciência e pela amizade que contribuíram de forma ímpar para o meu crescimento profissional.

Aos demais professores do Laboratório de Hipertensão (Robson, Marco Antônio, Maria José), por me acolherem no laboratório.

Ao meu namorado David, que está sempre presente, me encorajando a seguir em frente. Pelas longas conversas, pelo companheirismo, pelo carinho e principalmente pelo amor incondicional, que me conforta e me dá forças para superar todos os obstáculos.

Aos meus irmãos Nayara e Hiago, que estiveram sempre ao meu lado, pelo amor, pela amizade e pela companhia durante todos esses anos de convivência.

À minha tia Nair, que está sempre me ajudando como pode (e até como não pode), que reza por mim e sempre transmitiu boas energias para eu alcançar meus objetivos.

À minha tia Graça, que me apoiou, torceu, vibrou e tanto se alegrou quando entrei no mestrado, que foi uma das pessoas que mais me apoiou e me incentivou ao longo dessa caminhada, mas que, por vontade de Deus, nos deixou antes de ver a conclusão desse trabalho. Agradeço à minha tia Graça, com os olhos cheios de água e o coração cheio de saudade por tudo que você fez por mim e sei que, onde quer que você esteja, está sempre torcendo por mim e sei que agora está feliz com essa conquista.

À minha vó Zizinha, meu exemplo de vida, que também sempre torceu, rezou por mim e sempre me ajudou, desde os meus primeiros passos na vida, mas que a pouco tempo nos deixou. À minha vó, que está sempre na minha memória e no meu coração, meu mais profundo agradecimento.

Ao professor Raul, meu exemplo de profissionalismo e dedicação ao trabalho, pelos ensinamentos adquiridos, que despertou em mim a vontade de estudar fisiologia e que, portanto, foi o responsável pelo início dessa caminhada.

Ao Zezé, sempre tão prestativo, que me auxiliou com os procedimentos cirúrgicos. Obrigada pelos ensinamentos e por toda a ajuda ao longo desse trabalho.

Aos colegas e amigos com quem tive o privilégio de conviver durante o mestrado (Renatinha, Gicvaz, Gonzaga, Dani Moura, Fernandinha, Roberto, Marcos Mello, Aline, Thalyta, Raphael, Michelle, Charles, Ariane, Flavinha, Dani Ianzer, Carlos, Priscila), pela torcida e pelas conversas que me proporcionaram bons momentos ao longo desse trabalho.

Às minhas amigas da graduação (Camila, Mayra, Julieta, Mariana e Chris) que também foram importantes durante minha formação e durante o mestrado, proporcionando momentos de alegria, que tornaram essa caminhada mais feliz.

Ao Ubirajara Fumega, meu colaborador, que foi parte essencial na realização deste trabalho.

SUMÁRIO

1 RESUMO.....	10
2 ABSTRACT.....	13
3 INTRODUÇÃO.....	16
3.1 A importância dos quimiorreceptores no controle da pressão arterial..	17
3.2 Hipotálamo: um centro integrador de respostas autonômicas	20
3.3 O Hipotálamo Dorsomedial (HDM).....	21
3.4 Receptores glutamatérgicos ionotrópicos.....	22
4 OBJETIVOS.....	25
4.1 Objetivos gerais.....	26
4.2 Objetivos específicos.....	26
5 MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
5.1 Animais.....	28
5.2 Confeção e implante de cânulas-guia.....	28
5.3 Canulação da artéria e veia femoral.....	29
5.4 Registro simultâneo da resposta comportamental e dos parâmetros cardiovasculares.....	30
5.5 Estimulação dos quimiorreceptores periféricos.....	31
5.6 Drogas.....	31
5.7 Procedimento de microinjeção no HDM.....	32
5.8 Perfusão e Histologia.....	32
5.9 Análise estatística.....	33
5.10 Procedimentos experimentais.....	33
Protocolo 1: Efeito do bloqueio dos receptores NMDA do HDM sobre as respostas cardiovasculares e comportamental do quimiorreflexo.....	33
Protocolo 2: Efeito do bloqueio dos receptores não-NMDA do HDM sobre as respostas cardiovasculares e comportamental do quimiorreflexo.....	35

Protocolo 3: Efeito do bloqueio conjunto dos receptores NMDA e não-NMDA do HDM sobre as respostas cardiovasculares e comportamental do quimiorreflexo.....	36
6 RESULTADOS.....	37
6.1 Efeito do bloqueio dos receptores NMDA do HDM sobre as respostas cardiovasculares e comportamental do quimiorreflexo.....	38
6.2 Efeito do bloqueio dos receptores não-NMDA do HDM sobre as respostas cardiovasculares e comportamental do quimiorreflexo.....	44
6.3 Efeito do bloqueio conjunto dos receptores NMDA e não-NMDA do HDM sobre as respostas cardiovasculares e comportamental do quimiorreflexo.....	50
6.4 Análise histológica.....	55
7 DISCUSSÃO.....	58
8 SUMÁRIO E CONCLUSÃO.....	72
9 REFERÊNCIAS.....	74

1 RESUMO

Estudos do nosso laboratório (Queiroz e cols., 2011) mostraram que a microinjeção bilateral de lidocaína no HDM reduz a resposta pressora do quimiorreflexo. Esses estudos também mostraram que o bloqueio bilateral dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos do HDM com ácido kinurênico reduz a resposta pressora e abole a resposta comportamental do quimiorreflexo. O aminoácido excitatório L-glutamato pode atuar em três subtipos distintos de receptores ionotrópicos: NMDA (N-Metil-D-Aspartato), AMPA (α - amino-3-hidroxi-5-metil-4 isoxazolpropionato) e kainato, sendo esses dois últimos também classificados como receptores não-NMDA. Estudos anteriores mostram que diferentes estímulos podem ativar apenas um subtipo de receptor glutamatérgico ionotrópico no HDM para evocar uma resposta fisiológica específica. Além disso, embora o ácido kinurênico seja conhecido como antagonista não seletivo dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos, alguns estudos mostram que este antagonista também pode atuar em receptores nicotínicos (Hilmas e cols., 2001; Stone, 2007). Baseado nessas evidências, e considerando que os neurônios do HDM possuem receptores nicotínicos (Block e Billiar, 1981), o objetivo desse estudo foi reavaliar o papel dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos do HDM e avaliar a contribuição relativa dos receptores NMDA e não-NMDA deste núcleo na integração das respostas cardiovasculares e comportamentais do quimiorreflexo. O quimiorreflexo foi estimulado com injeção intravenosa de cianeto de potássio (KCN 40 μ g/0,1 ml) antes e após a microinjeção bilateral dos antagonistas de receptores: a) NMDA (AP-5 100 ou 200 pmol/100nl), b) não-NMDA (CNQX 100 ou 200 pmol/100nl) ou c) da combinação dos dois antagonistas (AP-5 + CNQX 200 pmol/100 nl) no HDM. Além disso, foram realizados protocolos adicionais para se avaliar a eficácia dos antagonistas AP-5 e CNQX nas doses utilizadas (100 e 200 pmol/100 nl) em bloquear as respostas induzidas pelos agonistas específicos dos receptores NMDA e não-NMDA, os agonistas NMDA (10 pmol/100 nl) e AMPA (3 pmol/100 nl) respectivamente. A microinjeção de AP-5, na dose de 100 pmol/100 nl, não produziu alterações sobre as respostas cardiovasculares ($+47 \pm 2$ vs $+43 \pm 4$ mmHg; -236 ± 26 vs -245 ± 30 bpm) e comportamental ($+37 \pm 5$ vs $+27 \pm 5$ cm) do quimiorreflexo, todavia foi capaz de reduzir de forma significativa a magnitude das respostas cardiovasculares ($+21 \pm 2$ vs $+10 \pm 3$ mmHg; $+138 \pm 14$ vs $+74 \pm 25$ bpm) e comportamental (348 ± 106 vs 48 ± 27 cm) induzidas pelo agonista NMDA. A microinjeção de AP-5, na dose de 200 pmol/100 nl, também não produziu alterações sobre as

respostas cardiovasculares ($+37 \pm 1$ vs $+39 \pm 3$ mmHg; -260 ± 38 vs -253 ± 44 bpm) e comportamental (49 ± 14 vs 31 ± 9 cm) do quimiorreflexo, no entanto aboliu as respostas cardiovasculares ($+22 \pm 2$ vs $+2 \pm 1$ mmHg; $+114 \pm 7$ vs $+8 \pm 5$ bpm) e comportamental (425 ± 67 vs 0 ± 0 cm) induzidas pelo agonista NMDA. De forma semelhante, a microinjeção de CNQX, na dose de 100 pmol/100 nl, não promoveu alterações sobre as respostas cardiovasculares ($+39 \pm 6$ vs $+35 \pm 7$ mmHg; -237 ± 38 vs -260 ± 22 bpm) e comportamental (33 ± 13 vs 27 ± 8 cm) do quimiorreflexo, porém foi capaz de reduzir a magnitude das respostas cardiovasculares ($+20 \pm 2$ vs $+5 \pm 2$ mmHg; $+112 \pm 5$ vs $+39 \pm 17$ bpm) e comportamental (424 ± 70 vs 11 ± 6 cm) do agonista AMPA. A microinjeção de CNQX, na dose de 200 pmol/100 nl, também não promoveu alterações sobre as respostas cardiovasculares ($+43 \pm 3$ vs $+37 \pm 3$ mmHg; -202 ± 40 vs -167 ± 37 bpm) e comportamental ($+40 \pm 12$ vs 30 ± 13 cm) do quimiorreflexo, mas aboliu as respostas cardiovasculares ($+28 \pm 4$ vs $+1 \pm 1$ mmHg; $+90 \pm 9$ vs $+1 \pm 1$ bpm) e comportamental (327 ± 87 vs 0 ± 0 cm) induzidas pelo agonista AMPA. Por outro lado, a microinjeção da combinada dos antagonistas AP-5 + CNQX (200 pmol/50 nl) reduziu de forma significativa a magnitude da resposta pressora ($+38 \pm 4$ vs $+21 \pm 5$ mmHg) e comportamental (40 ± 14 vs 8 ± 5 cm) do quimiorreflexo. Esses resultados mostram que o bloqueio seletivo dos receptores NMDA ou não-NMDA do HDM isoladamente não é capaz de produzir alterações sobre as respostas pressora e comportamental do quimiorreflexo. Todavia, uma vez que o bloqueio combinado dos receptores NMDA e não-NMDA do HDM reduziu a resposta pressora e aboliu a resposta comportamental do quimiorreflexo, pode-se sugerir que esses receptores atuem de forma conjunta na integração do quimiorreflexo, de forma que o bloqueio de apenas um subtipo de receptor não altera essa resposta. Esses dados reforçam ainda o papel do aminoácido excitatório L-glutamato na neurotransmissão do quimiorreflexo no HDM.

2 ABSTRACT

Studies from our laboratory (Queiroz et al., 2011) showed that bilateral microinjection of lidocaine into the DMH reduces the pressor response to chemoreflex. These studies also showed that the bilateral blockade of glutamate receptors in the DMH with kynurenic acid reduces the pressor response and abolishes the behavioral response of chemoreflex. The excitatory amino acid L-glutamate may act through three distinct subtypes of ionotropic receptors: NMDA (N-methyl-D-aspartate), AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4 isoxazolpropionate) and kainate receptors. AMPA and kainate receptors are also classified as non-NMDA receptors. Previous studies have shown that different stimuli may activate only one subtype of ionotropic glutamate receptor in DMH to evoke a specific physiological response. Furthermore, although kynurenic acid is known as a non-selective antagonist at ionotropic glutamate receptors, some studies show that this antagonist is also able to act at nicotinic receptors (Hilmas et al., 2001, Stone, 2007). Based on this evidence, and considering that DMH neurons express nicotinic receptors (Block and Billiar, 1981), the aim of this study was to re-evaluate the role of ionotropic glutamate receptors in DMH and evaluate the relative contribution of NMDA and non-NMDA receptors in the integration of cardiovascular and behavioral responses of the chemoreflex. Wistar rats (270-330 g), were underwent stereotaxic surgery to implant bilateral guide cannulas into the DMH, five days before the experiments, and cannulation of the femoral artery and vein, one day before the experiments to measurement of cardiovascular parameters and systemic administration of drugs, respectively. The experiments were filmed and the behavioral response of the chemoreflex was assessed by the distance traveled by the animal, measured using the MATLAB software. The chemoreflex was stimulated with intravenous injection of KCN (40 μ g /0.1 ml) before and after bilateral microinjection of: a) NMDA receptor antagonist (AP-5 100 or 200 pmol/100 nl), b) non-NMDA receptor antagonist (CNQX 100 or 200 pmol/100 nl) or c) the combination of these two antagonists (AP-5 + CNQX 200 pmol/50 nl) into DMH. Furthermore, additional protocols were performed to evaluate the effectiveness of the AP-5 and CNQX antagonists to block NMDA and non-NMDA receptors, respectively. The NMDA agonist (10 pmol/100 nl) was microinjected into the DMH before and after ipsilateral microinjection of AP-5 (100 or 200 pmol/100 nl) and AMPA agonist (3 pmol/100 nl) was microinjected into DMH before and after the microinjection of CNQX (100 or 200 pmol/100 nl). The microinjection of AP-5 at a dose of 100 pmol/100 nl, did not change the cardiovascular (+47 \pm 2 vs

+43 ± 4 mmHg; -236 ± 26 vs -245 ± 30 bpm) and behavioral (+37 ± 5 vs +27 ± 5 cm) and behavioral responses (+ 39 ± 7 vs. +31 ± 6 cm) of the chemoreflex, but was able to significantly reduce the magnitude of cardiovascular (+21 ± 2 vs +10 ± 3 mmHg vs. +138 ± 14 +74 ± 25 bpm) and behavioral (348 ± 106 vs 48 ± 27 cm) responses induced by NMDA agonist. The microinjection of AP-5 at a dose of 200 pmol/100 nl also produced no changes on cardiovascular (+37 ± 1 vs. +39 ± 3 mmHg vs -260 ± 38 -253 ± 44 bpm) and behavioral (49 ± 14 vs. 31 ± 9 cm) responses of the chemoreflex, but abolished the cardiovascular (+22 ± 2 vs +2 ± 1 mmHg; +114 ± 7 vs. +8 ± 5 bpm) and behavioral (425 ± 67 vs 0 ± 0 cm) responses induced by NMDA agonist. Similarly, the microinjection of CNQX at a dose of 100 pmol/100 nl, did not change on the cardiovascular (+39 ± 6 vs. +35 ± 7 mmHg, -237 ± 38 vs -260 ± 22 bpm) and behavioral (33 ± 13 vs 27 ± 8 cm) responses of the chemoreflex, but was able to reduce the magnitude of cardiovascular (+20 ± 2 vs +5 ± 2 mmHg vs. +112 ± 5 vs +39 ± 17 bpm) and behavioral (424 ± 70 vs 11 ± 6 cm) responses of the AMPA agonist. The microinjection of CNQX at a dose of 200 pmol/100 nl also did not change the cardiovascular (+43 ± 3 vs +37 ± 3 mmHg, -202 ± 40 vs -167 ± 37 bpm) and behavioral (40 ± 12 vs 30 ± 13 cm) responses of the chemoreflex, but abolished the cardiovascular (+28 ± 4 vs. +1 ± 1 mmHg, +90 ± 9 vs. +1 ± 1 bpm) and behavioral (327 ± 87 vs 0 ± 0 cm) responses induced by AMPA agonist. However, microinjection of combined antagonists CNQX + AP-5 (200 pmol/50 ml) significantly reduced the magnitude of the pressor (+38 ± 4 vs +21 ± 5 mmHg) and behavioral (40 ± 14 vs 8 ± 5 cm) responses of the chemoreflex. These results show that the isolated blockade of NMDA or non-NMDA receptors of the DMH is not able of producing changes on pressor and behavioral responses of the chemoreflex. However, since the combined blockade of NMDA and non-NMDA of DMH reduced the pressor response and abolished the behavioral response of chemoreflex, it may suggest that these receptors act jointly on the integration of chemoreflex. These data further reinforce the role of excitatory amino acid L-glutamate in neurotransmission of the chemoreflex in DMH.

3 INTRODUÇÃO

A regulação da pressão arterial é uma das funções mais complexas, que envolve ações integradas dos sistemas cardiovascular, renal, endócrino e neural. Muitos estudos buscam elucidar o papel do sistema nervoso central (SNC) no controle da pressão arterial, seja em situações fisiológicas ou patológicas.

A regulação neural da pressão arterial envolve a ativação de sensores periféricos, que, através de suas aferências, estimulam regiões específicas do SNC, promovendo alteração da atividade cardiovascular e respiratória e a liberação de hormônios. Entre esses sistemas sensoriais periféricos, podem-se destacar os barorreceptores arteriais, sensíveis à variação de pressão, os receptores cardiopulmonares, sensíveis à variação de volume sanguíneo e os quimiorreceptores periféricos, sensíveis à variação da composição dos gases sanguíneos (Spyer, 1990).

3.1 A importância dos quimiorreceptores no controle da pressão arterial

Os quimiorreceptores periféricos encontram-se distribuídos em corpúsculos carotídeos e aórticos, localizados bilateralmente na bifurcação da carótida comum (quimiorreceptores carotídeos) ou em pequenos corpúsculos espalhados entre o arco aórtico e a artéria pulmonar (quimiorreceptores aórticos), sendo irrigados por sangue arterial através de pequenos ramos que se originam a partir da carótida externa e aorta, respectivamente. Uma importante característica dessas células quimiorreceptoras refere-se ao fato de estarem intimamente associadas aos capilares sanguíneos, sendo cerca de 25% do volume total do corpúsculo carotídeo ocupado por capilares e vênulas, ou seja, uma vascularização de 5 a 6 vezes maior que a do cérebro (Gonzales e cols, 1994).

São os quimiorreceptores periféricos que detectam as variações da pressão parcial de oxigênio (pO_2), pressão parcial de dióxido de carbono (pCO_2) e concentração hidrogeniônica (pH) do sangue e desencadeiam respostas homeostáticas para corrigir essas variações (Daly & Scott, 1963; Daly e cols, 1965). Os quimiorreceptores estimulam

primariamente os centros respiratórios, determinando alterações apropriadas da ventilação, como aumento da frequência respiratória, aumento do volume de ar corrente e aumento do volume minuto respiratório (Daly & Scott, 1963; Daly e cols, 1965). Além das respostas ventilatórias, a ativação dos quimiorreceptores periféricos também promove bradicardia e aumento da pressão arterial (Daly & Scott, 1958; Daly & Hazzledine, 1963; Daly e cols, 1965; Daly & Ungar, 1966). Sendo assim, o papel fisiológico dos quimiorreceptores periféricos está relacionado à promoção de ajustes ventilatórios e cardiovasculares no sentido de proporcionar a manutenção de O₂ e CO₂ no sangue em níveis ideais, bem como uma pressão de perfusão sanguínea adequada para todos os tecidos.

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 corpos carotídeos. A administração de prazosin, um antagonista α -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 atropina, o que indica que a resposta pressora depende da atividade eferente simpática vascular e que a bradicardia, é dependente da ativação parassimpática, e não é secundária à ativação dos barorreceptores decorrentes da elevação da pressão arterial (Franchini & Krieger, 1993; Haibara e cols., 1995). Esses resultados mostram que a ativação do quimiorreflexo promove duas respostas autonômicas independentes, isto é, uma resposta simpato-excitatória (pressora) e uma resposta de excitação parassimpática (bradicardia) (Franchini

& Krieger, 1993; Haibara e cols, 1995; Machado e cols, 2006). A estimulação dos quimiorreceptores em animais sob efeito de anestesia promove respostas cardiovasculares e ventilatórias de magnitude significativamente menor àquelas observadas em animais não-anestesiados (Franchini & Krieger, 1993). Dessa forma, fica clara a influência da anestesia nas respostas cardiovasculares, por isso é de grande importância o estudo desse reflexo em animais não-anestesiados, como foi realizado no presente estudo. Além das respostas ventilatórias e cardiovasculares, a ativação do quimiorreflexo com KCN produz resposta comportamental, similar à reação de luta e fuga, e que obviamente está ausente em animais anestesiados. Essa reação é decorrente da ativação de diferentes áreas prosencefálicas e mesencefálicas e não é secundária às mudanças cardiovasculares, visto que o bloqueio das respostas cardiovasculares não modifica a resposta comportamental (Franchini & Krieger, 1993).

Os quimiorreceptores, quando estimulados, deflagram potenciais de ação que se propagam, através no nervo vago e glossofaríngeo, em direção ao sistema nervoso central (Gonzales e cols, 1994; Chitravanshi & Sapru, 1995). Essas aferências realizam a sua primeira sinapse no núcleo do trato solitário (NTS), que pode ser considerado como uma das mais importantes estações sinápticas do tronco cerebral que integra informações aferentes do sistema cardiovascular, produzindo ajustes autonômicos e ventilatórios adequados às diferentes situações fisiológicas (Spyer, 1990; Mifflin, 1993; Ciriello e cols., 1994).

Estudos anatômicos sugerem a existência de conexões neuronais entre o NTS e os núcleos do hipotálamo, conhecido por participar da integração de respostas comportamentais neuroendócrinas, termogênicas e cardiorespiratórias a diferentes situações, como medo, defesa e estresse (Ricardo & Koh, 1978; Ter Horst & Luiten, 1986).

3.2 Hipotálamo: um centro integrador de respostas autonômicas

Um dos possíveis mecanismos de interação entre as aferências dos quimiorreceptores e neurônios do NTS parece envolver a ativação de áreas hipotalâmicas de defesa (Silva-Carvalho e cols, 1993), visto que a estimulação dos quimiorreceptores periféricos produz, além dos ajustes ventilatórios e cardiovasculares, importante resposta comportamental, semelhante à reação de defesa (Hilton & Joels, 1965; Hilton & Marshall, 1982).

Durante a estimulação dos quimiorreceptores, a ativação concomitante das áreas hipotalâmicas de defesa promove facilitação dos efeitos cardio-respiratórios induzidos pela ativação do quimiorreflexo (Hilton & Joels, 1965). Parte deste efeito facilitatório pode ocorrer devido à modulação excitatória das áreas hipotalâmicas de defesa sobre a atividade dos neurônios do NTS que recebem a informação aferente dos quimiorreceptores (Silva-Carvalho e cols, 1995). Além disso, a integridade das áreas hipotalâmicas é importante para a expressão da resposta pressora induzida pela ativação dos quimiorreceptores (Korner & Uther, 1969). O conjunto dessas evidências sugere uma importante participação das áreas hipotalâmicas de defesa na integração do componente pressor e comportamental do quimiorreflexo.

Dentre os núcleos hipotalâmicos envolvidos na integração das respostas do quimiorreflexo, podem-se destacar o núcleo paraventricular (Swanson & Sawchenko, 1980; Blair e cols, 1996), a área hipotalâmica lateral (Bernardis & Bellinger, 1996), o hipotálamo posterior (Barron & Heesch, 1990), a área pré-óptica medial (Bazett e cols, 1992) e o hipotálamo dorsomedial (DiMicco e cols, 2002).

3.3 O Hipotálamo Dorsomedial (HDM)

O hipotálamo dorsomedial (HDM), um núcleo integrante da clássica “área hipotalâmica de defesa”, é uma região do hipotálamo situado adjacente ao terceiro ventrículo, caudal ao núcleo paraventricular do hipotálamo, dorsal ao núcleo ventromedial e ventral à zona incerta. Suas bordas laterais e caudais são pouco distintas. Lateralmente, este é circundado pela região perifornical da área hipotalâmica lateral, com os limites do seu pólo caudal terminando no núcleo periventricular posterior (Thompson e cols, 1996). O HDM é ainda subdividido em duas porções distintas; uma porção difusa e uma porção compacta (Paxinos & Watson, 1986), sendo esta última claramente delimitada no pólo posterior do HDM (Fontes e cols, 2011). Os neurônios do HDM têm sido implicados na geração de uma resposta integrada ao estresse em ratos, visto que a estimulação dessa área com antagonistas GABAérgicos ou agonistas glutamatérgicos ionotrópicos produz um padrão de mudanças fisiológicas tipicamente semelhantes ao estresse experimental, tais como aumento da pressão arterial, aumento da frequência cardíaca e aumento da atividade locomotora do animal (Soltis & DiMicco, 1991; Shekhar, 1993; Stotz-Potter e cols, 1996; Fontes e cols, 2001; DiMicco e cols, 2002). Além disso, já foi observado que a microinjeção de muscimol, agonista dos receptores GABA_A, no HDM abole a resposta pressora e taquicárdica induzida pelo estresse por jato de ar (Lisa e cols, 1989). A microinjeção de ácido kinurênico, antagonista não-seletivo dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos, no HDM também abole as alterações cardiovasculares induzidas pelo estresse por jato de ar (Anderson & DiMicco, 1990).

Considerando que a ativação dos quimiorreceptores promove respostas pressora e comportamental, e as evidências de que o HDM está envolvido em situações de estresse experimental, o qual também promove respostas comportamentais e aumento da atividade eferente simpática, pode-se sugerir que as respostas simpatoexcitatória e

comportamental do quimiorreflexo possam compartilhar de algumas ou das mesmas vias neurais do estresse.

A primeira evidência da participação do HDM na integração do quimiorreflexo foi mostrada em estudo de Berquin e cols (2000), o qual observou que a hipóxia induz aumento da expressão da proteína c-Fos, um marcador de atividade neuronal, nos neurônios do HDM. Em estudo funcional, Queiroz e cols. (2011) mostrou que a microinjeção bilateral de lidocaína, um anestésico local, no HDM reduziu significativamente a magnitude da resposta pressora do quimiorreflexo. Esses foram indicativos importantes da participação do HDM nas respostas cardiovasculares à estimulação do quimiorreflexo.

Além disso, o estudo de Queiroz e cols (2011) mostrou que o bloqueio bilateral dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos do HDM com ácido kinurênico reduziu em 56% a resposta pressora, além de abolir a resposta comportamental do quimiorreflexo, o que mostra que os receptores glutamatérgicos do HDM são parte integrante da via neural das respostas cardiovasculares e comportamental do quimiorreflexo.

3.4 Receptores glutamatérgicos ionotrópicos

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). Os receptores glutamatérgicos ionotrópicos são compostos por quatro ou cinco subunidades formando um poro central com condutância para Ca^{++} ou Na^{+} e incluem três importantes subtipos: NMDA (N-Metil-D-aspartato), Kainato e AMPA (α -amino-3-hidroxi-5-metil-4 isoxazolpropionato), classificados por características específicas conforme a sua união com o seu agonista específico (Nakanishi, 1992; Hollmann & Heinemann, 1994). Os receptores NMDA são bloqueados de forma dose-

dependente pelo antagonista AP-5 (Davies e cols, 1981; Verdoorn e cols, 1989; Soltis & DiMicco, 1991), mas não pelo CNQX, que bloqueia tanto os receptores AMPA quanto os receptores kainato (Honore e cols, 1988; Verdoorn e cols, 1989; Soltis & DiMicco, 1991), sendo assim frequentemente chamados de receptores não-NMDA.

A presença de receptores NMDA e não-NMDA no HDM é bem estabelecida por uma variedade de técnicas, incluindo ensaios de ligação (Meeker e cols, 1994), estudos eletrofisiológicos (Bailey e cols, 2003) e farmacológicos (Soltis & DiMicco, 1991; Bailey & DiMicco, 2001). Estudos farmacológicos mostraram que a microinjeção dos agonistas NMDA e não-NMDA (AMPA e Kainato) no HDM promove importante resposta taquicárdica, acompanhada por modesto aumento da pressão arterial, aumento da atividade locomotora e aumento da concentração plasmática de ACTH (Soltis & DiMicco, 1991a, 1991b, 1992, De Novellis e cols., 1995, Bailey & DiMicco, 2001).

O papel relativo de cada um dos subtipos de receptores glutamatérgicos ionotrópicos do HDM tem sido objeto de estudo de alguns pesquisadores. Estudos de Soltis & DiMicco (1991 e 1992) mostraram que as respostas cardiovasculares induzidas pela desinibição do HDM ou pelo estresse experimental dependem da ativação tanto dos receptores do subtipo NMDA quanto dos receptores não-NMDA, uma vez que bloqueio de apenas um subtipo de receptores reduz parcialmente as respostas cardiovasculares, enquanto o duplo bloqueio desses receptores promove efeito adicional. Esses estudos sugerem a existência de dois componentes distintos nas respostas cardiovasculares ao estresse: um relacionado à atividade dos receptores NMDA e outro mediado por receptores não-NMDA. Por outro lado, Johnson & Shekhar (2006) mostraram que apenas os receptores NMDA do HDM participam das respostas ventilatórias, cardiovasculares e comportamentais induzidas pela infusão de lactato em ratos com disfunção GABAérgica no HDM, um modelo experimental de síndrome do pânico. Entretanto, outro estudo (Bailey e cols., 2003) sugere que neurônios do HDM são regulados tonicamente por

receptores gabaérgicos e receptores não-NMDA. Assim, é possível que diferentes estímulos possam ativar apenas um subtipo de receptor glutamatérgico no HDM para evocar a resposta fisiológica específica no animal.

O ácido kinurênico é reconhecido principalmente por sua capacidade de bloquear receptores ionotrópicos do glutamato de forma não seletiva (Perkins & Stone, 1982; Elmslie & Yoshikami, 1985; Birch e cols, 1988a, 1988b). No entanto, em estudos de cultura de neurônios, assim como em fatias de cérebro, o ácido kinurênico bloqueou os efeitos da acetilcolina ou de agonistas seletivos de receptores nicotínicos aplicados exogenamente (Hilmas e cols., 2001). Trabalhos posteriores revelaram que o componente excitatório de potenciais pós-sinápticos mediada pela ativação de receptores nicotínicos em interneurônios do hipocampo são bloqueados pelo ácido kinurênico (Stone, 2007). O ácido kinurênico foi ainda mais potente em reduzir a amplitude dos potenciais excitatórios pós-sinápticos nicotínicos do que aqueles mediados pelo L-glutamato. Desta forma, considerando-se que existe uma elevada concentração de receptores nicotínicos no hipotálamo (Block e Billiar, 1981), é possível especular que os efeitos do ácido kinurênico sobre as respostas do quimiorreflexo observadas em estudos anteriores (Queiroz e cols., 2011) possam ser dependentes do bloqueio dos receptores nicotínicos do HDM. Desta forma, torna-se importante analisar os efeitos de antagonistas seletivos de receptores glutamatérgicos ionotrópicos sobre o quimiorreflexo.

Baseada nessas evidências e considerando que a ativação de receptores glutamatérgicos ionotrópicos parece ser essencial para a expressão da resposta comportamental, bem como de parte da resposta pressora do quimiorreflexo, este estudo irá avaliar o papel relativo dos receptores NMDA e não-NMDA do HDM na integração das respostas do quimiorreflexo.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivos gerais

Avaliar o papel fisiológico dos subtipos de receptores glutamatérgicos ionotrópicos do HDM nas respostas cardiovasculares e comportamentais do quimiorreflexo em ratos não-anestesiados.

4.2 Objetivos específicos

- Avaliar a participação dos receptores do subtipo NMDA do HDM na integração das respostas cardiovasculares e comportamental do quimiorreflexo, pelo bloqueio bilateral desses receptores por meio da microinjeção do antagonista AP-5 nessa região.
- Avaliar a participação dos receptores do subtipo não-NMDA do HDM na integração das respostas cardiovasculares e comportamental do quimiorreflexo, pelo bloqueio bilateral desses receptores através da microinjeção do antagonista CNQX nessa região.
- Avaliar a participação conjunta dos receptores NMDA e não-NMDA do HDM na integração das respostas cardiovasculares e comportamental do quimiorreflexo, pelo bloqueio bilateral desses receptores através da microinjeção dos antagonistas AP-5 e CNQX juntos nessa região.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Animais

No presente trabalho foram utilizados ratos Wistar com peso entre 270-330, provenientes do Centro de Bioterismo (CEBIO) do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Todos os animais foram mantidos em ambiente adequado com temperatura e luminosidade controladas, alimentados com ração e água à vontade. Todos os experimentos foram realizados no Laboratório de Hipertensão da UFMG.

5.2 Confeção e implante de cânulas-guia

As cânulas-guia (15 mm) foram confeccionadas a partir de agulhas hipodérmicas de aço inoxidável de 25 x 6 mm. As cânulas-guia foram encaixadas no suporte da torre do aparelho estereotáxico e implantadas bilateralmente em direção ao HDM, de forma que a extremidade inferior de cada cânula ficasse 1,7 mm acima do HDM. Os animais foram anestesiados com tribromoetanol (250 mg/Kg i.p suplementado quando necessário) e posicionados no aparelho estereotáxico. A barra incisora foi fixada 2,5 mm abaixo da linha interaural e, por meio de duas barras auriculares, a cabeça foi mantida em uma posição fixa. Após a assepsia da pele com álcool iodado, foi feita uma injeção subcutânea de anestésico local contendo vasoconstritor (cloridrato de lidocaína 2% + epinefina 1:200000) para evitar sangramentos. Então, foi realizada uma incisão mediana na pele e raspagem do tecido subcutâneo para exposição do crânio e localização do bregma. A partir do bregma, foi realizada a leitura dos parâmetros ântero-posterior, latero-lateral e dorso-ventral. Após a trepanação do crânio com o auxílio de uma broca esférica odontológica, as cânulas-guia foram implantadas de acordo com as coordenadas estabelecidas para o hipotálamo dorsomedial pelo Atlas de Paxinos e Watson (1986). As coordenadas estereotáxicas utilizadas foram: -3,0 mm ântero-posterior, -0,6 mm látero-lateral e -8,7 mm

dorso-ventral em relação ao bregma. Posteriormente, as cânulas-guia foram fixadas através de um acrílico dental autopolimerizável e de pequenos parafusos inseridos na calota craniana. Um oclisor metálico de 15 mm foi introduzido em cada cânula-guia para evitar uma possível obstrução. Após a cirurgia, os animais receberam uma dose intramuscular de 0,2 ml de pentabiótico veterinário a título de profilaxia para possíveis infecções decorrentes da cirurgia. Foi também injetado 0,2 ml intramuscular do antiinflamatório Banamine. Ao final do procedimento cirúrgico, os animais foram mantidos em local aquecido até a recuperação da anestesia e, posteriormente, retornaram para o biotério do laboratório, sendo mantidos em caixas de polipropileno com água e comida à vontade por um período mínimo de 4 dias para recuperação.

5.3 Canulação da artéria e veia femoral

Um dia antes dos experimentos, foi realizada a canulação da artéria e da veia femoral. As cânulas foram confeccionadas a partir de um tubo de polietileno PE-10 (4 cm para a artéria e 2 cm para a veia) soldado por aquecimento a um tubo de polietileno PE-50 de 15 cm. Antes de serem implantadas, as cânulas foram preenchidas com solução salina (0,9%) e obstruídas na extremidade livre do PE-50 com alfinetes de metal. Nos animais anestesiados com tribromoetanol (250mg/Kg i.p. suplementado se necessário) as cânulas foram introduzidas na aorta abdominal, através da artéria femoral, e na veia femoral. Com o auxílio de um trocáter, as cânulas foram passadas pelo tecido subcutâneo até sua exteriorização na região interescapular. As incisões foram fechadas com pequenas suturas e, logo após, os animais foram levados para recuperação. Uma vez implantada, a cânula arterial foi utilizada para mensuração dos parâmetros cardiovasculares e a cânula venosa para administração sistêmica de drogas.

5.4 Registro simultâneo da resposta comportamental e dos parâmetros cardiovasculares

A resposta comportamental foi analisada pela mensuração da distância percorrida pelo animal logo após a administração de KCN ou após a microinjeção dos agonistas ionotrópicos NMDA e AMPA no HDM. Para isso, o animal foi colocado em uma caixa preta (35 x 50 cm) aproximadamente 1 hora antes do experimento. Após este período de adaptação o experimento foi filmado com auxílio de uma câmera de vídeo digital, que filma o animal apenas no plano superior. A digitalização da imagem foi feita com taxa de aquisição de quadros na frequência de 30 quadros por segundo, numa resolução de 240 x 320 pontos por quadro. No processamento intermediário da imagem foi feita a conversão das imagens coloridas (RGB) para preto e branco, seguida da aplicação de um filtro passa-baixa. O resultado é uma figura com o animal branco em um fundo preto. Feita a filmagem, o centro geométrico do animal foi determinado através de um aplicativo do programa MatLab 7.1, e este valor foi armazenado como sendo a posição do rato no instante em que foi tirada a foto. Dessa forma, foi calculada a posição do animal em cada um dos instantes referentes às várias fotos de todo o período filmado, pelo contraste dos pixels brancos e pretos. A distância percorrida pelo rato equivale ao somatório das distâncias euclidianas do centro geométrico, para cada par de fotos seqüenciais. Para o registro da pressão arterial e da frequência cardíaca, a cânula arterial previamente heparinizada (1:20) foi conectada a um transdutor de pressão ligado a um sistema de aquisição de dados analógico-digital (Biopac Systems MP 150). O software Acqknowledge 3.8.1 foi utilizado para o registro e visualização da pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC), mensurados pelo Biopac Systems, após previa calibração do equipamento. Esses parâmetros cardiovasculares foram continuamente registrados ao longo de todo o experimento.

5.5 Estimulação dos quimiorreceptores periféricos

Para a estimulação dos quimiorreceptores periféricos foi utilizada uma solução de cianeto de potássio (KCN 40 µg/0,1 ml/rato), que foi injetada pela cânula venosa previamente implantada. O cianeto de potássio (KCN) é descrito na literatura como um composto altamente eficaz para estimular os quimiorreceptores periféricos, interferindo na utilização tecidual de oxigênio, promovendo a inibição da enzima citocromo-oxidase, envolvida na cadeia respiratória. Como consequência, ocorre um déficit energético celular, associado à indisponibilidade de O₂, promovendo uma hipóxia citotóxica, levando à estimulação das células quimiossensíveis do corpúsculo carotídeo. Infere-se que o KCN estimula as células do corpúsculo carotídeo, semelhante à redução de pO₂, pois promove uma redução dos níveis de ATP (trifosfato de adenosina) nessas células (Gonzales e cols, 1994).

5.6 Drogas

- Cianeto de potássio (KCN): inibidor da citocromo oxidase – Sigma Chemical, St. Louis, MO.
- Acido D-2-amino-5-fosfopentanóico (AP-5): antagonista glutamatérgico NMDA - Sigma Chemical, St. Louis, MO.
- N-metil D-Aspartato (NMDA): agonista glutamatérgico NMDA - Sigma Chemical, St. Louis, MO.
- 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX): antagonista glutamatérgico não-NMDA - Sigma Chemical, St. Louis, MO.
- Ácido α-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiônico (AMPA): agonista glutamatérgico não-NMDA - Sigma Chemical, St. Louis, MO.

5.7 Procedimento de microinjeção no HDM

As drogas utilizadas foram dissolvidas em solução salina (NaCl 0,9%) e, quando necessário, o pH foi ajustado com bicarbonato de sódio (pH 7,0 – 7,4). As drogas foram injetadas no HDM utilizando-se uma seringa Hamilton de 5 µl, conectada por meio de um tubo de polietileno PE-10 à uma agulha injetora confeccionada a partir de agulhas gengivais 30 G. Para que as microinjeções pudessem atingir o HDM, o comprimento das agulhas injetoras foram 1,7 mm mais longo que o comprimento das cânulas-guia.

5.8 Perfusão e Histologia

Ao final de cada experimento, os animais foram anestesiados com Tiopental (120mg/kg i.v). Posteriormente, foi microinjetado 100 nl do corante Alcian Blue no HDM, para subsequente confirmação dos sítios das microinjeções. A seguir, os animais foram submetidos à abertura da região torácica a fim de expor o coração. Por meio de uma agulha introduzida no ventrículo esquerdo, os animais foram perfundidos com solução de formaldeído 10%. Para facilitar a perfusão cerebral, a aorta abdominal foi bloqueada com pinça hemostática e o átrio direito seccionado. 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 24-48 horas. Após esse período, foram feitos cortes transversais de 50 µm da região do hipotálamo em um micrótomo de congelamento. Esses cortes foram colocados em lâminas 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 (1986).

5.9 Análise estatística

Todos os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média ($\bar{x} \pm \text{epm}$). Na 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 (ANOVA) para medidas repetidas, seguido pelo teste de Dunnett. O nível de significância foi fixado em $p < 0,05$.

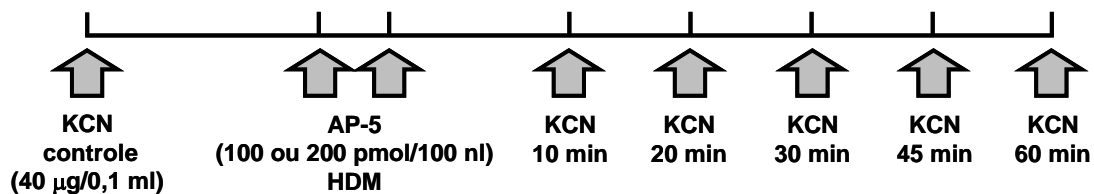
5.10 Procedimentos experimentais

Todos os procedimentos experimentais tiveram início após a estabilização dos parâmetros cardiovasculares para mensuração dos valores basais da pressão arterial e frequência cardíaca.

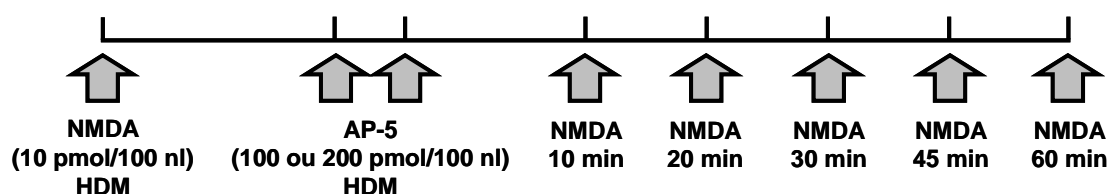
Protocolo 1: Efeito do bloqueio dos receptores NMDA do HDM sobre as respostas cardiovasculares e comportamental do quimiorreflexo

Com o objetivo de avaliar a participação dos receptores NMDA do HDM na integração das respostas cardiovasculares e comportamentais induzidas pela estimulação dos quimiorreceptores periféricos, o antagonista AP-5 foi microinjetado bilateralmente no HDM, e o quimiorreflexo estimulado antes e após esta microinjeção. Para isso, foram utilizados animais previamente submetidos ao implante bilateral de cânulas-guia em direção ao HDM 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 i.v de KCN (40 $\mu\text{g}/0,1 \text{ ml}$). As alterações cardiovasculares do quimiorreflexo foram avaliadas como sendo o pico da resposta pressora e bradicárdica e a resposta comportamental foi avaliada como sendo a atividade

locomotora medida pela distância percorrida pelo animal durante o quimiorreflexo. Após o retorno da pressão arterial, frequência cardíaca e resposta comportamental aos valores basais, o antagonista dos receptores NMDA, o AP-5 (100 ou 200 pmol/100 nl) foi microinjetado bilateralmente no HDM. Dez, 20, 30, 45 e 60 minutos após a microinjeção do antagonista, o quimiorreflexo foi novamente testado com KCN e essas respostas foram comparadas com a primeira, isto é, com as respostas cardiovasculares e comportamental do quimiorreflexo antes da microinjeção do AP-5. Esse protocolo ocorreu da seguinte forma:

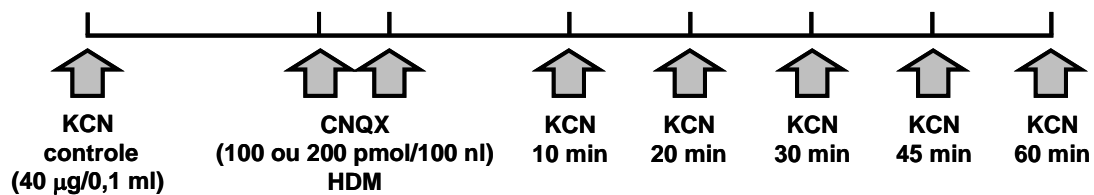


Em grupos experimentais diferentes também foi avaliado se as doses de 100 ou 200 pmol/100 nl de AP-5 foram eficazes em abolir as respostas cardiovasculares e comportamental induzidas pela microinjeção do agonista NMDA (10 pmol/100 nl) no HDM. Para isso o agonista NMDA foi microinjetado antes e após a microinjeção ipsilateral do antagonista AP-5 no HDM. As alterações cardiovasculares do NMDA também foram avaliadas como sendo o pico da resposta pressora e taquicárdica e a resposta comportamental como sendo a atividade locomotora medida pela distância percorrida pelo animal após a microinjeção do agonista no HDM. Esse protocolo ocorreu da seguinte forma:

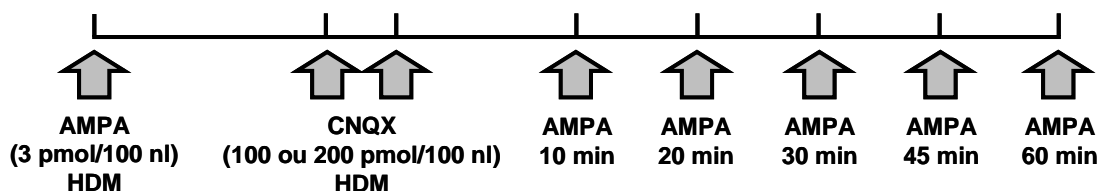


Protocolo 2: Efeito do bloqueio dos receptores não-NMDA do HDM sobre as respostas cardiovasculares e comportamental do quimiorreflexo

Para avaliar a participação dos receptores não-NMDA do HDM na integração das respostas cardiovasculares e comportamentais do quimiorreflexo, o antagonista CNQX (100 ou 200 pmol/100 nl) foi microinjetado bilateralmente no HDM, e o quimiorreflexo estimulado com KCN (40 µg/0,1 ml) antes e 10, 20, 30, 45 e 60 minutos após a microinjeção do antagonista. Esse protocolo ocorreu da seguinte forma:

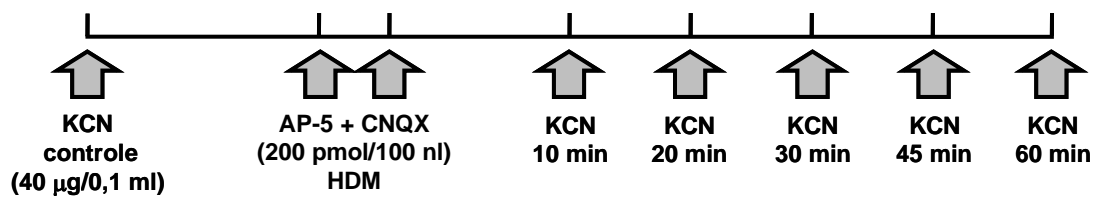


Também foi avaliado, em grupos experimentais diferentes, se as doses utilizadas do antagonista CNQX (100 e 200 pmol/100 nl) foram eficazes em abolir as respostas cardiovascular e comportamental induzidas pelo agonista AMPA (3 pmol/100 nl) microinjetado no HDM. Para esta avaliação, o agonista AMPA foi microinjetado antes e após a microinjeção ipsilateral do antagonista CNQX no HDM. Esse protocolo ocorreu da seguinte forma:



Protocolo 3: Efeito do bloqueio conjunto dos receptores NMDA e não-NMDA do HDM sobre as respostas cardiovasculares e comportamental do quimiorreflexo

Para avaliar o efeito do duplo bloqueio dos receptores NMDA e não-NMDA do HDM sobre as respostas cardiovasculares e comportamentais do quimiorreflexo, uma mistura de AP-5 + CNQX (200 pmol/100 nl) foi microinjetada bilateralmente no HDM. O quimiorreflexo foi estimulado (KCN 40 µg/0,1 ml) antes e 10, 20, 30, 45 e 60 minutos após a microinjeção dos antagonistas no HDM. Esse protocolo ocorreu da seguinte forma:



6 RESULTADOS

6.1 Efeito do bloqueio dos receptores NMDA do HDM sobre as respostas cardiovasculares e comportamental do quimiorreflexo

Traçados típicos de dois animais representativos dos grupos estudados são mostrados na figura 1. Nestes traçados observamos as alterações na pressão arterial pulsátil (PAP, mmHg), pressão arterial média (PAM, mmHg) e frequência cardíaca (FC, bpm) induzidas pela estimulação do quimiorreflexo com KCN (40 µg/0,1 ml, i.v.) em ratos não-anestesiados, antes e após (10, 20, 30, 45 e 60 minutos) a microinjeção bilateral de AP-5 no HDM, nas doses de 100 pmol/100 nl (figura 1A) e 200 pmol/100 nl (figura 1B). As setas indicam o momento da injeção i.v. de KCN. Como pode ser observado, a estimulação dos quimiorreceptores periféricos com KCN promoveu resposta pressora e intensa bradicardia, como já descrito por Franchini e Krieger (1993). A microinjeção bilateral do AP-5 (100 ou 200 pmol/100 nl) no HDM não modifica essas respostas.

Os dados obtidos nestes grupos experimentais são mostrados nas figuras 2 e 3, onde se observa que a microinjeção bilateral do antagonista AP-5 no HDM, na dose de 100 pmol/100 nl ($n = 8$), não promoveu alterações significativas sobre as respostas pressora, bradicárdica e comportamental do quimiorreflexo (figura 2A). Por outro lado, observamos que 10 min após a microinjeção do AP-5 na dose de 100 pmol/100nl as respostas pressora ($+21 \pm 2$ vs $+10 \pm 3$ mmHg), taquicárdica ($+138 \pm 14$ vs $+74 \pm 25$ bpm) e comportamental (348 ± 106 vs. 48 ± 27 cm) induzidas pelo agonista NMDA ($n = 5$) microinjetado ipsilateralmente ao antagonista foram reduzidas (figura 2B).

A microinjeção bilateral de AP-5 na dose de 200 pmol/100 nl ($n = 4$) no HDM também não produziu alterações sobre as respostas cardiovasculares e comportamental do quimiorreflexo em nenhum dos tempos analisados (figura 3A). Entretanto, esta mesma dose do AP-5 (200 pmol/100 nl) promoveu redução significativa, em todos os tempos analisados, das respostas pressora ($+22 \pm 2$ vs. $+2 \pm 1$, $+1 \pm 1$, $+4 \pm 2$, $+4 \pm 1$ e $+2 \pm 1$

mmHg), taquicárdica ($+114 \pm 7$ vs. $+8 \pm 5$, $+10 \pm 6$, $+45 \pm 20$, $+49 \pm 20$ e $+25 \pm 12$ bpm) e comportamental (425 ± 67 vs. 0 ± 0 , 15 ± 5 , 5 ± 5 , 10 ± 10 e 1 ± 1 cm) induzidas pelo agonista NMDA ($n = 6$) microinjetado ipsilateralmente ao antagonista AP-5 (figura 3B).

Com relação aos parâmetros cardiovasculares basais, a microinjeção do AP-5 (100 pmol/100 nl) no HDM ($n = 8$) não produziu alterações significativas sobre os parâmetros cardiovasculares basais (115 ± 3 vs 114 ± 3 mmHg e 400 ± 11 vs 412 ± 20 bpm) (figura 4A). De forma semelhante, o AP-5 na dose de 200 pmol/100 nl ($n = 4$) também não promoveu mudanças sobre esses parâmetros (112 ± 5 vs 111 ± 4 mmHg e 433 ± 26 vs 420 ± 30 bpm); (figura 4B).

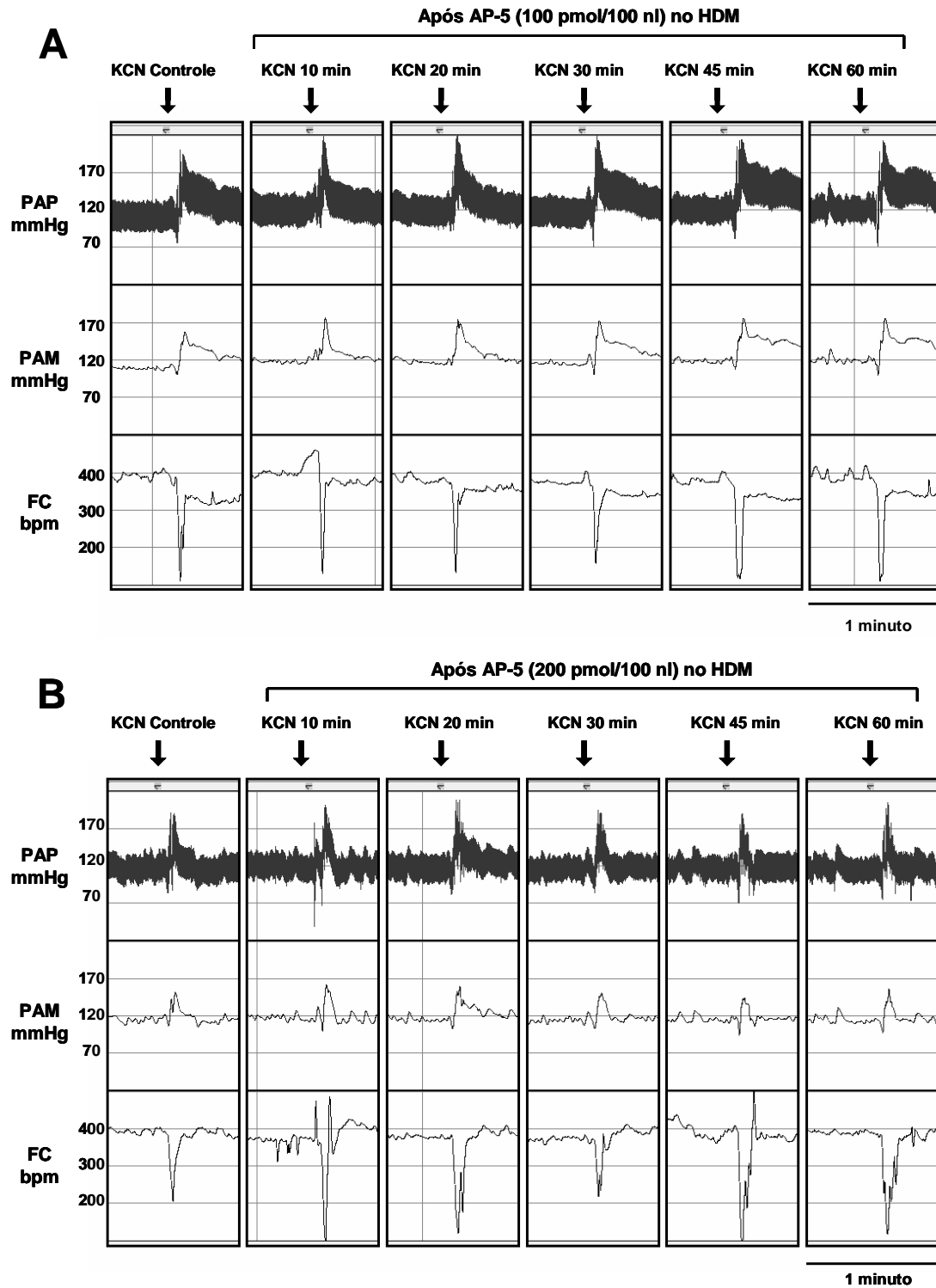


FIGURA 1: Traçados típicos representativos de dois animais dos grupos estudados mostrando as alterações na pressão arterial pulsátil (PAP, mmHg), pressão arterial média (PAM, mmHg) e frequência cardíaca (FC, bpm), induzidas pela estimulação do quimiorreflexo com KCN ($40 \mu\text{g}/0,1 \text{ ml}$, i.v.), antes (controle) e 10, 20, 30, 45 e 60 minutos após a microinjeção bilateral de AP-5 no HDM, nas doses de **(A)** $100 \text{ pmol}/100 \text{ nl}$ e **(B)** $200 \text{ pmol}/100 \text{ nl}$. As setas indicam o momento da injeção i.v. de KCN.

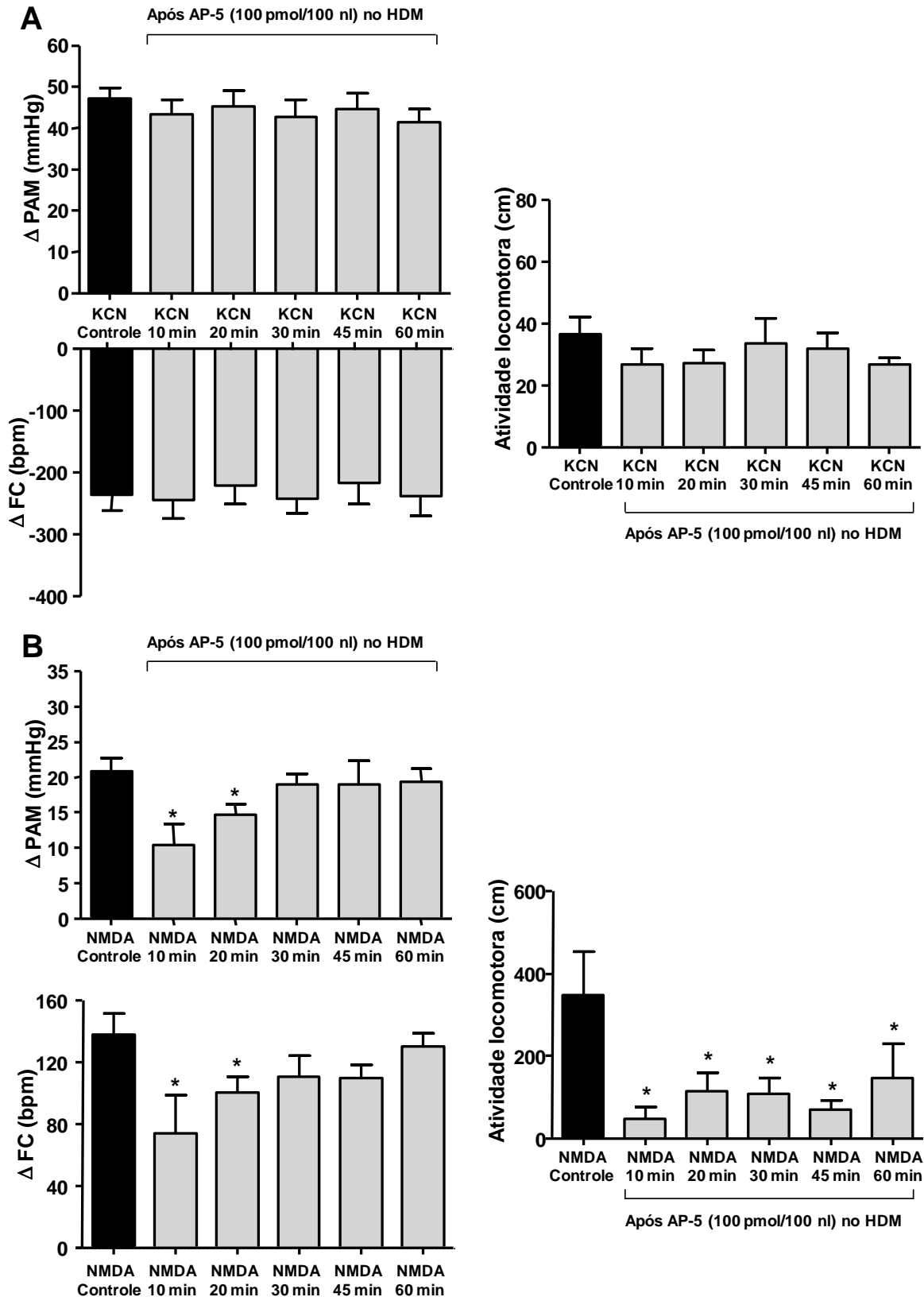


FIGURA 2: Alterações na pressão arterial média (Δ PAM, mmHg), frequência cardíaca (Δ FC, bpm) e atividade locomotora (cm), induzidas pela: **(A)** estimulação do quimiorreflexo com KCN (40 μ g/0,1 ml, i.v.) ($n = 8$) ou **(B)** microinjeção do agonista NMDA (3 pmol/100nl) no HDM ($n = 5$), antes (controle) e após a microinjeção bilateral de AP-5 (100 pmol/100 nl) no HDM. (*) $P < 0,05$; One-Way ANOVA, pós teste de Dunnett.

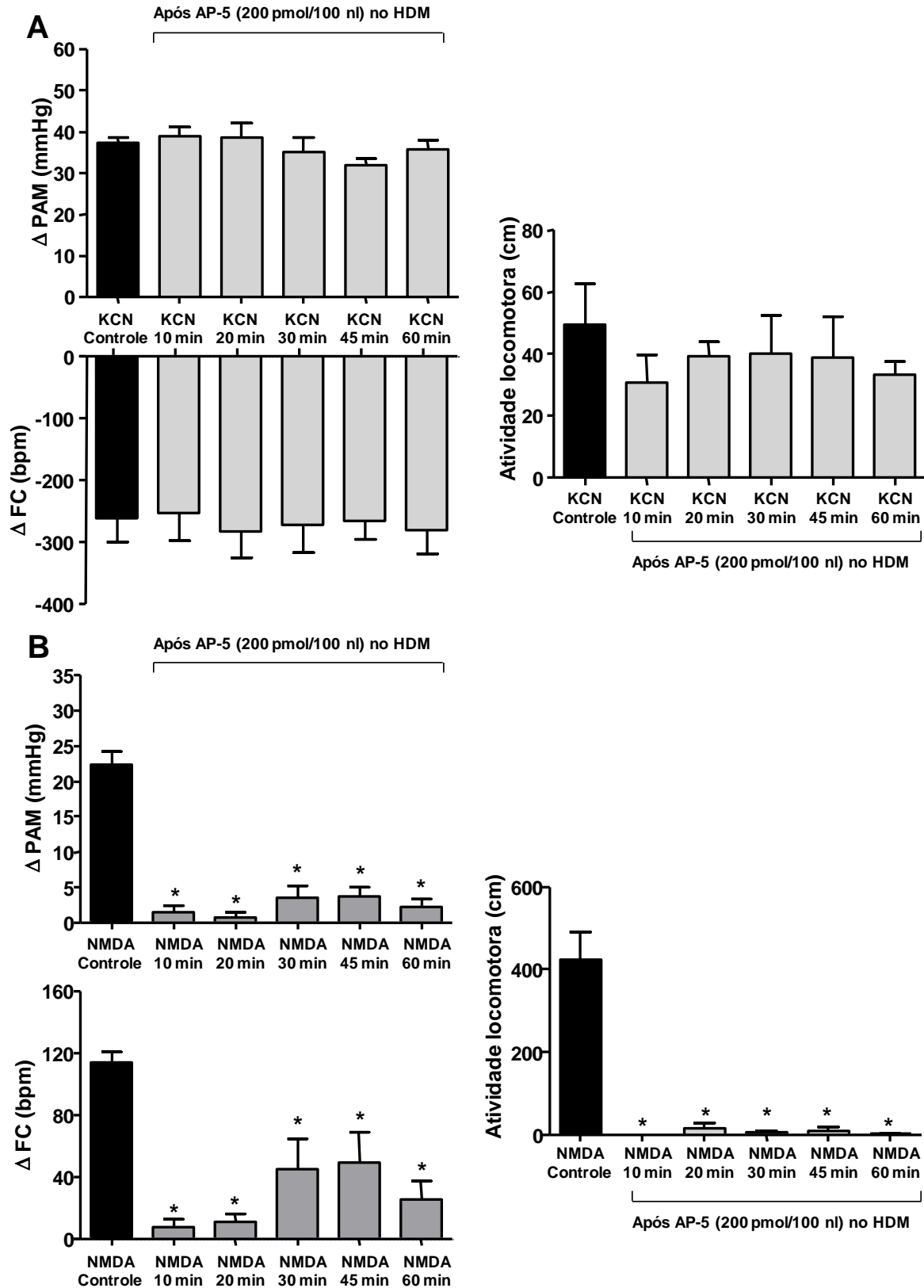


FIGURA 3: Alterações na pressão arterial média (Δ PAM, mmHg), frequência cardíaca (Δ FC, bpm) e atividade locomotora (cm), induzidas pela: **(A)** estimulação do quimiorreflexo com KCN (40 μ g/0,1 ml, i.v.) (n = 4) ou **(B)** microinjeção do agonista NMDA (3 pmol/100nl) no HDM (n = 6), antes (controle) e após a microinjeção bilateral de AP-5 (200 pmol/100 nl) no HDM. (*) $P < 0,05$; One-Way ANOVA, pós teste de Dunnett.

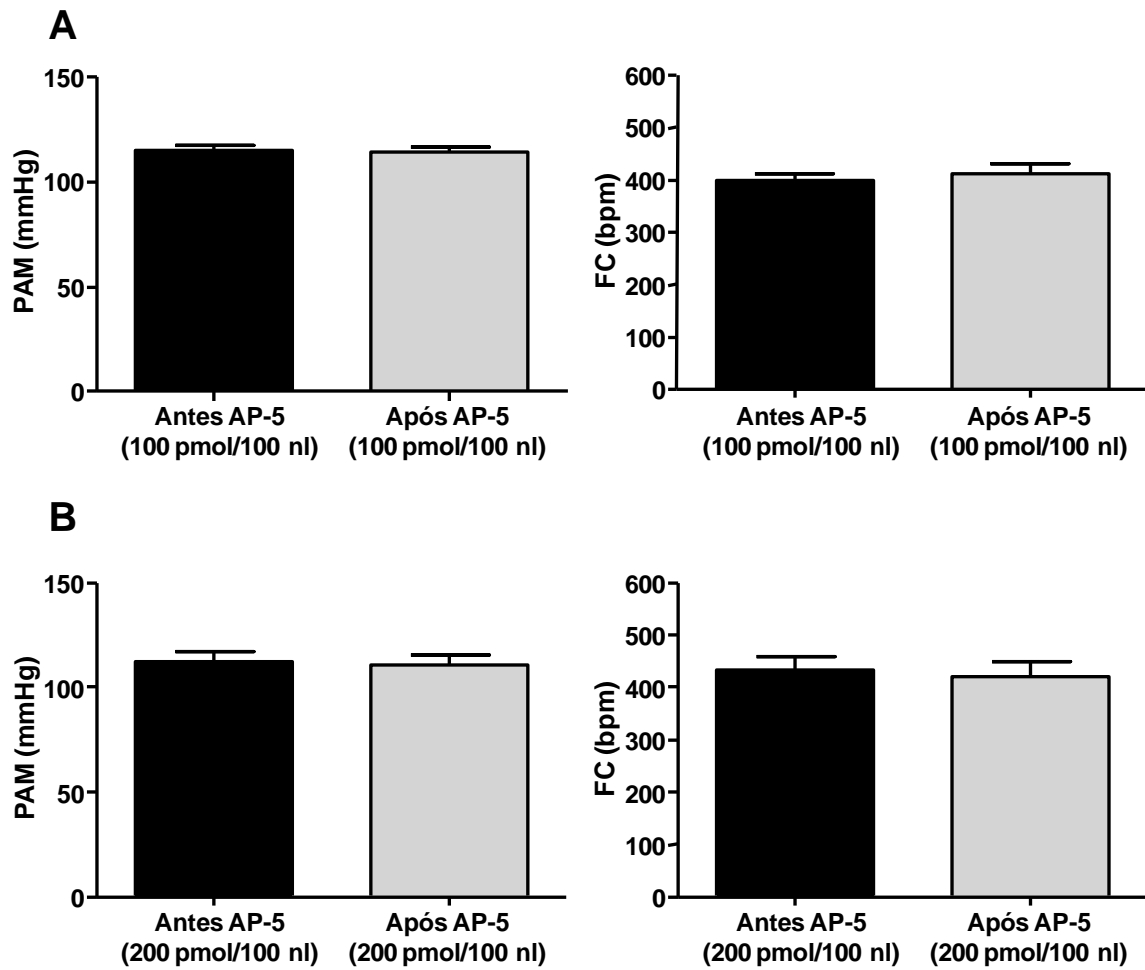


FIGURA 4: Valores basais de pressão arterial média (PAM, mmHg) e frequência cardíaca (FC, bpm) antes e após a microinjeção bilateral de AP-5 no HDM nas doses de: **(A)** 100 pmol/100 nl ($n = 8$) e **(B)** 200 pmol/100 nl ($n = 4$). $P > 0,05$; test t de Student pareado.

6.2 Efeito do bloqueio dos receptores não-NMDA do HDM sobre as respostas cardiovasculares e comportamental do quimiorreflexo

Traçados típicos de dois animais representativos dos grupos estudados são mostrados na figura 5. Os traçados mostram as alterações na PAP, PAM e FC induzidas pela estimulação do quimiorreflexo com KCN (40 μg /0,1 ml, i.v.) em ratos não-anestesiados, antes, 10, 20, 30, 45 e 60 minutos após a microinjeção bilateral de CNQX, nas doses de 100 e 200 pmol/100 nl, no HDM. As setas indicam o momento da injeção i.v. de KCN. Como esperado, a estimulação dos quimiorreceptores periféricos com KCN promoveu respostas pressora e bradicárdica, as quais foram mantidas mesmo após a microinjeção bilateral do antagonista CNQX.

Os dados obtidos nestes grupos experimentais estão representados nas figuras 6 e 7. Podemos observar que a microinjeção bilateral de CNQX, na dose de 100 pmol/100 nl, no HDM (n = 5) não promoveu alterações significativas na magnitude das respostas pressora, bradicárdica e comportamental do quimiorreflexo em nenhum dos tempos analisados (figura 6A, tabela 6). Entretanto, essa mesma dose de CNQX (100 pmol/100 nl) reduziu aos 10 e 20 min as respostas pressora ($+20 \pm 2$ vs. $+5 \pm 2$, $+11 \pm 2$ mmHg), taquicárdica ($+112 \pm 5$ vs. $+39 \pm 17$, $+80 \pm 13$ bpm) e comportamental (424 ± 70 vs. 11 ± 6 , 118 ± 39 cm) induzidas pela microinjeção ipsilateral do agonista AMPA no HDM (n = 6) (figura 6B).

De forma semelhante, a microinjeção de CNQX no HDM na dose de 200 pmol/100 nl foi capaz de reduzir significativamente as respostas pressora ($+28 \pm 4$ vs. $+1 \pm 1$, $+8 \pm 3$ e $+12 \pm 3$ mmHg), taquicárdica ($+90 \pm 9$ vs. $+1 \pm 1$, $+34 \pm 10$ e $+56 \pm 11$ bpm) e comportamental (327 ± 87 vs. 0 ± 0 , 4 ± 4 e 62 ± 45 cm) induzidas pelo AMPA (n = 6) (figura 7B), porém não modificou as respostas cardiovasculares e comportamental do quimiorreflexo em nenhum dos tempos analisados (figura 7A).

Assim como observado nas respostas cardiovasculares do quimiorreflexo, a microinjeção de CNQX (100 pmol/100 nl) no HDM (n = 5) também não produziu alterações nos parâmetros cardiovasculares basais de pressão arterial média ou de frequência cardíaca (figura 8A). A microinjeção do CNQX na dose de 200 pmol/100 nl (n = 5) também não promoveu mudanças sobre esses parâmetros (figura 8B).

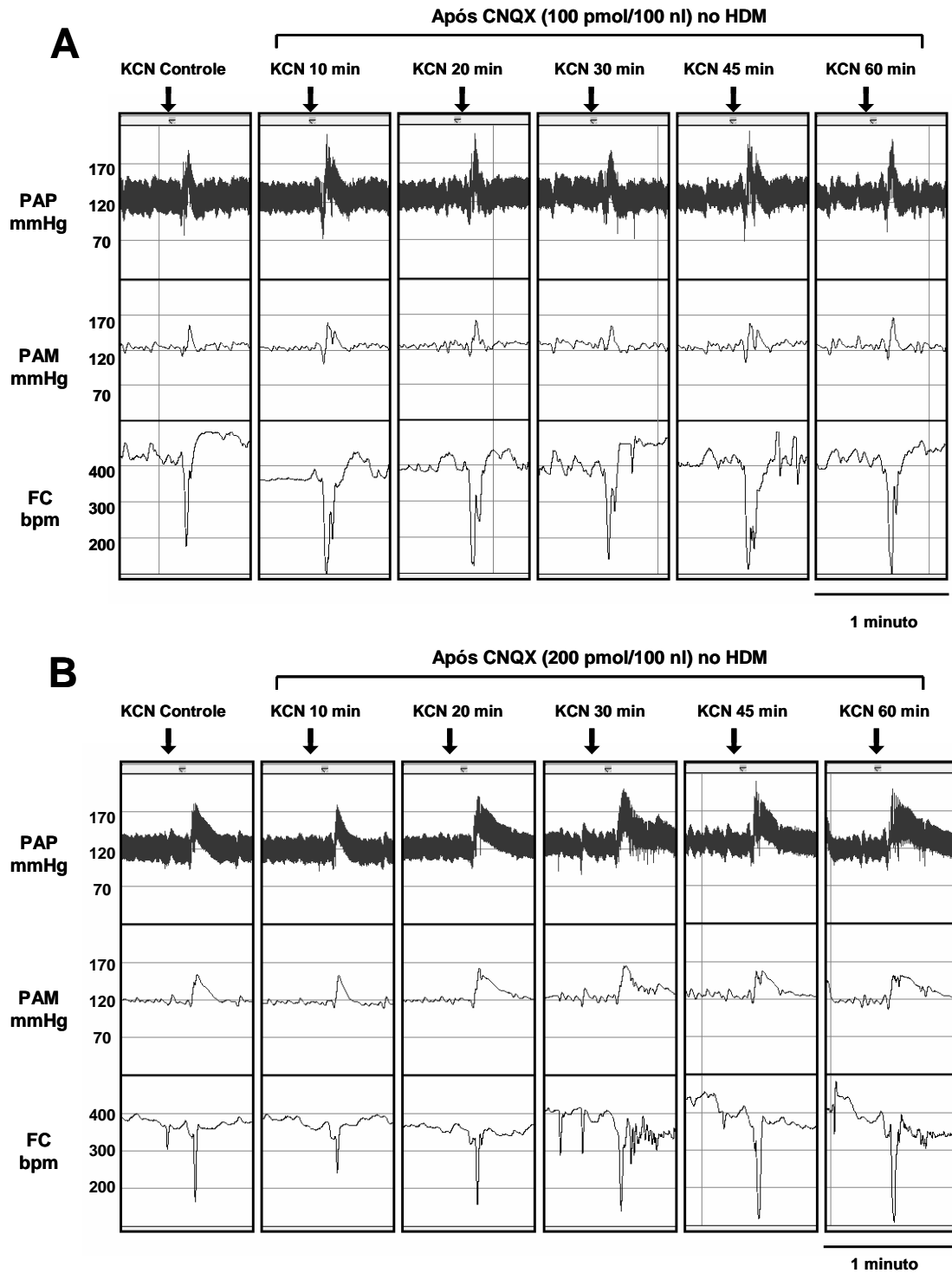


FIGURA 5: Traçados típicos representativos de dois animais dos grupos estudados mostrando as alterações na pressão arterial pulsátil (PAP, mmHg), pressão arterial média (PAM, mmHg) e frequência cardíaca (FC, bpm), induzidas pela estimulação do quimiorreflexo com KCN (40 μ g/0,1 ml, i.v.), antes, 10, 20, 30, 45 e 60 minutos após a microinjeção bilateral de CNQX no HDM, nas doses de **(A)** 100 pmol/100 nl e **(B)** 200 pmol/100 nl. As setas indicam o momento da injeção i.v. de KCN.

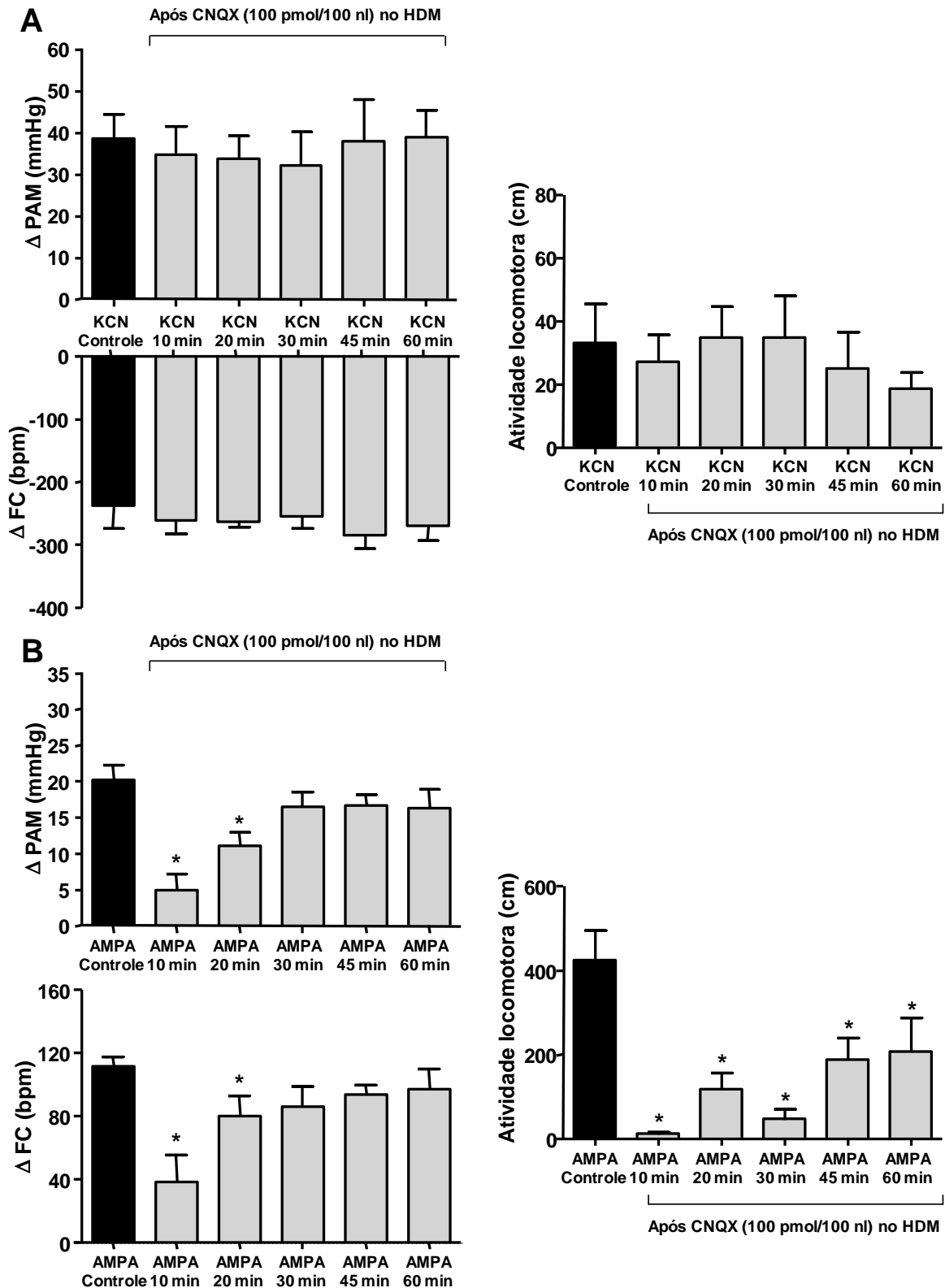


FIGURA 6: Alterações na pressão arterial média (Δ PAM, mmHg), frequência cardíaca (Δ FC, bpm) e atividade locomotora (cm), induzidas pela: **(A)** estimulação do quimiorreflexo com KCN (40 μ g/0,1 ml, i.v.) (n = 5) ou **(B)** pela microinjeção do agonista AMPA (1 pmol/100 nl) no HDM (n = 6), antes (controle) e após a microinjeção bilateral de CNQX (100 pmol/100 nl) no HDM. (*) $P < 0,05$, One-Way ANOVA, pós teste de Dunnett.

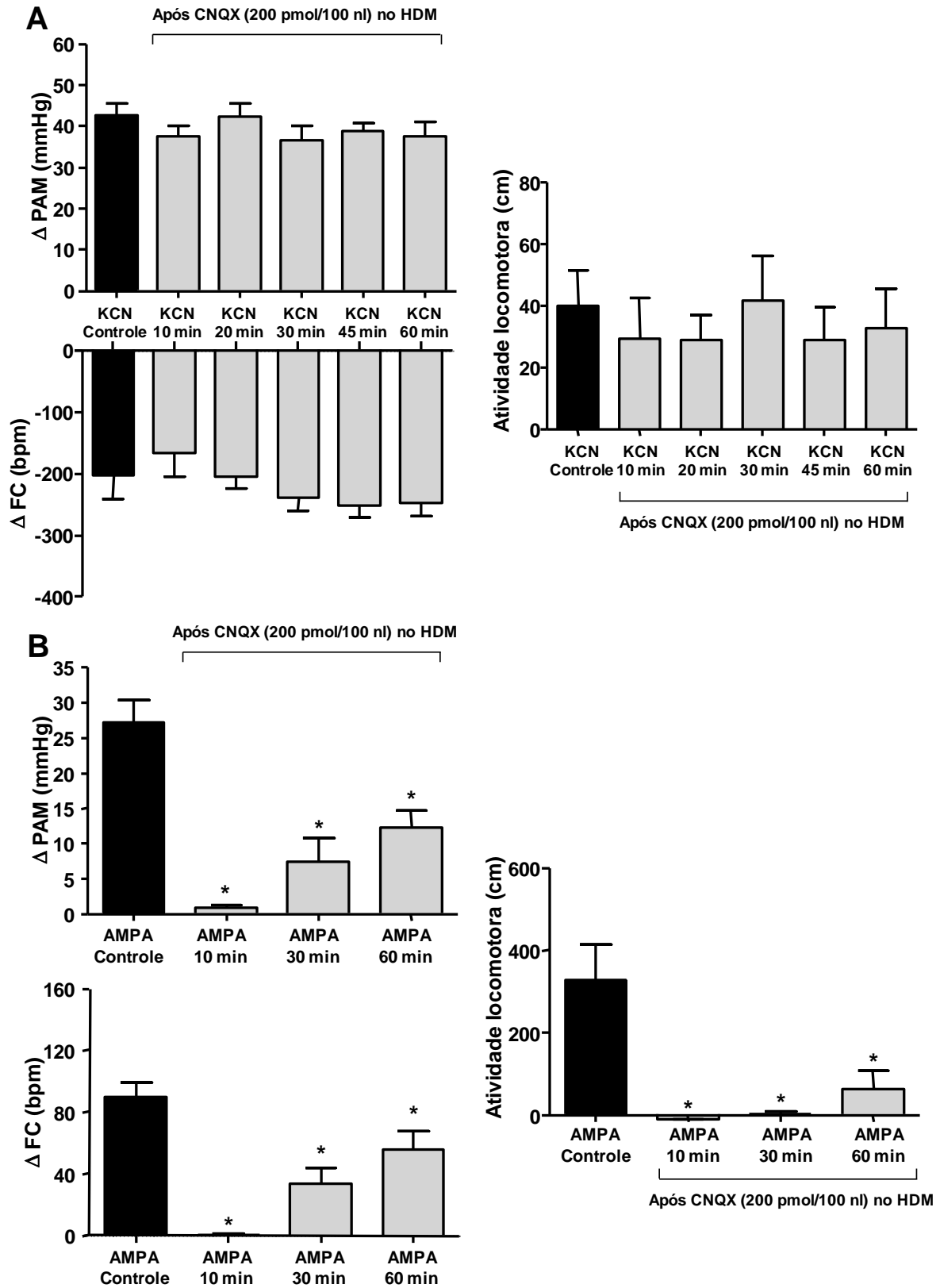


FIGURA 7: Alterações na pressão arterial média (Δ PAM, mmHg), frequência cardíaca (Δ FC, bpm) e atividade locomotora (cm), induzidas pela: **(A)** estimulação do quimiorreflexo com KCN (40 μ g/0,1 ml, i.v.) (n = 5) ou **(B)** pela microinjeção do agonista AMPA (1 pmol/100 nl) no HDM (n = 6), antes (controle) e após a microinjeção bilateral de CNQX (100 pmol/100 nl) no HDM. (*) $P < 0,05$, One-Way ANOVA, pós teste de Dunnett.

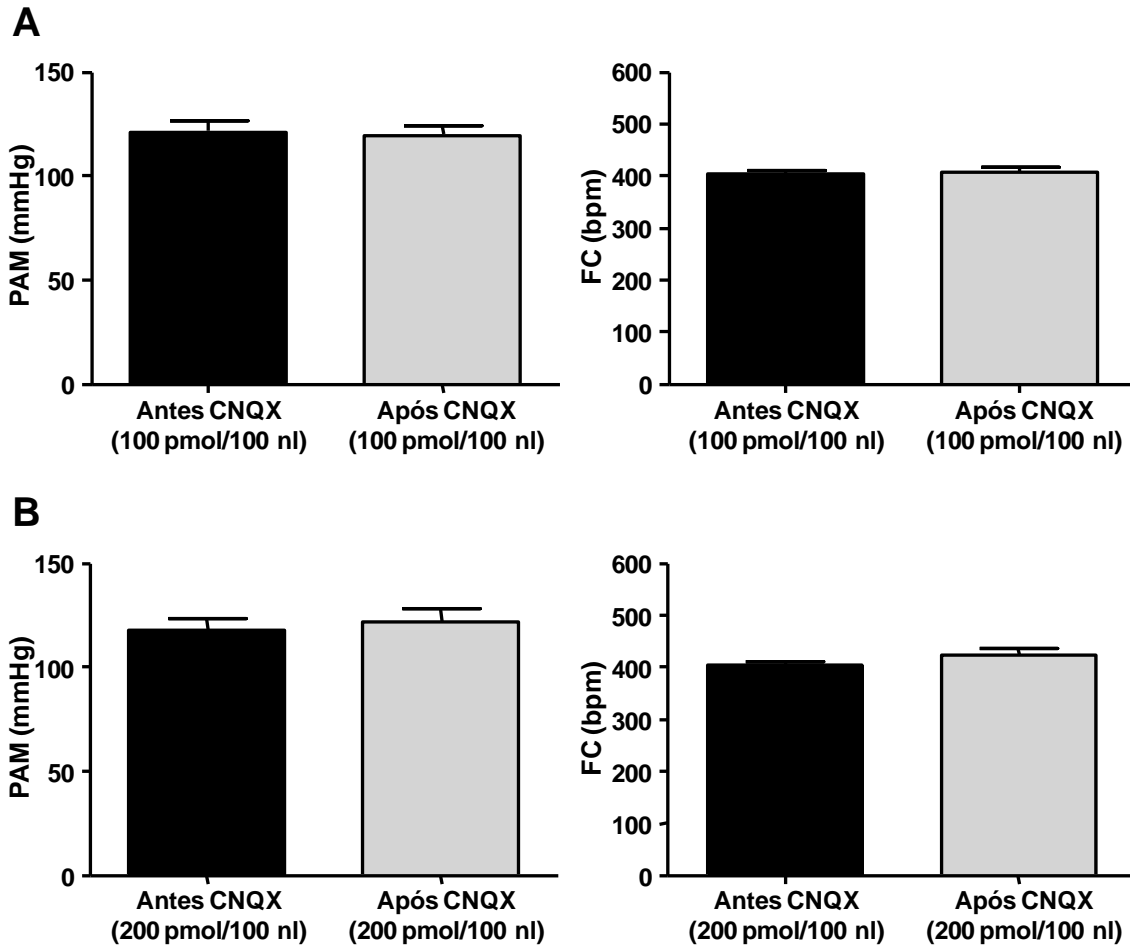


FIGURA 8: Valores basais de pressão arterial média (PAM, mmHg) e frequência cardíaca (FC, bpm) antes (controle) e após a microinjeção bilateral de CNQX no HDM, nas doses de **(A)** 100 pmol/100 nl (n = 5) e **(B)** 200 pmol/100 nl (n = 5). $P > 0,05$, test t de Student pareado.

6.3 Efeito do bloqueio conjunto dos receptores NMDA e não-NMDA do HDM sobre as respostas cardiovasculares e comportamental do quimiorreflexo

Uma vez que: a) o bloqueio seletivo e isolado dos receptores NMDA ou não-NMDA do HDM não produziu alterações sobre as respostas cardiovasculares e comportamental do quimiorreflexo, b) estudos anteriores mostram que o ácido kinurênico reduz as respostas do quimiorreflexo (Queiroz e cols., 2011) e c) o ácido kinurênico pode atuar em receptores nicotínicos (Stone, 2007), foi realizado outro protocolo para bloquear simultaneamente os receptores NMDA e não-NMDA do HDM utilizando os antagonistas seletivos, AP-5 e CNQX. Para isso, uma mistura de AP-5 e CNQX (200 pmol/100 nl) foi microinjetada bilateralmente no HDM e o quimiorreflexo estimulado antes e após esta microinjeção.

Um traçado típico de um animal representativo do grupo estudado é mostrado na figura 9. Podemos observar as alterações na PAP, PAM e FC induzidas pela estimulação do quimiorreflexo com KCN (40 µg /0,1 ml, i.v.) antes, 10, 20, 30, 45 e 60 minutos após a microinjeção bilateral de AP-5 + CNQX (200 pmol/100 nl) no HDM. As setas indicam o momento da injeção i.v. de KCN. Como esperado, a estimulação dos quimiorreceptores periféricos com KCN promoveu respostas pressora e bradicárdica. A microinjeção bilateral da mistura AP-5 + CNQX no HDM promoveu redução da resposta pressora, porém não modificou a bradicardia quimiorreflexa (figura 9).

Os dados obtidos neste grupo experimental estão representados na figura 10, onde podemos observar que a microinjeção bilateral de AP-5 + CNQX no HDM (n = 4) reduziu em 45% a magnitude da resposta pressora ($+38 \pm 4$ vs $+21 \pm 5$ mmHg) e em 80% a magnitude da resposta comportamental (40 ± 14 vs. 8 ± 5 cm) do quimiorreflexo. A resposta bradicárdica não foi alterada em nenhum dos tempos analisados (10, 20, 30, 45 e 60 min após a microinjeção dos antagonistas no HDM) (figura 10A).

Os efeitos dos antagonistas AP-5 + CNQX sobre o quimiorreflexo foram restritos ao HDM, uma vez que a microinjeção desses antagonistas em áreas adjacentes ao HDM (n = 4) não promoveu alterações significativas sobre nenhum dos parâmetros da resposta quimiorreflexa analisados (figura 10B).

A microinjeção da mistura de AP-5 + CNQX (200 pmol/100 nl) no HDM ou em áreas adjacentes ao HDM não produziu alterações significativas sobre os parâmetros cardiovasculares basais de pressão arterial média ou de frequência cardíaca, como pode ser observado na figura 11 (painel A e B, respectivamente).

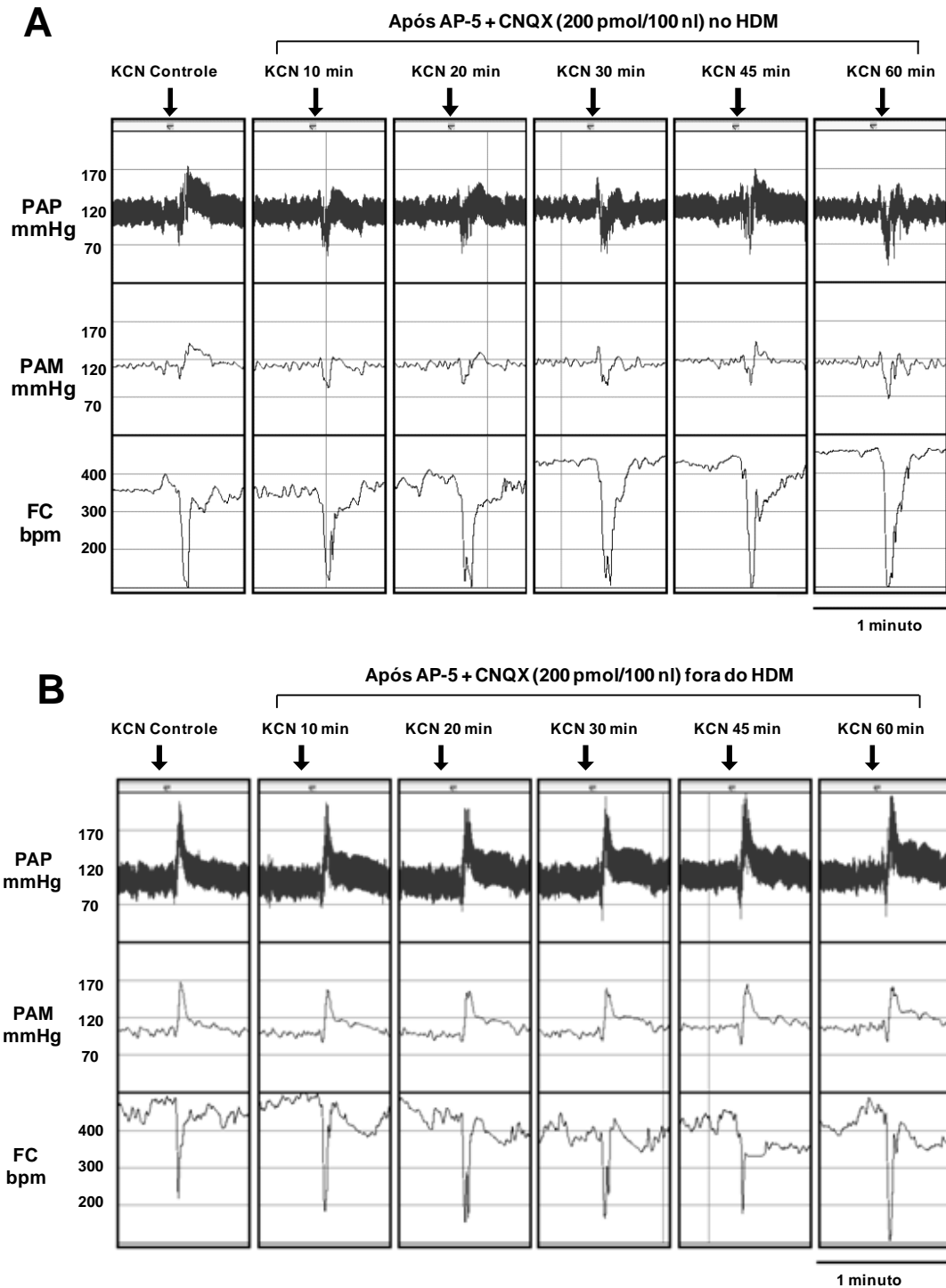


FIGURA 9: Traçados típicos representativos de dois animais dos grupos estudados mostrando as alterações na pressão arterial pulsátil (PAP, mmHg), pressão arterial média (PAM, mmHg) e frequência cardíaca (FC, bpm), induzidas pela estimulação do quimiorreflexo com KCN (40 μ g/0,1 ml, i.v.), antes, 10, 20, 30, 45 e 60 minutos após a microinjeção bilateral da mistura de AP-5 + CNQX (200 pmol/100 nl) **(A)** no HDM e **(B)** em áreas adjacentes ao HDM. As setas indicam o momento da injeção i.v. de KCN.

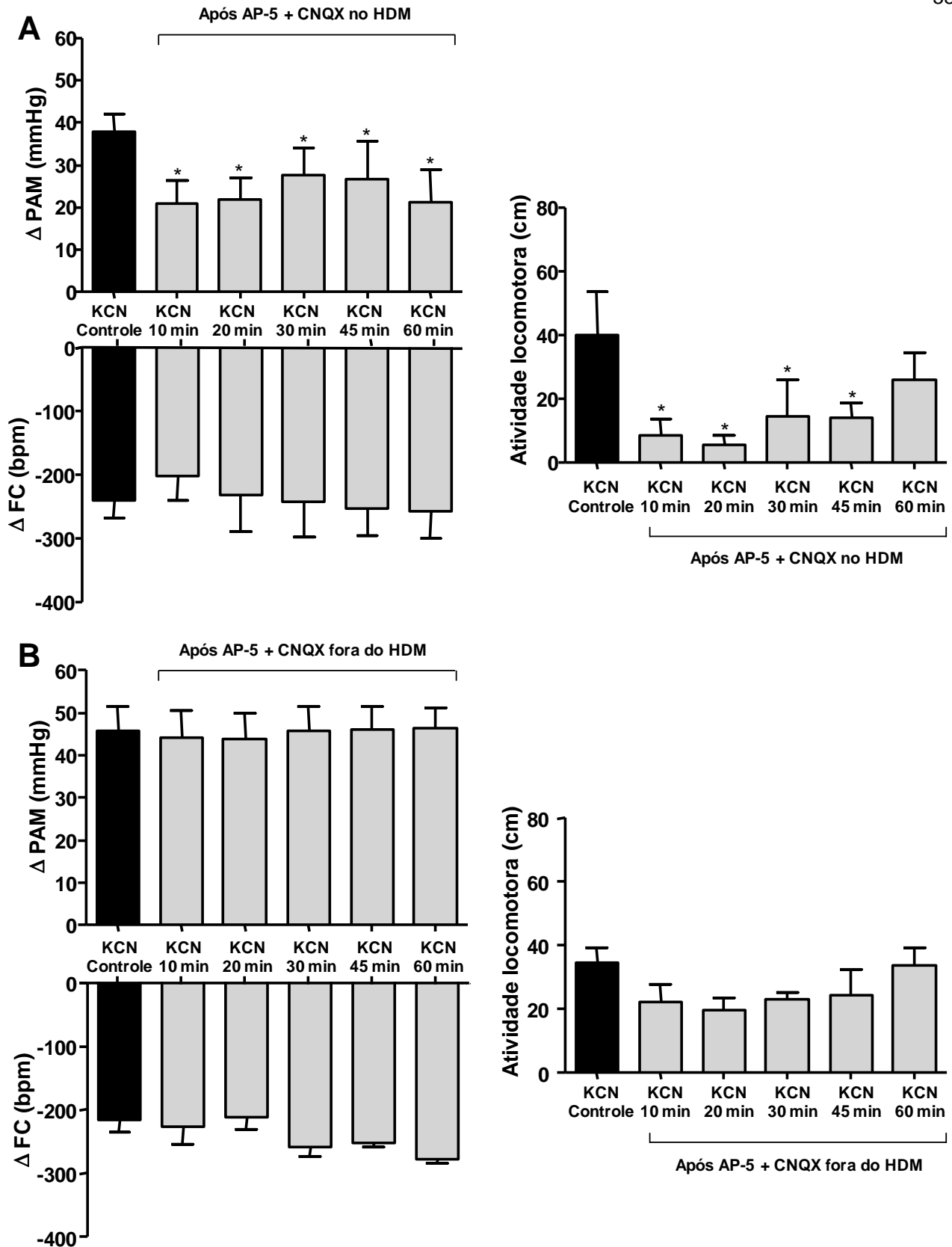


FIGURA 10: Alterações na pressão arterial média (Δ PAM, mmHg), frequência cardíaca (Δ FC, bpm) e atividade locomotora (cm), induzidas pela estimulação do quimiorreflexo com KCN (40 μ g/0,1 ml, i.v.), antes (controle), 10, 20, 30, 45 e 60 minutos após a microinjeção bilateral da mistura de AP-5 + CNQX (200 pmol/100 nl): **(A)** no HDM (n = 4) e **(B)** em áreas adjacentes ao HDM (n = 4). (*) $P < 0,05$, One-Way ANOVA, pós teste de Dunnett.

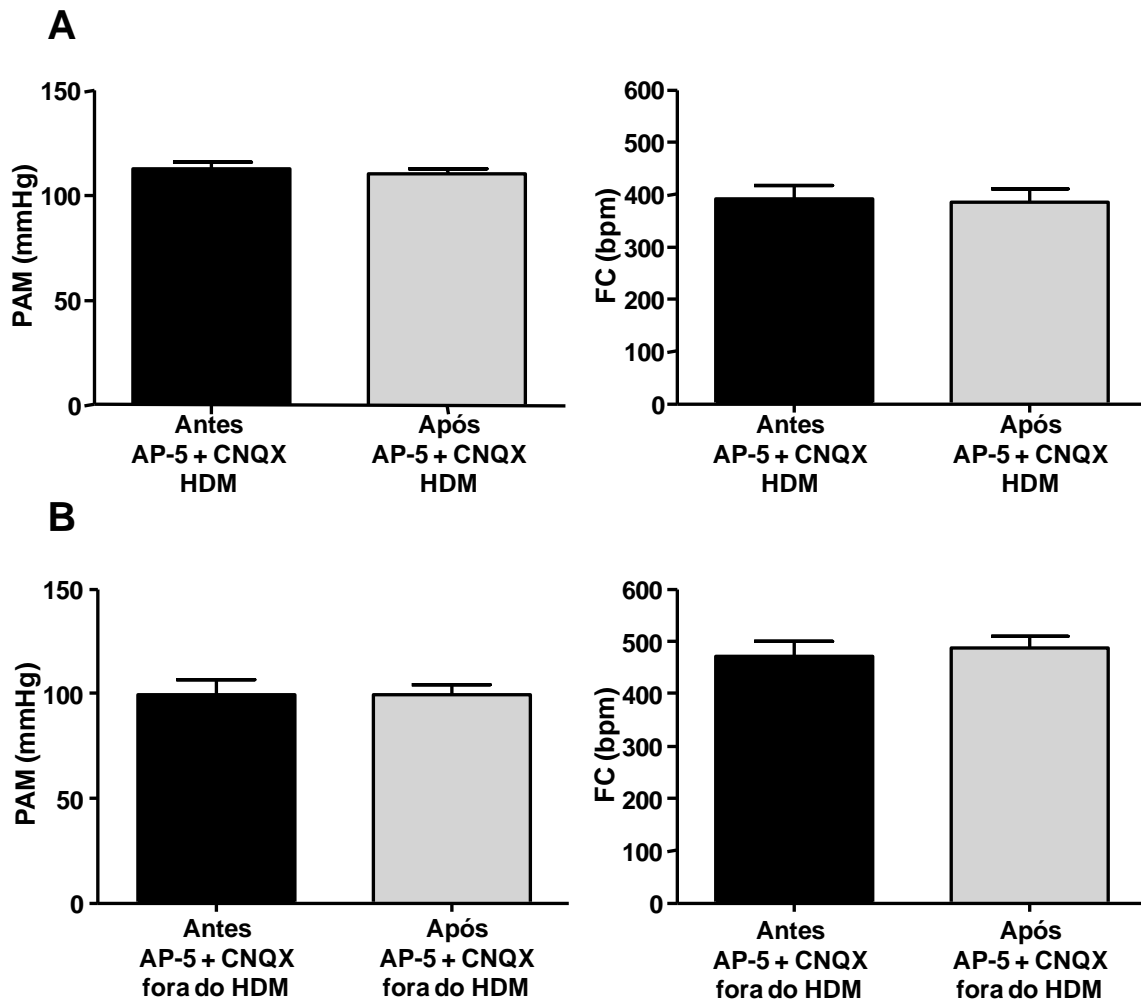


FIGURA 11: Valores basais de pressão arterial média (PAM, mmHg) e frequência cardíaca (FC, bpm) antes e após a microinjeção bilateral da mistura de AP-5 + CNQX (200 pmol/100 nl): **(A)** no HDM (n = 4) e **(B)** em áreas adjacentes ao HDM (n = 4), $P > 0,05$, test t de Student pareado.

6.4 Análise histológica

A figura apresentada a seguir (figura 12) corresponde à fotomicrografia de uma secção transversal do cérebro de um animal representativo do grupo estudado, mostrando a localização da microinjeção do corante Alcian Blue. O painel B da figura 12 mostra um sítio típico de microinjeção no HDM. Pode-se observar que o HDM está situado adjacente ao terceiro ventrículo, dorsal ao núcleo ventromedial e ventral à zona incerta. O painel A corresponde à representação esquemática de um corte transversal do cérebro de rato correspondente ao sítio de microinjeção no HDM da fotomicrografia.

A figura 13 corresponde à representação esquemática de uma sequência de cortes transversais do hipotálamo, mostrando os centros das microinjeções no HDM (círculos pretos) ou em áreas adjacentes ao HDM (círculos brancos) de todos os animais considerados neste estudo.

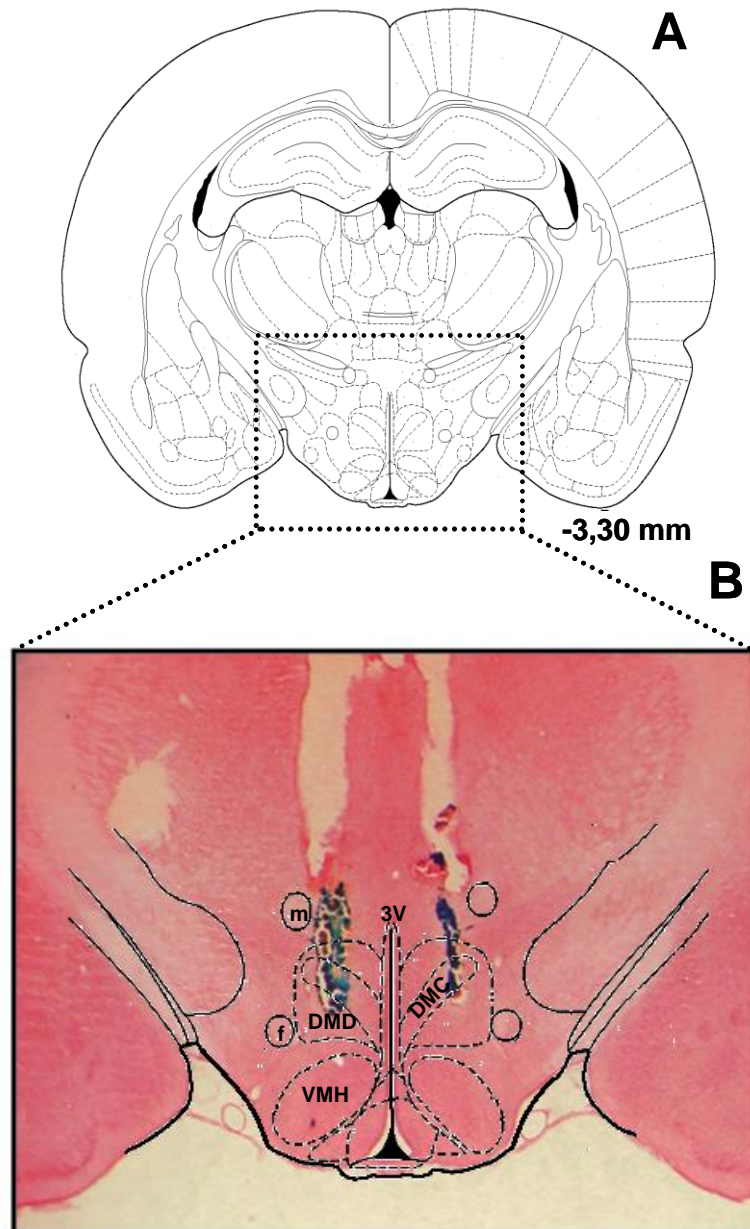


FIGURA 12: (A) Representação esquemática de um corte transversal do cérebro de rato correspondente ao sítio de microinjeção no HDM. **(B)** Fotomicrografia de uma secção transversal do cérebro de um animal representativo do grupo estudado, mostrando o sítio de microinjeção bilateral no HDM, corados pelo vermelho neutro 1% utilizando-se a técnica de Nissl. 3V, terceiro ventrículo; m, mamilo talâmico; f, fórnix; DMC, Porção compacta do HDM; DMD, Porção difusa do HDM; VMH, hipotálamo ventromedial (modificado de Paxinos e Watson, 1986).

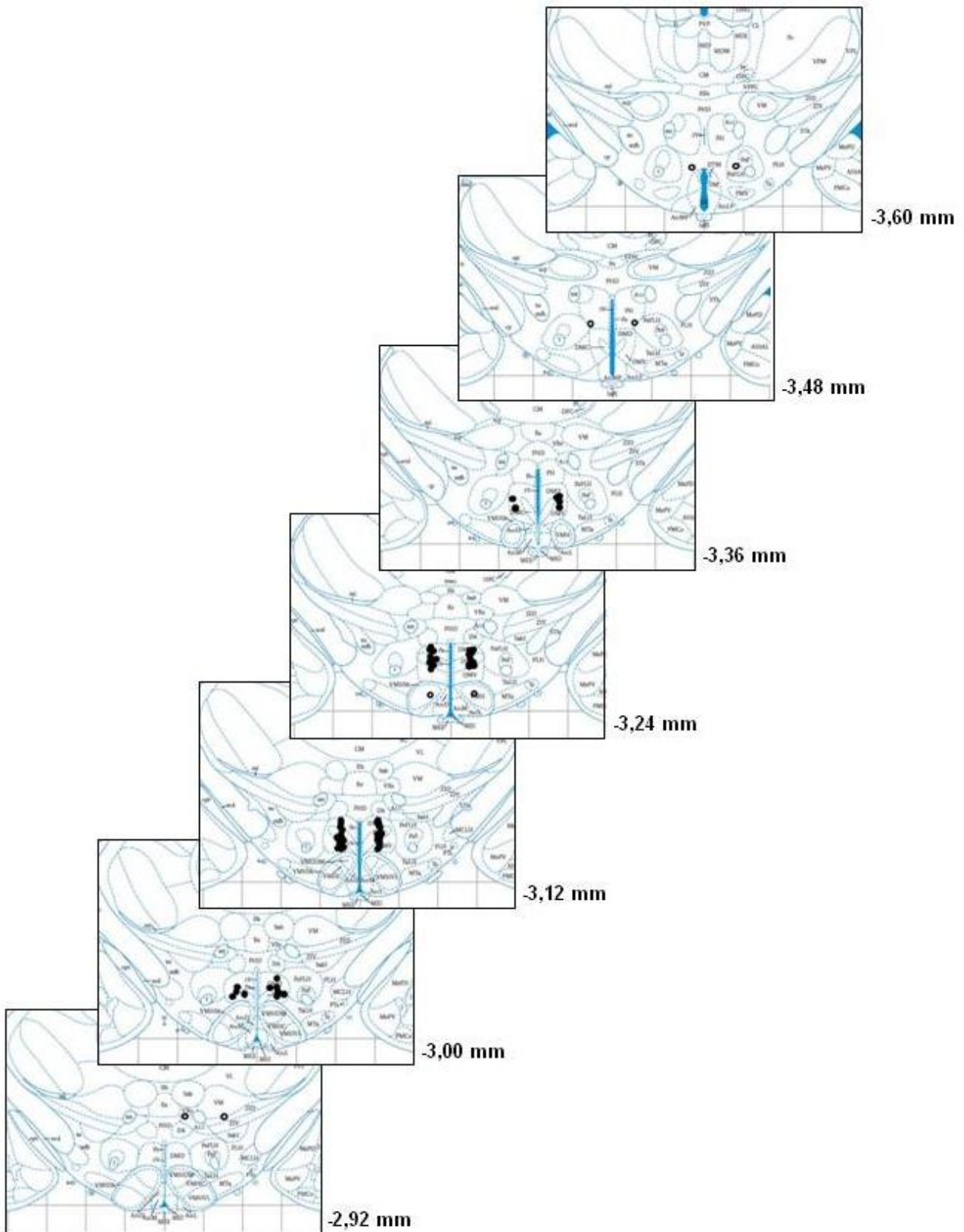


FIGURA 13: Representação esquemática de uma sequência de cortes transversais do hipotálamo, mostrando os centros de microinjeções no HDM (círculos pretos) ou em áreas adjacentes ao HDM (círculos brancos). Distância em milímetros a partir do bregma (modificado a partir do atlas de Paxinos e Watson, 1986)

7 DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo mostram que o bloqueio seletivo e isolado dos receptores NMDA ou não-NMDA do hipotálamo dorsomedial não promove nenhuma alteração sobre as respostas cardiovasculares e comportamental do quimiorreflexo. Entretanto, o bloqueio conjunto dos receptores NMDA e não-NMDA do HDM reduz de forma significativa a magnitude da resposta pressora e abole a resposta comportamental do quimiorreflexo, o que confirma que o HDM é parte integrante da via neural do quimiorreflexo e mostra que a ativação dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos do HDM é essencial para a completa expressão da resposta comportamental, bem como de parte da resposta pressora do quimiorreflexo.

Com relação ao componente simpatoexcitatório do quimiorreflexo, estudos do laboratório (Queiroz e cols, 2011) mostraram que o bloqueio dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos do HDM com ácido kinurênico reduz a resposta pressora e abole a resposta comportamental do quimiorreflexo, sugerindo que a ativação dos receptores de aminoácidos excitatórios do HDM é essencial para a completa expressão da resposta comportamental e expressão de parte da resposta pressora do quimiorreflexo. Entretanto, alguns estudos têm mostrado que o ácido kinurênico também pode atuar em receptores nicotínicos, sendo inclusive mais potente em bloquear esses receptores do que os próprios receptores glutamatérgicos (Hilmas e cols., 2001; Stone, 2007).

Considerando que o L-glutamato atua em diferentes subtipos de receptores ionotrópicos (Cunningham e cols 1994) e que, além do ácido kinurênico, existem antagonistas seletivos para esses receptores, nós reavaliamos o papel dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos do HDM utilizando esses antagonistas seletivos, bem como avaliamos a contribuição relativa desses diferentes subtipos de receptores na neurotransmissão do quimiorreflexo, uma vez que é possível que diferentes estímulos

possam ativar apenas um subtipo de receptor glutamatérgico no HDM para evocar a resposta fisiológica específica.

Os resultados do presente estudo mostram que o bloqueio seletivo e isolado dos receptores NMDA ou não-NMDA do HDM não é capaz de promover alterações sobre as respostas cardiovasculares e comportamental induzidas pela estimulação do quimiorreflexo com KCN. Duas doses diferentes dos antagonistas AP-5 e CNQX foram utilizadas e foi mostrado que, na maior dose (200 pmol/100 nl), os antagonistas foram capazes de abolir as respostas cardiovasculares e comportamental induzidas pelos seus respectivos agonistas NMDA e AMPA. Ainda assim, é possível que as respostas cardiovasculares e comportamental do quimiorreflexo não foram alteradas porque os receptores NMDA ou não-NMDA do HDM não estejam completamente bloqueados, visto que um número maior de receptores excitatórios do HDM pode ser ativado para a completa expressão da resposta do quimiorreflexo. Ou seja, um certo volume/dose do antagonista é capaz de bloquear os receptores ativados por um certo volume/dose de um estímulo farmacológico exógeno (microinjeção do agonista), mas não necessariamente de todos os receptores ativados pela resposta fisiológica do quimiorreflexo, o qual pode recrutar um número maior de neurônios no HDM. Nesse sentido, estudo de Oliván e cols (2001) mostrou que a lesão eletrolítica bilateral do núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) reduziu a resposta pressora do quimiorreflexo, entretanto a lesão apenas parcial do PVN não produziu nenhuma alteração sobre o quimiorreflexo. Baseado nessas evidências, é possível sugerir que uma subpopulação de neurônios do HDM que pode não ter sido bloqueado pelo AP-5 ou CNQX seja suficiente para produzir a resposta simpatoexcitatória e comportamental quando os quimiorreceptores periféricos são estimulados.

Apesar do bloqueio isolado dos receptores NMDA ou não-NMDA do HDM não promover alterações sobre as respostas do quimiorreflexo, o bloqueio conjunto desses

receptores com AP-5 e CNQX atenuou de forma significativa a resposta pressora e comportamental do quimiorreflexo. A partir desses resultados, pode-se especular que esses receptores devem trabalhar juntos na integração do componente simpatoexcitatório e comportamental do quimiorreflexo, de forma que o bloqueio isolado de apenas um subtipo de receptor não altera essa resposta. Desta forma, esses resultados confirmam estudo anterior (Queiroz e cols., 2011), demonstrando que os receptores glutamatérgicos do HDM efetivamente participam da integração das respostas cardiovascular e comportamental do quimiorreflexo.

O estudo de Queiroz e cols (2011) mostrou que o bloqueio dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos do HDM com ácido kinurênico, além de reduzir a resposta pressora e abolir a resposta comportamental do quimiorreflexo, também promoveu uma pequena, porém significativa, redução nos parâmetros cardiovasculares basais de pressão arterial e de frequência cardíaca. Estudos com ratos anestesiados (Soltis & DiMicco, 1992) também observaram uma atenuação dos parâmetros cardiovasculares basais após a microinjeção de ácido kinurênico, o que sugere que os receptores glutamatérgicos ionotrópicos são ativados tonicamente e contribuem para a manutenção dos parâmetros cardiovasculares basais. Todavia, os dados do presente estudo mostram que o bloqueio seletivo dos receptores NMDA ou não-NMDA não promoveu alterações sobre os parâmetros cardiovasculares basais, sugerindo que esses receptores isolados não estão envolvidos no controle tônico da pressão arterial. A microinjeção simultânea de AP-5 e CNQX no HDM também não produziu alterações sobre os parâmetros cardiovasculares basais. No presente estudo, foi utilizado um volume de 100 nl, diferente do estudo de Queiroz e cols (2011) que utilizou um volume relativamente alto (200 nl), apresentando, portanto, uma área de espalhamento maior, o que pode ter contribuído para a divergência dos resultados. Além disso, é possível sugerir que os receptores nicotínicos do HDM também podem estar envolvidos no controle tônico da pressão

arterial, uma vez que o bloqueio apenas dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos do HDM não promoveu nenhum efeito sobre os parâmetros cardiovasculares basais. Um aspecto importante a ser ressaltado refere-se aos anestésicos e seus efeitos sobre a neurotransmissão das aferências cardiovasculares, principalmente os quimiorreceptores. Neste estudo, todos os experimentos foram realizados em animais não-anestesiados devido à grande influência que os anestésicos exercem sobre a regulação autonômica (Franchini & Krieger, 1993; Haibara e cols, 1995; Guyenet, 2006). Já foi observado que animais anestesiados com cloralose ou uretana apresentam uma redução da resposta pressora induzida pelo quimiorreflexo, podendo apresentar, inclusive, resposta hipotensora. É importante salientar que essa resposta hipotensora não é de origem quimiorreflexa, uma vez que a ligadura da artéria do copúsculo carotídeo não modifica essa resposta (Sévoz e cols, 1997; Haibara e cols, 1995; Guyenet, 2006). Franchini & Krieger (1993) também mostraram que a resposta pressora, a bradicardia, o aumento da resistência periférica e da atividade simpática induzidos pela estimulação dos quimiorreceptores periféricos foram significativamente reduzidos nos animais anestesiados com cloralose, pentobarbital sódico ou halotano. Além das respostas cardiovasculares e ventilatórias, a estimulação do quimiorreflexo também promove uma importante resposta comportamental, que obviamente está ausente em animais anestesiados. Além disso, os anestésicos podem comprometer a integridade das áreas hipotalâmicas envolvidas com respostas comportamental. Dessa forma, fica evidente que o uso de diferentes anestésicos podem alterar as respostas do quimiorreflexo, sendo importante o estudo desse reflexo em animais não-anestesiados, como foi realizado no presente estudo.

Além das respostas cardiovasculares e comportamental, a estimulação dos quimiorreceptores periféricos também promove uma importante resposta ventilatória, a qual pode influenciar as respostas cardiovasculares. Essa interação cardiorrespiratória

tem sido proposta através de conexões existentes entre os neurônios geradores de atividade respiratória, localizados no complexo pré-Botzinger com os neurônios geradores de atividade simpática, localizados na área bulbar ventrolateral rostral (RVLM) (Guyenet & Koshiya, 1992; Koshiya & Guyenet, 1996). A estimulação ou desinibição do HDM em ratos anestesiados promove aumento da frequência respiratória (Shekhar, 1993; Tanaka & McAllen, 2008). Dessa forma, a ativação dos neurônios do HDM pelo quimiorreflexo poderia induzir um aumento adicional na taxa de disparo dos neurônios respiratórios localizados na superfície ventral do tronco cerebral e que poderia aumentar a atividade dos neurônios pré-ganglionares simpáticos localizados na RVLM (Guyenet & Koshiya, 1992; Koshiya & Guyenet, 1996). Através dessa interação simpato-respiratória, a resposta pressora do quimiorreflexo poderia ser modulada a partir de alterações da atividade ventilatória. Dessa forma, é possível especular que o bloqueio dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos do HDM afeta as respostas ventilatórias induzidas pelo quimiorreflexo e, conseqüentemente modifica o aumento na atividade simpática e pressão arterial. Entretanto, mais estudos são ainda necessários para melhor compreensão da interação entre a atividade ventilatória e a atividade simpática nas respostas induzidas pela estimulação dos quimiorreceptores periféricos. Os receptores glutamatérgicos ionotrópicos são fortemente relacionados com a integração de respostas cardiovasculares e comportamental induzidos por estresse emocional. O modelo de estresse por jato de ar, bem como a estimulação com agonistas glutamatérgicos ionotrópicos ou a desinibição do HDM com bicuculina, promove uma importante resposta comportamental acompanhada de aumento da atividade simpática, da pressão arterial e da frequência cardíaca, além de um aumento nos níveis plasmáticos de ACTH (Shekhar & DiMicco, 1987; Soltis & DiMicco; 1991; Bailey & DiMicco, 2001). Ademais, o bloqueio dos receptores para aminoácidos excitatórios do HDM atenua de forma importante as respostas cardiovasculares e comportamentais induzidas pelo estresse por jato de ar, o que mostra

que esses receptores têm importante participação nas respostas ao estresse. Considerando que o bloqueio dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos também reduz as respostas cardiovasculares e comportamental do quimiorreflexo, pode-se sugerir que o quimiorreflexo possa compartilhar das mesmas vias neurais do estresse.

Nesse sentido, é bem estabelecida a existência de conexões entre o HDM e a área bulbar ventrolateral rostral (RVLM), responsável pela geração e manutenção do tônus vasomotor simpático (Fontes e cols., 2001; Cao e cols., 2004). Essa projeção do HDM para a RVLM é uma das principais vias envolvidas na mediação do aumento da atividade simpática renal resultante da ativação do HDM. Além disso, estudos funcionais mostram uma atenuação da atividade simpática causada pela estimulação do HDM após a inibição farmacológica da RVLM (Fontes e cols, 2001). Horiuchi e cols (2004) mostrou também um aumento na frequência de disparo dos neurônios da RVLM após a microinjeção de bicuculina no HDM. Em conjunto, esses dados mostram que a RVLM é um componente essencial das vias centrais mediadores do aumento da atividade simpática para o leito vasomotor em resposta à ativação do HDM. Sendo a RVLM um relé sináptico do HDM e parte integrante da via neural do quimiorreflexo (Koshiya e cols., 1993), pode-se sugerir que o bloqueio dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos do HDM prejudica a transmissão de informações entre este e a RVLM, promovendo assim a redução da resposta pressora durante a estimulação do quimiorreflexo, que foi observado no presente estudo.

Além da RVLM, é bem estabelecido que o HDM envia projeções para outras regiões envolvidas na modulação do sistema cardiovascular, incluindo a substância cinzenta periaquedutal (PAG), o núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) e o NTS (Ter Horst & Luiten, 1986; Thompson e cols, 1996). O NTS é considerado uma das mais importantes estações sinápticas do tronco cerebral, que integra as informações aferentes do sistema cardiovascular, incluindo as informações dos quimiorreceptores periféricos

(Spyer, 1990; Mifflin, 1993; Ciriello e cols, 1994). Estudo recente do laboratório (Bessa, 2012) mostrou que as respostas cardiovasculares e comportamentais induzidas pela estimulação do HDM com agonistas glutamatérgicos, como AMPA e NMDA, dependem da ativação de receptores purinérgicos no NTS, uma vez que essas respostas foram significativamente reduzidas após o bloqueio purinérgico do NTS com suramin. Outro estudo (Korim e cols, 2012) também mostrou que o bloqueio dos receptores purinérgicos ou glutamatérgicos do NTS reduz de forma significativa a vasodilatação para os membros posteriores induzido pela estimulação elétrica das áreas hipotalâmicas de defesa (AHD). Já foi observado que a estimulação elétrica das AHD promove aumento da concentração de adenosina no NTS (Dale e cols, 2002), que é um produto resultante da degradação do ATP (Lambert e cols, 1997). Além disso, Hilton & Joels (1965) mostraram que a estimulação das áreas hipotalâmicas de defesa, da qual o HDM faz parte, promove facilitação dos efeitos cardiorrespiratórios do quimiorreflexo. Já foi observado que esse efeito facilitatório ocorre através de uma circuitaria neuronal que envolve uma modulação hipotalâmica sobre os neurônios do NTS (Silva-Carvalho e cols, 1993, 1995). Já foi observado que os neurônios do NTS que recebem a informação aferente dos quimiorreceptores carotídeos se projetam diretamente para os neurônios da RVLM (Koshiya & Guyenet, 1996). Baseado nessas evidências, é possível sugerir que os receptores glutamatérgicos ionotrópicos do HDM pode modular a atividade dos neurônios do NTS. Assim, o bloqueio dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos do HDM pode prejudicar a transmissão de informações do HDM para os neurônios do NTS que recebem informação aferente dos quimiorreceptores, o que pode explicar a redução da resposta pressora induzidas pela estimulação do quimiorreflexo, entretanto, estudos adicionais são necessários para confirmar essa assertiva.

O HDM e o PVN são duas importantes estruturas hipotalâmicas envolvidas na regulação do sistema cardiovascular. Os neurônios do PVN desempenham um papel

importante na modulação da atividade simpática (Katafuchi e cols, 1988; Krukoff e cols, 1997; Coote e cols, 1998; Badoer & Merolli, 1998). Estudos de DiMicco e cols (2002) e estudos de Keim & Shekhar (1996) sugerem que a ativação dos neurônios do HDM pode excitar o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) através de uma projeção direta para os neurônios parvocelulares do PVN. Segundo Li & Sawchenko (1998), a projeção originada do HDM poderia representar a via primária pelos quais os neurônios do PVN são ativados sob situações de estresse. Estudos que avaliaram expressão de c-fos reforçam a idéia de que a ativação dos neurônios do PVN induzido por estresse por jato de ar é sinalizado pela excitação do HDM. O estresse por jato de ar promove aumento da expressão de c-fos no HDM e no PVN, sendo que a microinjeção prévia de muscimol no HDM reduz de forma significativa o número de neurônios c-fos positivos no PVN (Morin e cols, 2001). Além de estar envolvido com as respostas induzidas pelo estresse, o PVN também está envolvido nas respostas cardiovasculares induzidas pela estimulação do quimiorreflexo (Kubo e cols, 1997). Um estudo de Cruz e cols (2008) mostrou que ratos submetidos à hipóxia intermitente crônica apresentam forte expressão de c-fos nos neurônios do PVN que se projetam para a RVLM. Oliven e cols (2001) mostrou que a lesão eletrolítica dos neurônios do PVN produz uma redução significativa da resposta pressora do quimiorreflexo. Além disso, a microinjeção de lidocaína no PVN atenua a resposta pressora, a atividade do nervo renal e a descarga do nervo frênico induzidos pela estimulação dos quimiorreceptores periféricos com KCN (Reddy e cols, 2005). Dessa forma, é possível sugerir que a via HDM-PVN possa estar envolvida no controle do componente simpatoexcitatório do quimiorreflexo.

Estudos mostram que a amígdala está envolvida nas respostas induzidas por estresse e ansiedade (Davis, 1997; Bujis & Van Eden, 2000). A estimulação química do núcleo amigdalóide central com glutamato (Iwata e cols, 1987) ou da amígdala basolateral com bicuculina (Sanders & Shekhar, 1991) promove uma importante taquicardia e um

aumento modesto da pressão arterial, respostas semelhantes ao estresse emocional. Além disso, essas respostas cardiovasculares induzidas pela desinibição da amígdala com bicuculina foram abolidas pela microinjeção prévia de antagonistas de receptores glutamatérgicos ionotrópicos no HDM (Soltis e cols, 1998). Esses resultados mostram que o HDM é parte integrante da via neural das respostas cardiovasculares induzidas pela desinibição da amígdala e que a ativação de receptores glutamatérgicos ionotrópicos do HDM é essencial para essa resposta. Um estudo anterior de Cechetto e Calaresu (1984) mostrou que a estimulação dos quimiorreceptores periféricos com KCN altera a frequência de disparos dos neurônios da amígdala, indicando que esta área também é parte integrante da via neural do quimiorreflexo. Estes dados nos permite sugerir que uma possível conexão entre amígdala-HDM pode estar envolvida com a regulação das respostas cardiovasculares induzidas pela estimulação do quimiorreflexo.

Além da amígdala, o HDM também recebe projeções do núcleo parabraquial (PBN) (Saper & Lowey, 1980; Berk & Finkelstein, 1981; Krukoff e cols, 1993; Thompson & Swanson, 1998). Com relação às respostas do quimiorreflexo, o estudo de Erickson & Millhorn (1994) mostrou que a estimulação dos quimiorreceptores periféricos induz expressão de c-fos no PBN. Já foi observado, através de estudos eletrofisiológicos, que os neurônios do PBN são excitados durante a estimulação do quimiorreflexo (Hayward & Felder, 1995). Mais recentemente, o estudo de Haibara e cols (2002) mostrou que a microinjeção bilateral de lidocaína no PBN promoveu uma redução significativa da resposta pressora induzida pela estimulação do quimiorreflexo. Estudos neuroanatômicos mostram que o PBN recebe projeções diretas de áreas envolvidas no controle cardiovascular (Loewy e cols, 1981; Ricardo & Koh, 1978; Saper e cols, 1979), principalmente aferências do NTS (Granata & Kitai, 1989; Spyer, 1990). Portanto, o PBN é considerado um relé sináptico das aferências viscerais que chegam ao NTS, incluindo as aferências dos quimiorreceptores. Além disso, o PBN envia projeções para a RVLM.

Dessa forma, pode-se sugerir que projeções diretas do NTS para o PBN pode ativar neurônios do PBN que se projetam para a RVLM (Chamberlim & Saper, 1992). Outros estudos também sugerem que conexões entre PBN e PVN são importantes para a expressão do componente simpatoexcitatório do quimiorreflexo (Bester e cols, 1997; Ciriello e Calaresu, 1980; Ciriello e cols, 1984; Takeuchi & Hopkins, 1984). Baseado nessas evidências, pode-se sugerir que a ativação de receptores glutamatérgicos ionotrópicos do HDM induzida pela estimulação do quimiorreflexo possa depender da via NTS-PBN-HDM.

Estudos prévios mostram a existência de uma via funcional entre o HDM e a PAG (Ter Horst & Luiten, 1986; Thompson & cols, 1996), uma região mesencefálica envolvida na integração de respostas cardiovasculares e comportamentais ao estresse emocional (Carrive, 1993; Bandler & Shipley, 1994). Um estudo de Da Silva e cols (2003) mostrou que a inibição da PAG promove atenuação significativa das respostas cardiovasculares induzidas pela estimulação do HDM, mostrando que os neurônios da PAG são um importante relé sináptico das vias centrais envolvidas nas respostas cardiovasculares induzidas pela ativação do HDM. Um estudo de Blander e cols (1972) já considerava a PAG como um relé sináptico pelo qual o hipotálamo integrava os componentes somático e visceral do comportamento de defesa. Um outro estudo de Da Silva e cols (2006) também mostrou que a estimulação da região lateral e dorsolateral da PAG produz uma resposta comportamental semelhante à resposta observada quando se estimula o HDM, o que sugere que a resposta comportamental produzida pela ativação do HDM parece ser dependente de uma conexão sináptica com os neurônios da PAG. Além disso, têm sido proposta uma conexão entre os neurônios da PAG e a amígdala, uma vez que a microinjeção de muscimol na amígdala suprime a resposta comportamental induzida pela estimulação elétrica da região dorsal da PAG (Martinez e cols, 2006). Com relação ao quimiorreflexo, Haibara e cols (2002) mostrou que a microinjeção de lidocaína na PAG

não produz nenhuma alteração sobre as respostas cardiovasculares deste reflexo. Entretanto, esse estudo não avaliou o componente comportamental do quimiorreflexo e, portanto, não se pode excluir o possível envolvimento da PAG sobre a resposta comportamental deste reflexo. Baseado nessas evidências e considerando que o HDM e a amígdala são parte integrante da via neural do quimiorreflexo, é possível especular que a resposta comportamental do quimiorreflexo pode depender da via amígdala-HDM-PAG, todavia mais estudos são necessários para desvendar as regiões cerebrais envolvidas nessa resposta.

Foi observado que a bradicardia induzida pela estimulação do quimiorreflexo não sofreu alterações após o bloqueio dos receptores glutamatérgicos do HDM. Haibara e cols (1995) mostraram previamente que a microinjeção bilateral de AP-5 no NTS bloqueia a resposta bradicárdica induzida pela estimulação dos quimiorreceptores periféricos, mostrando que o componente parassimpático do quimiorreflexo é mediado por receptores NMDA do NTS. Este estudo sugere que a bradicardia do quimiorreflexo é mediada por receptores NMDA localizados em neurônios do NTS que se projetam para o núcleo ambíguo e/ou para o núcleo motor dorsal do vago, onde se localizam neurônios pré-ganglionares parassimpáticos.

Esses estudos, em conjunto com os resultados do presente estudo, mostram que a resposta simpatoexcitatória do quimiorreflexo é uma resposta extremamente complexa e modulada por várias áreas cerebrais. Ainda não se conhece completamente toda a circuitaria neural das respostas cardiovasculares, ventilatórias e comportamentais do quimiorreflexo, os neurotransmissores e receptores envolvidos nestas respostas. Dessa forma, é de crucial importância maiores investigações. Este estudo tem como contribuição a demonstração de que os receptores NMDA e não-NMDA do HDM são parte integrante da via neural do quimiorreflexo.

A figura 13 mostra um diagrama esquemático baseado em estudos anatômicos e funcionais mostrando as principais aferências e eferências do HDM que estão envolvidas com o quimiorreflexo.

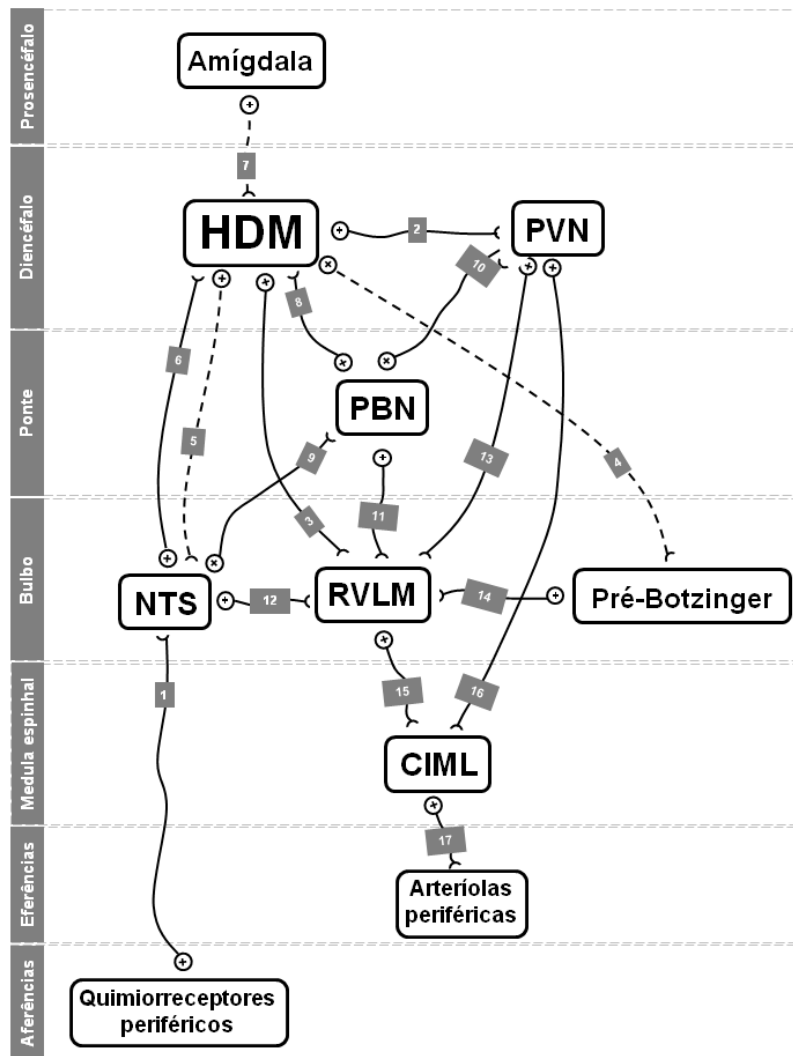


FIGURA 13: Diagrama esquemático baseado em estudos anatômicos e funcionais mostrando as principais aferências e eferências do HDM que estão envolvidas com o componente simpatoexcitatório do quimiorreflexo. Linhas cheias indicam projeções diretas e linhas pontilhadas indicam projeções que podem ou não ser diretas. **1:** Quimiorreceptores periféricos-NTS (Spyer,1990; Mifflin, 1993; Ciriello e cols., 1994). **2:** HDM-PVN (Ter Horst & Luiten, 1986; Thompson e cols, 1996; DiMicco e cols, 2002; Keim & Shekhar, 2006; Li & Sawchenko, 1998; Morin e cols, 2001; Jessop e cols, 1992; Bittencourt e cols, 1991; Womack & Richard, 2007). **3:** HDM-RVLM (Fontes e cols., 2001; Cao e cols., 2004). **4:** HDM-Pré Botzinger (Shekhar, 1993; Tanaka & McAllen, 2008). **5:** HDM-NTS (Bessa, 2012; Korim e cols, 2012). **6:** NTS-HDM (Thompson e cols, 1996). **7:** Amígdala-HDM (Soltis e cols, 1998). **8:** PBN-HDM (Saper & Lowey, 1980; Berk & Finkelstein, 1981; Krukoff e cols, 1993; Thompson & Swanson, 1998). **9:** NTS-PBN (Gramata & Kitai, 1989; Spyer, 1990). **10:** PBN-PVN (Bester e cols, 1997; Ciriello e Calaresu, 1980; Ciriello e cols, 1984; Takeuchi & Hopkins, 1984). **11:** PBN-RVLM (Chamberlim & Saper, 1992). **12:** NTS-RVLM (Koshiya & Guyenet, 1996). **13:** PVN-RVLM (Pyner & Coote, 2000; Cruz e cols, 2008). **14:** Pré Botzinger-RVLM (Guyenet & Koshiya,1992; Koshiya & Guyenet, 1996). **15:** RVLM-CIML (coluna intermédio-lateral) (Ross e cols., 1983, 1984). **16:** PVN-CIML (Hancock, 1976; Cechetto & Saper, 1988; Dampney, 1994, Pyner & Coote, 2000). **17:** CIML-arteriolas periféricas.

8 SUMÁRIO E CONCLUSÃO

Nossos resultados mostram que a microinjeção bilateral do antagonista dos receptores NMDA, o AP-5, no HDM em ratos não-anestesiados não produz nenhuma alteração sobre as respostas cardiovasculares e comportamental induzidas pela estimulação dos quimiorreceptores periféricos com KCN, bem como não altera os parâmetros cardiovasculares basais. De forma semelhante, a microinjeção bilateral do antagonista dos receptores não-NMDA, o CNQX, no HDM em ratos não-anestesiados também não promove alterações sobre as respostas cardiovasculares e comportamental do quimiorreflexo, bem como não altera os parâmetros cardiovasculares basais. Por outro lado, a microinjeção conjunta de AP-5 + CNQX no HDM em ratos não-anestesiados produz uma atenuação significativa da resposta pressora e abole a resposta comportamental do quimiorreflexo, sem alterar a bradicardia ou os parâmetros cardiovasculares basais.

Esses resultados mostram que o bloqueio seletivo dos receptores NMDA ou não-NMDA do HDM isoladamente não é capaz de produzir alterações sobre as respostas pressora e comportamental do quimiorreflexo. Todavia, uma vez que o bloqueio combinado dos receptores NMDA e não-NMDA do HDM reduziu a resposta pressora e aboliu a resposta comportamental do quimiorreflexo, pode-se sugerir que esses receptores atuem de forma conjunta na integração do quimiorreflexo, de forma que o bloqueio de apenas um subtipo de receptor não altera essa resposta. Esses dados reforçam ainda o papel do aminoácido excitatório L-glutamato na neurotransmissão do quimiorreflexo no HDM.

9 REFERÊNCIAS

- Anderson JJ & DiMicco JA. **Effect of local inhibition of gamma-aminobutyric acid uptake in the dorsomedial hypothalamus on extracellular levels of gamma-aminobutyric acid and on stress-induced tachycardia: a study using microdialysis.** J Pharmacol Exp Ther 255(3):1399-407, 1990.
- Badoer E, Merolli J. **Neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus that Project to the rostral ventrolateral medulla are activated by haemorrhage.** Brain Res 791: 317-320, 1998.
- Bailey TW, DiMicco JA. **Chemical stimulation of the dorsomedial hypothalamus elevates plasma ACTH in conscious rats.** Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 280: 8–15, 2001.
- Bailey TW, Nicol GD, Schild JH, DiMicco JA. **Synaptic and membrane properties of neurons in the dorsomedial hypothalamus.** Brain Res 985: 150–162, 2003.
- Barron KW & Heesch CM. **Cardiovascular effects of posterior hypothalamic stimulation in baroreflex-denervated rats.** Am J Physiol 259: 720-727, 1990.
- Barros RC, Bonagamba LG, Okamoto-Canesin R, de Oliveira M, Branco LG, Machado BH. **Cardiovascular responses to chemoreflex activation with potassium cyanide or hypoxic hypoxia in awake rats.** Auton Neurosci 31; 97(2): 110-5, 2002.
- Bazett T, Lumly L, Bitran D, Markowski V, Warner R, Hull ETI. **Male rat copulation following 6-OHDA lesions of the medial preoptic area: resistance to repeated administration and rapid behavioral recovery.** Brain Res 580: 164–170, 1992.
- Berk ML, Finkelstein JA. **Afferent projections to the preoptic area and hypothalamic regions in the rat brain.** Neuroscience 6: 1601–1624, 1981.
- Bernardis LL & Bellinger LL. **The lateral hypothalamic area revisited: ingestive behavior.** Neurosci Biobehav Rev 20 (2):189-287, 1996.
- Berquin P, Bodineau L, Bodineau F, Gros N, Larnicol N. **Brainstem and hypothalamic áreas involved in respiratory chemoreflexes: a Fos study in adult rats.** Brain Res 857: 30-40, 2000.
- Bessa R. **Estudo da contribuição da via entre o hipotálamo dorsomedial e núcleo do trato solitário (HDM-NTS) nas respostas cardiovasculares e comportamentais do quimiorreflexo em ratos não-anestesiados.** 85 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2012.

- Bester H, Besson JM, Bernard JF. **Organization of efferent projections from the parabrachial area to the hypothalamus: a *Phaseolus vulgaris*-leucoagglutinin study in the rat.** J Comp Neurol 383: 245-281, 1997.
- Birch PJ, Grossman CJ, Hayes AG. **Kynurenate and FG9041 have both competitive and non-competitive antagonist actions at excitatory amino acid receptors.** European Journal of Pharmacology 151: 313-315, 1988a.
- Birch PJ, Grossman CJ, Hayes AG. **Kynurenic acid antagonises responses to NMDA via an action at the strychnine-insensitive glycine receptor.** European Journal of Pharmacology 154: 85-87, 1988b.
- Bittencourt JC, Benoit R, Sawchenko PE. **Distribution and origins of substance-P-immunoreactive projections to the paraventricular and supraoptic nuclei – partial overlap with ascending catecholaminergic projections.** J Chem Neuroanat 4: 63–78, 1991.
- Blair MI, Piekut D, Want A, Olschowka JA. **Role of the hypothalamic paraventricular Nucleus in cardiovascular regulation.** Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology 23:161-165, 1996.
- Blander RJ Jr, Chi CC, Flynn JP. **Biting attack elicited by stimulation of the ventral midbrain tegmentum of cats.** Science 177 (46): 364-366, 1972.
- Blander RJ & Shipley MT. **Columnar organization in the midbrain periaqueductal Gray: modules for emotional expression?** Trends Neurosci 17: 379-389, 1994.
- Block, GA & Billiar RB. **Properties and regional distribution of nicotinic cholinergic receptors in the rat hypothalamus.** Brain Res 212: 152-158, 1981.
- Buijs RM & Van Eden CG. **The integration of stress by the hypothalamus, amygdala and prefrontal cortex: balance between the autonomic nervous system and the neuroendocrine system.** Prog Brain Res 126: 117– 32, 2000.
- Cao WH, Fan W, Morrison SF. **Medullary pathways mediating specific sympathetic responses to activation of dorsomedial hypothalamus.** Neuroscience 126: 229–240, 2004.
- Carrive P. **The periaqueductal Gray and defensive behavior: functional representation and neuronal organization.** Behav Brain Res 58: 27-47, 1993.
- Cechetto DF & Calaresu FR. **Units in the amygdala responding to activation of carotid baro- and chemoreceptors.** Am J Physiol 246: 832-836, 1984.

- Cechetto F & Saper CB. **Neurochemical organisation of the hypothalamic projection to the spinal cord in the rat.** J Comp Neurol 272: 579–604, 1988.
- Chamberlin NL & Saper CB. **Topographic organization of respiratory responses to glutamate microstimulation of the parabrachial nucleus in the rat.** J Neurosci 14 (11): 6500-6510, 1992.
- Chitravanshi VC & Sapru HN. **Chemoreceptor-sensitive neurons in commissural subnucleus of nucleus tractus solitarius of the rat.** Am J Physiol 268(4 Pt 2):R851-858, 1995.
- Ciriello J & Calaresu FR. **Monosynaptic pathway from cardiovascular neurons in the nucleus tractus solitarii to the paraventricular nucleus in the cat.** Brain Res 193: 529-533, 1980.
- Ciriello J, Lawrence D, Pittman QJ. **Electrophysiological identification of neurons in the parabrachial nucleus projecting directly to the hypothalamus in the rat.** Brain Res 322: 388-392, 1984.
- Collingridge, G.L. & Lester, R.A. **Excitatory amino acid receptors in the vertebrate central nervous system.** Pharmacol 41(2):143-210, 1989.
- Coote JH, Yang Z, Pyner S, Deerung J. **Control of sympathetic outflows by the hypothalamic paraventricular nucleus.** Clin Exp Pharmacol Physiol 25: 461-463, 1998.
- Cruz JC, Bonagamba LG, Machado BH, Biancardi VC, Stern JE. **Intermittent activation of peripheral chemoreceptors in awake rats induces Fos expression in rostral ventrolateral medulla-projecting neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus.** Neurosci 157(2): 463-472, 2008.
- Cunningham MD, Ferkany JW e Enna SJ. **Excitatory amino acid receptors: A gallery of new targets for pharmacological intervention.** Life Science 54:135-148, 1994.
- Da Silva LG, De Menezes RC, Dos Santos RA, Campagnole-Santos MJ, Fontes MA. **Role of periaqueductal gray on the cardiovascular response evoked by desinhibition of the dorsomedial hypothalamus.** Brain Res 984: 206-214, 2003.
- Da Silva LG, De Menezes RC, Villela DC, Fontes MA. **Excitatory amino acid receptors in the periaqueductal gray mediate the cardiovascular response evoked by activation of dorsomedial hypothalamic neurons.** Neuroscience 139: 1129-1139, 2006.
- Dale N, Gourine AV, Llaudet E, Bulmer D, Thomas T, Spyer KM. **Rapid adenosine release in the nucleus tractus solitarii during defense response in rats: real-time measurement in vivo.** J Physiol (Lond) 544: 149–160, 2002.

- Daly MB & Hazzledine JL. **The effects of artificially induced hyperventilation on the primary cardiac reflex response to stimulation of the carotid bodies in the dog.** J. Physiol 163: 872-889, 1963.
- Daly MB & Scott MJ. **The cardiovascular responses to stimulation of the carotid body chemoreceptors in the dog.** J. Physiol (Lond.) 165: 179-197, 1963.
- Daly MB & Scott MJ. **The effects of stimulation of the carotid body chemoreceptors on heart rate in the dog.** J. Physiol. (Lond.) 144: 148-166, 1958.
- Daly MB, Hazzledine JL, Howe A. **Reflex respiratory and peripheral vascular responses to stimulation of the isolated perfused aortic arch chemoreceptors of the dog.** J. Physiol 177: 300-322, 1965.
- Daly MB, Ungar A. **Comparison of the reflex responses elicited by stimulation of the separately perfused carotid and aortic body chemoreceptors in the dog.** J. Physiol 182: 379-403, 1966.
- Dampney RAL. **Functional organisation of central pathways regulating the cardiovascular system.** Physiol Rev 74: 323-364, 1994.
- Davies JD, Evans RH, Francis AA, Watkins JC. **2-Amino-5-phosphonovalerate (2-APV), a potent and selective antagonist of amino acid-induced and synaptic excitation.** Neurosci Lett 21: 77-81, 1981.
- Davis M. **Neurobiology of fear responses: the role of the amygdala.** J Neuropsychol Clin Neurosci 9: 382-402, 1997.
- De Novellis V, Stotz-Potter EH, Morin SM, Rossi F, DiMicco JA. **Hypothalamic sites mediating cardiovascular effects of microinjected bicuculline and EAAs in rats.** Am J Physiol 269(1 Pt 2): R131-140, 1995.
- DiMicco JA, Samuels BC, Zaretskaia MV, Zaretsky DV. **The dorsomedial hypothalamus and the response to stress: part renaissance, part revolution.** Pharmacol Biochem Behav 71(3):469-480, 2002.
- Elmslie KS & Yoshikami D. **Effects of Kynurenate on Root Potentials Evoked by Synaptic Activity and Amino Acids in the Frog Spinal Cord.** Brain Res 330: 265-272, 1985.
- Erickson JT & Millhorn DE. **Hypoxia and electrical stimulation of the carotid sinus nerve induce Fos-like immunoreactivity within catecholaminergic and serotonergic neurons of the rat brainstem.** J Comp Neurol 348: 161-182, 1994.

- Fontes MA, Tagawa AT, Polson JW., Cavanagh SJ, Dampney RA. **Descending pathways mediating cardiovascular response from dorsomedial hypothalamic nucleus**. American Journal of Physiology 280: 2891-2901, 2001.
- Fontes MA, Menezes RCA, Villela DC, Da Silva Jr LG. **O Hipotálamo Dorsomedial e a Organização da Resposta Cardiovascular ao Estresse Emocional: Uma Perspectiva Funcional**. Medicina, Ribeirão Preto 39 (1): 13-20, 2006.
- Fontes MA, Xavier CH, de Menezes RC, Dimicco JA. **The dorsomedial hypothalamus and the central pathways involved in the cardiovascular response to emotional stress**. Neuroscience 184: 64-74, 2011.
- Franchini KG & Krieger E. **Cardiovascular responses of conscious rats to carotid body chemoreceptor stimulation by intravenous KCN**. J Auton Nerv Syst 42: 63-70, 1993.
- Gonzales C, Almaraz L, Obeso A, Rigual R. **Carotid body chemoreceptors: from natural stimuli to sensory discharge**. Physiological Reviews 74: 829-898, 1994.
- Granata AR & Kitai ST. **Intracellular study of nucleus parabrachialis and nucleus tractus solitarii interconnections**. Brain Res 492: 281-292, 1989.
- Guyenet PG & Koshiya N. **Respiratory-sympathetic integration in the medulla oblongata**. In: Central neural mechanisms in cardiovascular regulation. Edited by Kunos G & Ciriello. Boston, 226-247, 1992.
- Guyenet PG. **The sympathetic control of blood pressure**. Nature Reviews Neuroscience 7: 335-346, 2006.
- Haibara AS, Colombari E, Chianca Jr DA, Bonagamba LGH, Machado BH. **NMDA receptors in NTS are involved in bradycardia but not in pressor response of chemoreflex**. Am J Physiol 269: 1421-1427, 1995.
- Haibara AS, Tamashiro E, Oliván MV, Bonagamba LG, Machado BH. **Involvement of the parabrachial nucleus in the pressor response to chemoreflex activation in awake rats**. Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical 101: 60-67, 2002.
- Hancock MB. **Cells of origin of hypothalamo-spinal projections in the rat**. Neurosci Lett 3: 179-184, 1976.
- Hayward LF & Felder RB. **Peripheral chemoreceptor inputs to the parabrachial nucleus of the rat**. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 268: 707-714, 1995.

- Hilmas, C, Pereira, EFR, Alkondon, M, Rassoulpour, A, Schwarcz, R & Albuquerque, EX. **The brain metabolite kynurenic acid inhibits $\alpha 7$ nicotinic receptor activity and increases non- $\alpha 7$ nicotinic receptor expression: physiopathological implications.** J Neurosci 21: 7463-7473, 2001.
- Hilton SM & Joels W. **Facilitation of chemoreceptor reflexes during the defence reaction.** J.Physiol. Lond 176: 20p, 1965.
- Hilton SM & Marshall JM. **The pattern of cardiovascular response to carotid chemoreceptor stimulation in the cat.** J Physiol 326: 495-513, 1982.
- Hollmann M & Heinemann S. **Cloned glutamate receptors.** Annu Rev Neurosci 17: 31–108, 1994.
- Honoré T, Davies SN, Drejer J, Fletcher EJ, Jacobsen P, Lodge D, Nielsen FE. **Quinoxalinediones: potent competitive non-NMDA glutamate receptor antagonists.** Science Wash 241: 701-703, 1988.
- Horiuchi J, McAllen RM, Allen AM, Killinger S, Fontes MA, Dampney RA. **Descending vasomotor pathways from the dorsomedial hypothalamic nucleus: role of medullary raphe and RVLM.** Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 287 (4): 824-832, 2004.
- Iwata J, Chida K, LeDoux JE. **Cardiovascular responses elicited by stimulation of neurons in the central amygdaloid nucleus in awake but not anesthetized rats resemble conditioned emotional responses.** Brain Res 418: 183-188, 1987.
- Jessop DS, Chowdrey HS, Larsen PJ, Lightman SL. **Substance P – multifunctional peptide in the hypothalamopituitary system.** J Endocrinol 132: 331–337, 1992.
- Johnson PL & Shekhar A. **Panic-prone state induced in rats with GABA dysfunction in the Dorsomedial Hypothalamus is mediated by NMDA receptors.** The Journal of Neuroscience 26: 7093-7104, 2006.
- Katafuchi T, Oomura Y, Kusowa M. **Effects of chemical stimulation of the paraventricular nucleus on adrenal and renal nerve activity in rats.** Neurosci 86: 195-200, 1988.
- Keim SR & Shekhar A. **The effect of GABA_A receptor blockade in the dorsomedial hypothalamic nucleus on corticotrophin (ACTH) and corticosterone secretion in male rats.** Brain Res 739: 46-51, 1996.
- Korim WS, Ferreira-Neto ML, Pedrino GR, Pilowsky PM, Cravo SL. **Interaction of medullary P2 and glutamate receptors mediates the vasodilation in the hindlimb of rat.** Purinergic Signal 2012.

- Korner PI & Uther JB. **Dynamic characteristics of the cardiovascular autonomic effects during severe arterial hypoxia in the unanesthetized rabbit.** *Circ Res* 24 (5): 671-87, 1969.
- Koshiya N & Guyenet PG. **NTS neurons with carotid chemoreceptor inputs arborize in the rostral ventrolateral medulla.** *Am J Physiol* 270: 1273-1278, 1996.
- Koshiya N, Huangfu D, Guyenet PG. **Ventrolateral medulla and sympathetic chemoreflex in rat.** *Brain Res* 609: 174-184, 1993.
- Krukoff TL, Harris KH, Jhamandas JH. **Efferent projections from the parabrachial nucleus demonstrated with the anterograde tracer *Phaseolus vulgaris* Leucoagglutinin.** *Brain Res* 30: 163-172, 1993
- Krukoff TL, Mactavish D, Jhamadas JH. **Activation by hypotension of neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus that project to the brainstem.** *J Comp Neurol* 385: 285-296, 1997.
- Kubo T, Yanagihara Y, Yamaguchi H, Fukumori R. **Excitatory aminoacid receptor in the paraventricular hypothalamic nucleus mediates pressor response induced by carotid chemoreceptor stimulation in rats.** *Clin Exp Hypertens* 19: 1117-1134, 1997.
- Lambert JH, Thomas T, Burnstock G, Spyer KM. **A source of adenosine involved in cardiovascular responses to defense area stimulation.** *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 272: 195–200, 1997.
- Li HY & Sawchenko PE. **Hypothalamic effector neurons and extended circuitries activated in “neurogenic” stress: a comparison of footshock effects exerted acutely, chronically and in animals with controlled glucocorticoid levels.** *J Comp Neurol* 393: 244-266, 1998.
- Lisa M, Filippelli A, Marmo E, Wible JH Jr, DiMicco JA. **Microinjection of muscimol into posterior hypothalamus blocks cardiovascular response to experimental stress in rats.** *Pharmacol Res* 21 Suppl 1: 9-10, 1989.
- Lowey AD, Wallach JH, McKellar S. **Efferent connections of the ventral medulla oblongata in the rat.** *Brain Res Rev* 3: 63-80, 1981.
- Machado BH, Cruz JC, Pajolla GP, Zoccal DB, Braga VA, Accorsi-Mendonça D. **Diferentes abordagens experimentais no estudo da modulação da atividade simpática no sistema nervoso central de ratos.** *Medicina, Ribeirão Preto.* vol.39, 2006.
- Martinez RC, de Oliveira AR, Brandao ML. **Conditioned and unconditioned fear organized in the periaqueductal Gray are differentially sensitive to injections of muscimol into amygdaloid nuclei.** *Neurobiol Learn Mem* 85: 58-65, 2006.

- Meeker RB, Greenwood RS & Hayward JN. **Glutamate receptors in the rat hypothalamus and pituitary.** *Endocrinology* 134: 621-629, 1994.
- Mifflin SW. **Inhibition of chemoreceptor inputs to nucleus of tractus solitarius neurons during baroreceptor stimulation.** *Am J Physiol* 265: R14-R20, 1993.
- Morin SM, Stotz-Potter EH, DiMicco JA. **Injection of muscimol into dorsomedial hypothalamus and stress-induced Fos expression in paraventricular nucleus.** *Am J Physiol* 280: 1276-1284, 2001.
- Nakanishi, S. **Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function.** *Science*. 258: 597– 603, 1992.
- Olivan MV, Bonagamba LGH, Machado BH. **Involvement of the paraventricular nucleus of the hypothalamus in the pressor response to the chemoreflex activation in awake rats.** *Brain Res* 895: 167-172, 2001.
- Paxinos G, Watson C. **The rat brain in stereotaxic coordinates.** 2nd ed. New York: Academic Press; 1986.
- Perkins MN & Stone TW. **An iontophoretic investigation of the actions of convulsant kynurenes and their interaction with the endogenous excitant quinolinic acid.** *Brain Res* 247: 184-187, 1982.
- Pyner S & Coote JH. **Identification of branching paraventricular neurones of the hypothalamus that project to the rostroventrolateral medulla and spinal cord.** *Neuroscience* 100: 549-556, 2000.
- Queiroz EA, Okada MN, Fumega U, Fontes MA, Moraes MF, Haibara AS. **Excitatory amino acid receptors in the dorsomedial hypothalamus are involved in the cardiovascular and behavioural chemoreflex responses.** *Exp Physiol* 96(2):73-84, 2011.
- Reddy MK, Patel KP, Schultz HD. **Differential role of the paraventricular nucleus of the hypothalamus in modulating the sympathoexcitatory component of peripheral and central chemoreflexes.** *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 289: 789–797, 2005.
- Ricardo JA & Koh ET. **Anatomical evidence of direct projections from the nucleus of the solitary tract to the hypothalamus, amygdale, and other forebrain structures in the rat.** *Brain Res* 153: 1-26, 1978.
- Ross CA, Ruggiero DA, Joh TH, Park DH, Reis DJ. **Adrenaline synthesizing neurons in the rostral ventrolateral medulla: A possible role in tonic vasomotor control.** *Brain Res* 273: 356–361, 1983.

- Ross CA, Ruggiero DA, Park DH, Joh TH, Sved AF, Fernandez-Pardal J, Saavedra JM, Reis DJ. **Tonic vasomotor control by the rostral ventrolateral medulla: Effect of electrical or chemical stimulation of the area containing C1 adrenaline neurons on arterial pressure heart rate and plasma catecholamines and vasopressin.** *J Neurosci* 4: 474–494, 1984.
- Sanders SK & Shekhar A. **Blockade of GABAA receptors in the region of the anterior basolateral amygdala of rats elicits increases in heart rate and blood pressure.** *Brain Res* 567:101–10, 1991.
- Saper CB & Loewy AD. **Efferent connections of the parabrachial nucleus in the rat.** *Brain Res* 197: 291-317, 1980.
- Saper CB, Swanson LW, Cowan WM. **An autoradiographic study of the efferent connections of the lateral hypothalamic area in the rat.** *J Comp Neurol* 183: 689-706, 1979.
- Sévoz C, Callera JC, Machado BH, Hamon M, Laguzzi R. **Activation of serotonin3 receptors in the nucleus tractus solitarius affects the cardiovascular chemoreflex responses.** *Am J Physiol* 41, 272: 1250-1259, 1997.
- Shekhar A & DiMicco JA. **Defense reaction elicited by injection of GABA antagonists and synthesis inhibitors into the posterior hypothalamus in rats.** *Neuropharmacology* 26(5):407-17, 1987.
- Shekhar A. **GABA receptors in the region of the dorsomedial hypothalamus of rats regulate anxiety in the elevated plus-maze test. I. Behavioral measures.** *Brain Res* 627: 9-16, 1993.
- Silva-Carvalho L, Dawid-Milner MS, Goldsmith GE, Spyer KM. **Hypothalamic-evoked effects in cat nucleus tractus solitarius facilitating chemoreceptor reflexes.** *Exp Physiol* 78: 425-8, 1993.
- Silva-Carvalho L, Dawid-Milner MS, Goldsmith GE, Spyer KM. **Hypothalamic modulation of the arterial chemoreceptor reflex in the anesthetized cat: role of the nucleus tractus solitarii.** *J Physiol* 487: 751-760, 1995.
- Soltis RP & DiMicco JA. **GABA_A and excitatory amino acid receptors in dorsomedial hypothalamus and heart rate in rats.** *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 260: 13-20, 1991a.
- Soltis RP & DiMicco JA. **Hypothalamic excitatory amino acid receptors mediate stress-induced tachycardia in rats.** *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 262: 689–697, 1992
- Soltis RP & DiMicco JA. **Interaction of hypothalamic GABAA and excitatory amino acid receptors controlling heart rate in rats.** *Am J Physiol* 261(2 Pt 2): R427-433, 1991b.

- Soltis RP, Cook JC, Gregg AE, Stratton JM, Flickinger KA. **Excitatory amino acid receptors in the dorsomedial hypothalamic area mediate the cardiovascular response to activation of the amygdala.** *Am J Physiol* 275: 624–631, 1998.
- Spyer KM. **The Central Nervous Organization of Reflex Circulatory Control.** In: *Central Regulation of Autonomic Function*, edited by Loewy AD, and Spyer KM. New York: Oxford University Press, p. 169-188, 1990.
- Stone TW & Burton NR. **NMDA receptors and ligands in the vertebrate CNS.** *Prog Neurobiol* 30(4): 333-68, 1988.
- Stone, TW. **Kynurenic acid blocks nicotinic synaptic transmission to hippocampal interneurons in young rats.** *Eur J Neurosci* 25: 2656-2665, 2007.
- Stotz-Potter EH, Willis LR, DiMicco JA. **Muscimol acts in dorsomedial but not paraventricular hypothalamic nucleus to suppress cardiovascular effects of stress.** *Journal of Neuroscience* 16: 1173-1179, 1996.
- Swanson LW & Sawchenko PE. **Paraventricular nucleus: a site for integration of neuroendocrine and autonomic mechanisms.** *Neuroendocrinology* 31: 410-417, 1980.
- Takeuchi Y & Hopkins DA. **Light and electron microscopic demonstration of hypothalamic projections to the parabrachial nuclei in the cat.** *Neurosc Lett* 46: 53-58, 1984.
- Tanaka M & McAllen RM. **Functional topography of the dorsomedial hypothalamus.** *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 294, 477–486, 2008.
- Ter Horst GJ & Luiten PGM. **The projections of the dorsomedial hypothalamic nucleus in the rat.** *Brain Res Bull* 16:231-48, 1986.
- Thompson RH & Swanson LW. **Organization of inputs to the dorsomedial nucleus of the hypothalamus: a reexamination with Fluoroglod and PHAL in the rat.** *Brain Res Rev* 27: 89-118, 1998.
- Thompson RH, Canteras NS, Swanson LW. **Organization of projections from the dorsomedial nucleus of hypothalamus: A PHA-L study in the rat.** *The Journal of Comparative Neurology* 376: 143-173, 1996.

Verdoorn TA, Kleckner NW, Dingledine R. **N-Methyl-D-aspartate/glycine and quisqualate/kainite receptors expressed in *Xenopus* oocytes: antagonist pharmacology.** Mol Pharmacol 35: 360-368, 1989.

Womack MD & Richard BJ. **Activation of paraventricular nucleus neurones by the dorsomedial hypothalamus via a tachykinin pathway in rats.** Exp Physiol 92: 671-676, 2007.