

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA

O Sítio da Glicina no Receptor NMDA de Neurônios do NTS Subpostremal

Vander Baptista

Ribeirão Preto, Fevereiro de 2004.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA

O Sítio da Glicina no Receptor NMDA de Neurônios do NTS Subpostremal

Vander Baptista

Ribeirão Preto, Março de 2004.

FICHA CATALOGRÁFICA

Baptista, Vander

O Sítio da Glicina no Receptor NMDA de Neurônios do NTS Subpostremal. Ribeirão Preto, 2004.

97 p.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Fisiologia.

Orientador: Varanda, Wamberto Antonio.

1. Sítio da Glicina. 2. Receptor NMDA. 3. NTS. 4. Eletrofisiologia.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA

O Sítio da Glicina no Receptor NMDA de Neurônios do NTS Subpostremal

Vander Baptista

ORIENTADOR: Prof. Dr. Wamberto A. Varanda

**Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências**

Ribeirão Preto, Março de 2004.

Data da Defesa: ___/___/___

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

À Providência, pela permissão.

Ao Prof. Dr. Wamberto A. Varanda que, com seu verbo diretriz, orientou. Com sua ação oportuna, catalisou. Com seu celso cabedal, ensinou. E, com a retidão de sua conduta, foi exemplo. Obrigado por receber-me em seu laboratório.

Ao José Fernando Aguiar pelo esmerado apoio técnico. Pela amizade sincera.

Aos meus contemporâneos do Laboratório de Biofísica de Membranas, Wataro N. Ogawa, Cristiane del Corso, Aldo R. A. Rodrigues, Fernando Mesquita Jr. e Luiz Artur P. Chaves, pelo companheirismo de sempre.

À Elisa Aleixo, Fernando Cesar Rastelo, Cláudia de Barcellos Vanzela e Carlos Alberto Belini, por tornarem os trâmites burocráticos menos morosos. Por serem sempre dispostos explicadores da regulamentação interna.

Aos Professores do Departamento de Fisiologia por colocarem à disposição o vasto manancial de conhecimento que acumulam.

Aos colegas e funcionários do Departamento de Fisiologia, pela convivência pacífica e leal. Pelas *comunicações pessoais*.

À Nicinha, Viviane e Luizinho por me cederem o meu tempo que era deles. Por repartirem comigo o meu ideal. Valeu, valeu!

Ao Sr. Wistar, por sua própria vida.

À FAPESP, pelo apoio financeiro.

Ao Precioso Companheiro (*in
memmorian*) que, se nos deixou sozinhos,
já nos houvera ensinado a lição.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS.....	I
RESUMO.....	III
ABSTRACT.....	V
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 RECEPTORES GLUTAMATÉRGICOS.....	4
1.2 RECEPTORES NMDA.....	6
1.3 NEUROTRANSMISSÃO NO NTS.....	9
1.4 A GLICINA NO NTS.....	16
1.5 A GLICINA COMO NEUROMODULADOR.....	17
1.6 OUTROS NEUROTRANSMISSORES.....	22
2 OBJETIVOS.....	23
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
3.1 ANIMAIS.....	24
3.2 PREPARAÇÃO DAS FATIAS (<i>SLICES</i>).....	24
3.3 ELETROFISIOLOGIA.....	25
3.4 SOLUÇÕES.....	28
3.5 DROGAS.....	29
4 ANÁLISE DOS RESULTADOS.....	30
5 RESULTADOS.....	32
5.1 PROPRIEDADES PASSIVAS.....	33
5.2 CORRENTES PÓS-SINÁPTICAS EVOCADAS POR ESTIMULAÇÃO DO TS.....	37
5.2.1 <i>Correntes Excitatórias Pós-Sinápticas</i>	41
5.2.2 <i>Correntes Excitatórias Pós-Sinápticas não-NMDA</i>	42
5.2.3 <i>Correntes Excitatórias Pós-Sinápticas NMDA</i>	44
5.2.4 <i>Correntes Inibitórias Pós-Sinápticas GABA_A</i>	47
5.3 CORRENTES PÓS-SINÁPTICAS ESPONTÂNEAS.....	50
5.3.1 <i>Correntes Excitatórias Pós-Sinápticas Espontâneas</i>	50
5.3.2 <i>Correntes Inibitórias Pós-Sinápticas Espontâneas</i>	52
5.4 GLICINA.....	56
6 DISCUSSÃO.....	65
6.1 PROPRIEDADES PASSIVAS.....	66
6.2 CORRENTES EXCITATÓRIAS PÓS-SINÁPTICAS NÃO-NMDA.....	67
6.3 CORRENTES EXCITATÓRIAS PÓS-SINÁPTICAS NMDA.....	69
6.4 CORRENTES INIBITÓRIAS PÓS-SINÁPTICAS GABAÉRGICAS.....	71
6.5 GLICINA.....	72
7 CONCLUSÕES.....	77
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	78

LISTA DE ABREVIATURAS

[X]_E – concentração extracelular de um íon

[X]_I – concentração intracelular de um íon

ACPD – ácido aminociclopentano –1,3 – dicarboxílico

ACSF – fluido cérebro espinhal artificial

AMPA - α -amino-3-hidroxi-5metil-4-isoxazolepropionato

ATP – trifosfato de adenosina

CEPS – correntes excitatórias pós-sináptica

CEPSe - correntes excitatórias pós-sináptica espontâneas

CIPS – correntes inibitórias pós-sinápticas

CIPSe - correntes inibitórias pós-sinápticas espontâneas

CPS – correntes pós-sinápticas

CPSe - correntes pós-sinápticas espontâneas

CPSG - correntes pós-sinápticas glutamatérgicas

CPSGe - correntes pós-sinápticas glutamatérgicas espontâneas

DL-AP5 - ácido DL-2-Amino-5-fosfonopentanóico

DNA – ácido desoxirribonucléico

cDNA – DNA codificadores

DNQX - 6,7-Dinitroquinolixalina-2,3 Diona

EC₅₀ – concentração onde a resposta é metade da resposta máxima

EGTA – ácido etileno glicol-bis(β -aminoetil éter)-N, N, N',N'-tetracético

EPM – erro padrão da média

GABA – Ácido - γ - amino butírico

GABA_A – receptor GABA do tipo A

GluR – subunidades dos receptores AMPA e kainato

GLYT – transportadores de glicina

HEPES – ácido (N-[2-hidroxietil]piperazino-N'-[2-etanosulfônico])

I_E – corrente estacionária

L-689-560 - *trans*-2-Carboxi-5,7-dicloro-4-fenilaminocarbonil amino-1,2,3,4-tetrahydroquinolina

MK-801 – maleato de dizocilpina 5 – metil – 10,11 – diidro – 5H – dibenzol cicloheptano

NMDA – Ácido – N – metil-D – aspártico

NR – subunidades do receptor NMDA

NTS – núcleo do trato solitário

PEPS – potenciais excitatórios pós-sinápticos

Rglu – receptores glutamatérgicos

R_I – resistência de entrada (*input*)

RNA_m – ácido ribonucléico mensageiro

R_P – resistência de pipeta

R_S – resistência em série

SNC – sistema nervoso central

TS – trato solitário

RESUMO

O núcleo do trato solitário (NTS), localizado no bulbo dorso medial, é o local do primeiro contato sináptico de várias fibras aferentes viscerais, incluindo aquelas dos sistemas cardiovascular, respiratório, gustatório e gastrointestinal. O NTS subpostremal, região do NTS comissural que se estende do óbex até a ponta posterior da área postrema, tem importante participação na integração da informação aferente cardiopulmonar. Os receptores glutamatérgicos, NMDA (ácido - *N* - metil-*D* - aspártico) e não-NMDA, e GABAérgico, GABA_A (receptores do tipo A do ácido - γ - amino butírico) são os principais envolvidos na neurotransmissão no NTS, apesar de haver várias outras substâncias neurotransmissoras/moduladoras identificadas dentro do núcleo. O complexo canal-receptor NMDA necessita da ligação de dois agonistas, glutamato e glicina, para sua abertura. Enquanto o glutamato é considerado o agonista propriamente dito, a glicina, tida como co-agonista, parece ter um efeito modulatório, dependendo de sua concentração na fenda sináptica. Se a constante de dissociação da glicina do seu sítio no receptor NMDA for menor que a sua concentração na fenda sináptica, o sítio estará saturado e a modulação da neurotransmissão glutamatérgica NMDA pela glicina exógena, ou por aquela liberada sinápticamente, não será possível. O nível de saturação do sítio da glicina varia nas diferentes regiões do SNC e depende fundamentalmente (1) da expressão dos transportadores de glicina (GLYT1/GLYT2) que podem manter a concentração deste aminoácido no microambiente da fenda sináptica NMDA em baixos níveis e (2) das subunidades que compõem o receptor NMDA. Neste trabalho nós investigamos a transmissão sináptica no NTS subpostremal e,

particularmente, se o sítio da glicina nos receptores NMDA é ou não saturado de maneira que possamos inferir se a glicina pode atuar como um modulador da neurotransmissão NMDA. Empregamos a técnica de *patch clamp* em fatias transversais do tronco encefálico de ratos Wistar de 30-35 dias de vida. Os resultados obtidos mostram que: (1) as correntes pós-sinápticas espontâneas e evocadas por estimulação do trato solitário são resultado da ativação de receptores NMDA, não-NMDA e GABA_A, (2) os receptores NMDA e não-NMDA devem estar co-localizados, (3) os receptores NMDA são fracamente bloqueados pelo Mg²⁺ em voltagens próximas do potencial de repouso, sugerindo uma importante participação destes receptores na sinalização sináptica, (4) além do Cl⁻, outro íon, talvez o bicarbonato, permeia o complexo canal-receptor GABA_A e (5) o sítio da glicina no receptor NMDA não se encontra saturado, sugerindo que a glicina pode atuar como um modulador da neurotransmissão glutamatérgica, via receptores NMDA, no NTS subpostremal.

ABSTRACT

The nucleus of the *tractus solitarius* (NTS), located in the medulla oblongata, is the first point of synaptic contact for several visceral afferent fibers, including those from the cardiovascular, respiratory and gastrointestinal systems. The subpostremal NTS, the region of the commissural NTS extending from the obex to the posterior tip of the area postrema, plays an important role in the integration of the cardiopulmonary afferent information. Although several neurotransmitter/modulator substances have been identified in the nucleus, glutamatergic, NMDA and non-NMDA, and GABAergic, GABA_A, are the main receptors involved in the neurotransmission. The NMDA receptor channel complex needs the binding of two agonists, glutamate and glycine, for its efficient opening. While the glutamate plays the neurotransmitter role, glycine appears to play a more modulatory function depending on its concentration at the synaptic cleft. If the concentration of glycine is higher than the glycine dissociation constant at its site on the NMDA receptor, this site will be saturated and the modulation of the NMDA response by exogenous or synaptically released glycine is not possible. The saturation level of the glycine-binding site varies among different CNS regions and depends fundamentally on (1) expression of the glycine transporters (GLYT1/GLYT2), which can maintain the concentration of glycine in the NMDA synapse at low levels and (2) the type of NMDA receptor subunits. In this work we have investigated the synaptic transmission in the subpostremal NTS and, particularly, if the glycine binding site of the NMDA receptor is saturated or not, so we could infer if glycine could act as a modulator of the NMDA neurotransmission. We have applied the patch clamp technique in brainstem transversal slices of 30-

35 days old Wistar rats. The results show that: (1) both the spontaneous postsynaptic currents and those evoked by solitary tract stimulation are due to NMDA, non-NMDA and GABA_A receptors activation, (2) The NMDA and non-NMDA receptors are co-localized at the same synaptic site, (3) the NMDA receptors are weakly blocked by Mg²⁺ at voltages close to the resting membrane potential, suggesting that this receptor can play an important role in synaptic signaling, (4) besides Cl⁻, another ion, possibly bicarbonate, permeates the channel-receptor GABA_A complex and (5) the glycine binding site of the NMDA receptor is not saturated, suggesting that glycine can act as a modulator of the excitatory NMDA transmission in the subpostremal NTS.

1 INTRODUÇÃO

Uma das funções do sistema nervoso central (SNC) é manter a constância do meio interno. Esta função requer a recepção de informações que reflitam o estado interno do organismo e a produção de padrões de respostas homeostáticas viscerais, endócrinas e comportamentais apropriadas (Ergene *et al.*, 1994). Numerosos estudos têm demonstrado que o núcleo do trato solitário (NTS) está envolvido na regulação de várias funções autonômicas complexas, recebendo e integrando múltiplas informações viscerossensoriais (Lawrence e Jarrott, 1996).

O núcleo do trato solitário é o local do primeiro contato sináptico de uma variedade de fibras aferentes viscerais, além de receber aferências do sistema sensorial somático (Felder e Mifflin, 1994). Ele responde não somente aos sinais de suas aferências nervosas, mas também a fatores humorais presentes no sangue e no fluido cerebrospinal, sendo esta relação facilitada por sua localização adjacente à área postrema, um órgão circumventricular no qual a barreira hematoencefálica está ausente (Barraco, 1994). O NTS é uma estrutura cilíndrica, alongada no sentido rostro-caudal e localizada no bulbo dorsomedial, estendendo-se da borda caudal do núcleo motor facial, na junção pontino-bulbar, até o nível da primeira vértebra cervical (Maley, 1994). A porção rostral do núcleo está presente em ambos os lados do bulbo, mas à altura do óbex¹ os dois lados

¹ O óbex é uma estrutura anatômica visualizada na superfície dorsal do bulbo. Retirando-se a tela coroídea, a qual constitui o véu bulbar caudal, a fim de expor o assoalho do quarto ventrículo (ou fossa rombóide), os rebordos rotos desta porção do tecto ficam aderentes às margens laterais da

se fundem na linha média constituindo a porção comissural do núcleo (núcleo comissural de Cajal) (Van Giersbergen *et al.*, 1992). As informações periféricas dos sistemas cardiovascular, respiratório, gustatório e gastrointestinal chegam ao núcleo através das fibras contidas nos VII (facial), IX (glossofaríngeo) e X (vago) pares de nervos cranianos organizadas viscerotopicamente (Torvik, 1956; Contreras *et al.*, 1982; Hamilton e Norgren, 1984), apesar de haver alguma sobreposição. As fibras desses nervos entram bilateralmente no tronco encefálico, percorrem lateral e longitudinalmente o NTS e terminam em vários níveis rostrocaudais dentro do núcleo. Neste percurso intra-NTS este conjunto de fibras recebe o nome de trato solitário (TS); uma estrutura bilateral presente em toda a extensão do NTS, inclusive em sua porção comissural. O NTS subpostremal, a parte do NTS comissural que se estende do óbex até a ponta posterior da área postrema (Barraco *et al.*, 1992), é a principal região do núcleo para a integração da informação aferente cardiopulmonar (Barraco e El-Ridi, 1989; Nelson *et al.*, 1988). Além disso, esta região do NTS está envolvida também na regulação da secreção e da motilidade gástricas (Spencer e Talman, 1986) e na modulação da liberação de insulina (Dunbar *et al.*, 1992). O NTS comporta uma população heterogênea de neurônios em relação às características morfológicas e estima-se que o do rato contenha cerca de 42.000 células e 10^6 sinapses, sendo que um terço desses neurônios pode estar envolvido no barorreflexo (Palkovits, 1981).

porção caudal da cavidade unindo-se sobre o ângulo caudal da mesma, constituindo delgada lâmina triangular; o óbex.

As informações visceral e humoral são processadas e integradas no NTS com sinais que chegam de outras regiões regulatórias do cérebro envolvidas no controle cardiorrespiratório e digestivo e na regulação metabólica. Os sinais eferentes gerados pela circuitaria intrínseca do NTS são transmitidos, por meio de suas conexões com centros autonômicos do tronco encefálico, às vísceras ou transmitidos rostralmente para serem integrados em níveis mais elevados do neuroeixo, gerando respostas visceroendócrinas complexas e atividades comportamentais relacionadas com a nutrição (Barraco, 1994).

Enquanto muitas aferências para o NTS provêm de múltiplos sítios periféricos, as suas eferências, ao contrário, não deixam o SNC. Evidências anatômicas indicam que algumas das células do NTS são interneurônios com curtos axônios ramificando dentro do núcleo ou no núcleo adjacente dorsal do vago, enquanto outras se projetam para diferentes partes do SNC (Sawchenko, 1983). A maioria das conexões neuronais do NTS é bidirecional: as principais áreas do cérebro que se projetam para o NTS também recebem deste entradas neuronais diretas. As fibras do NTS terminam nos neurônios eferentes do vago; em neurônios eferentes pré-ganglionares na coluna espinhal; no bulbo ventrolateral; em estruturas pontinas; no hipotálamo e em várias partes do sistema límbico (Van Giersbergen *et al.*, 1992).

Assim, a entrada periférica aferente dos nervos vago e glossofaríngeo, apesar de ser ponto crucial da inervação do NTS em relação ao reflexo barorreceptor, na verdade não está isolada. Existem também vastas projeções de outras regiões do cérebro que podem exercer controle modulatório sobre os neurônios barossensíveis do NTS. Em concordância com esses dados

anatômicos das conexões do NTS estão os resultados de estudos funcionais e eletrofisiológicos, que demonstram a habilidade de várias aferências em modular a atividade dos neurônios barossensíveis dentro do NTS (Lawrence e Jarrott, 1996).

1.1 Receptores Glutamatérgicos

O glutamato, juntamente com o aspartato, é o principal amino ácido excitatório do sistema nervoso dos vertebrados, e sua ação compreende o aumento na condutância a cátions da membrana celular (Iversen, 1984). Receptores glutamatérgicos (Rglu) são responsáveis pela maior parte da neurotransmissão excitatória no SNC dos mamíferos (Monaghan *et al.*, 1989). O glutamato e amino ácidos excitatórios relacionados (L-aspartato, L-homocisteato) podem ser excitotóxicos. Excessiva ativação dos Rglu durante situações de estresse para o cérebro, tais como a isquemia e os episódios epiléticos, conduz à morte os neurônios centrais (Ozawa *et al.*, 1998). A excitotoxicidade do glutamato pode também estar envolvida na gênese de várias doenças neurodegenerativas (Choi e Rothman, 1990). Ou seja, os Rglu estão intimamente envolvidos na fisiologia e na patologia das células cerebrais.

Os receptores glutamatérgicos são divididos em duas classes distintas: os metabotrópicos e os ionotrópicos. Os Rglu ionotrópicos contêm canais iônicos seletivos a cátions e são tradicionalmente subdivididos em três grupos, de acordo com a especificidade dos agonistas: α -amino-3-hidroxi-5metil-4-isoxazolepropionato (AMPA); kainato e ácido *N*-metil-*D*-aspártico (NMDA). Os

receptores AMPA e kainato, por compartilharem muitas de suas propriedades farmacológicas e funcionais, são conjuntamente denominados de não-NMDA. Os Rglu metabotrópicos ativam uma cascata bioquímica intracelular, envolvendo a proteína G, de maneira a modular a produção de mensageiros intracelulares (Salt e Eaton, 1996; Sugiyama *et al.*, 1987). O receptor glutamatérgico metabotrópico pode ser ativado por glutamato, quisqualato ou ainda por um agonista mais seletivo, o ácido *trans*-DL-1-amino-1,3-ciclopentano-dicarboxílico (Palmer *et al.*, 1989) e não é bloqueado por antagonistas dos receptores ionotrópicos, como o ácido quinurênico (McLennan e Liu, 1982).

Estudos de expressão gênica e clonagem molecular têm revelado que a diversidade dos Rglu é muito maior que aquela esperada de estudos eletrofisiológicos e farmacológicos. Pelo menos 14 DNAs codificadores de Rglu ionotrópicos e 8 de Rglu metabotrópicos já foram identificados no sistema nervoso de mamíferos. Dos 14 DNAs codificadores para Rglu ionotrópicos, têm-se isolado 4 para subunidades do receptor AMPA (GluR1-4); 5 para subunidades do receptor Kainato (GluR5-7 e KA1-2) e 5 para subunidades do receptor NMDA (NR1, NR2A-2D) (Nakanishi, 1992). Mais recentemente uma nova família de subunidades de receptores NMDA, a NR3A/3B, foi identificada (Nishi *et al.*, 2001). A diversidade da composição molecular confere uma grande variabilidade funcional aos receptores glutamatérgicos ionotrópicos. Além da especificidade farmacológica e da composição molecular, estes receptores se diferenciam quanto às cinéticas de ativação e desativação. É bastante conhecido que as correntes de membrana mediadas por receptores não-NMDA, apresentam decurso temporal mais rápido que aquelas dos receptores NMDA.

1.2 Receptores NMDA

Embora os receptores para glutamato tenham sido descritos em vertebrados e invertebrados, os receptores do tipo NMDA são encontrados apenas em vertebrados. Os receptores NMDA apresentam vários domínios funcionais, dois dos quais são: um sítio específico para amino ácidos tais como o glutamato, o aspartato ou o próprio NMDA (Watkins e Evans, 1981), e um outro que é seletivo para certos amino ácidos neutros como a glicina e serina (Johnson e Ascher, 1987). Outros compostos que provavelmente regulam a atividade dos receptores NMDA incluem poliaminas (Benveniste e Mayer, 1993), H^+ (Tang *et al.*, 1990), Zn^{2+} , Cd^{2+} e agentes redutores e oxidantes (Aizenman *et al.*, 1989).

O receptor NMDA é um pentâmero derivado das subunidades NR1, NR2A-NR2D e NR3A, NR3B (Nishi *et al.*, 2001; Dingledine *et al.*, 1999). NR1 é a subunidade fundamental que confere as funções essenciais ao receptor NMDA e é expressa em todo o SNC. Em contraste, as outras subunidades mostram expressão mais limitada e conferem diversidade funcional aos receptores (Ozawa *et al.*, 1998). Usando técnicas de biologia molecular, Moriyoshi *et al.* (1991) clonaram a subunidade fundamental do receptor NMDA, NR1. Esta subunidade quando expressada em ovócitos de *Xenopus*, foi capaz de formar canais homoméricos que mostram características próprias dos receptores NMDA. Entretanto, as respostas de correntes foram muito menores que aquelas obtidas quando da expressão de canais nativos (RNAm do cérebro de ratos), sugerindo a existência de subunidades adicionais, formando receptores heteroméricos.

Outras quatro subunidades, NR2A-2D (também denominadas $\epsilon 1 - \epsilon 4$) foram clonadas (Kutsuwada *et al.*, 1992). Embora as subunidades NR2 não formem canais/receptores NMDA funcionais *per se*, quando uma delas é co-expressada com NR1, as respostas de correntes aumentam várias vezes em relação àquelas obtidas com receptores homoméricos NR1. Os receptores NMDA gerados por co-expressão de subunidades NR1 e NR2 são funcionalmente mais similares aos receptores NMDA nativos. Segundo Luo *et al.* (1997) os receptores NMDA do córtex cerebral de ratos são, no geral, complexos terciários (NR1/NR2A/NR2B) e em menores proporções binários (NR1/NR2A). Pouco se sabe sobre a subunidade NR3. A subunidade NR3A é expressa em todo o SNC de ratos durante o desenvolvimento atingindo níveis máximos na primeira semana de vida pós-natal. Entretanto, os níveis de expressão decrescem gradualmente no animal adulto (Ciabarra *et al.*, 1995; Sucher *et al.*, 1995). A subunidade NR3B é expressada predominantemente em neurônios motores. A co-expressão de NR3A ou B com NR1 em ovócitos de *Xenopus*, formam receptores glicinérgicos excitatórios que não são afetados por glutamato ou NMDA (Chatterton *et al.*, 2002).

Os receptores NMDA são permeáveis a cátions, excluindo os ânions do poro. O sódio e o potássio parecem ser igualmente permeantes (Dingledine *et al.*, 1999). Além disso, os receptores NMDA são permeáveis ao cálcio (McDermott *et al.*, 1986), e a proporção da corrente carregada por este íon (corrente fracional de cálcio) depende da composição do receptor. A corrente fracional de cálcio através de canais NMDA recombinantes foi de 11 e 8,2 % para receptores

NR1/NR2A e NR1/NR2C, respectivamente (Burnashev *et al.*, 1995). Uma característica única dos receptores NMDA é a sua dupla dependência funcional: do agonista e do potencial de membrana. A ligação de dois agonistas, glutamato e glicina, é necessária para a ativação do receptor (Kleckner e Dingledine, 1988). Enquanto o glutamato é o neurotransmissor propriamente dito, a glicina parece ter uma função mais modulatória, dependendo de sua concentração na fenda sináptica (Danysz e Parsons, 1998). A dependência de voltagem dos receptores NMDA está relacionada ao bloqueio do canal por concentrações submilimolares de Mg^{2+} extracelular, e não por uma alteração conformacional dependente de voltagem (Nowak *et al.*, 1984). Em concentrações fisiológicas de Mg^{2+} (~1 mM), a corrente para dentro mediada por receptores NMDA é máxima entre -20 e -40 mV, e é reduzida em potenciais hiperpolarizados, de maneira que a relação *I-V* exibe um *slope* negativo entre -30 e -80 mV. Este *slope* negativo é eliminado (a relação *I-V* torna-se linear) com a remoção do Mg^{2+} da solução extracelular (Mayer *et al.*, 1984; Nowak *et al.*, 1984). Dessa forma, em potenciais de repouso da membrana os receptores NMDA estão bloqueados pelo Mg^{2+} extracelular em maior ou menor grau dependendo das subunidades que o compõem. Entretanto, quando neurônios são despolarizados, por exemplo, por ativação dos receptores não-NMDA pós-sinápticos, o bloqueio pelo Mg^{2+} dependente de voltagem é liberado, permitindo influxo de íons através dos receptores NMDA ativados. Os receptores NMDA que contêm subunidades NR2C ou NR2D são menos sensíveis ao Mg^{2+} do que aqueles contendo NR2A ou NR2B (Monyer *et al.*, 1992, 1994; Kuner e Schoepfer, 19967; Wollmuth *et al.*, 1998).

1.3 Neurotransmissão no NTS

Em concordância com o grande número de projeções que os neurônios do NTS recebem, vários neurotransmissores/moduladores, como as aminas biogênicas, amino ácidos e neuropeptídeos, estão presentes dentro do núcleo, conforme sugerido por experimentos de microinjeção, imunocitoquímica e registros eletrofisiológicos (Van Giersbergen *et al.*, 1992). Algumas dessas substâncias podem ser liberadas da via aferente tanto para atuar na célula pós-sináptica, como para atuar em autorreceptores na membrana pré-sináptica, de maneira a controlar a liberação do neurotransmissor pela via aferente (Andresen e Kunze, 1994). Embora exista uma grande variedade de neurotransmissores/moduladores dentro do NTS, os amino ácidos glutamato e GABA são considerados os principais neurotransmissores (Grabauskas e Bradley, 2003; Bonham e Chen, 2002; Doyle e Andresen, 2001). Várias evidências sugerem que o glutamato é o neurotransmissor liberado pelas fibras aferentes de primeira ordem (Talman *et al.*, 1980; Doyle e Andresen, 2001) e que o mesmo atua em receptores ionotrópicos do tipo NMDA e não-NMDA em neurônios de segunda ordem dentro do NTS (Aylwin *et al.*, 1997; Bonham e Chen, 2002). Por outro lado, GABA seria liberado apenas por ativação de interneurônios GABAérgicos (Kawai e Senba, 1999; Terai *et al.*, 1998; Xia e Haddad, 1992; Loewy, 1990).

Talman *et al.* (1980) foram os primeiros a sugerir o glutamato como o principal transmissor liberado pelas aferências cardiovasculares, dando origem à “hipótese do glutamato”. Tal sugestão baseou-se em resultados de experimentos

de microinjeções de glutamato, ou de seus análogos, dentro do NTS de ratos anestesiados levando à hipotensão e bradicardia. Outras indicações de que as aferências barorreceptoras arteriais utilizam o glutamato como neurotransmissor vieram de experimentos em gatos, nos quais a secção dos nervos glossofaríngeo e vago resultou em uma marcada redução nos níveis de glutamato (e GABA) no NTS (Dietrich *et al.*, 1982). Granata *et al.* (1984) também demonstraram que a estimulação elétrica do nervo vago de ratos aumentou os níveis de glutamato dentro do núcleo. Posteriormente, Kubo e Kihara (1988) mostraram que microinjeções de NMDA na área medial do NTS de ratos anestesiados causaram hipotensão e bradicardia e que o antagonista do receptor NMDA, DL-AP5, reduziu a resposta cardiovascular para o NMDA. Estudos mais recentes têm confirmado o envolvimento funcional dos receptores NMDA na modulação dos neurônios barossensíveis do NTS, uma vez que a microinfusão de NMDA no NTS medial de ratos sob anestesia por uretana, também provocou hipotensão e bradicardia (Tian e Hartle, 1994). Por seu lado, técnicas de biologia molecular têm demonstrado a presença de ambos receptores, NMDA e não-NMDA nos corpos celulares dos neurônios do NTS (Sato *et al.*, 1993; Watanabe *et al.*, 1994).

A hipótese de glutamato ser o neurotransmissor primário das aferências dos barorreceptores foi questionada quando Talman (1989) observou que a microinjeção intra-NTS, em ratos anestesiados, de ácido quinurênico, um antagonista glutamatérgico, bloqueou a resposta para a microinjeção de NMDA e ácido caínico intra-NTS, assim como o reflexo barorreceptor evocado por estimulação elétrica do nervo aórtico, mas não afetou a resposta para o glutamato exógeno microinjetado no NTS. Não obstante, foi também demonstrado por

Talman *et al.* (1981) que o dietilester glutamato, um antagonista dos amino ácidos excitatórios, reduz a resposta cardiovascular produzida pelo glutamato quando microinjetado dentro do NTS, e os estudos de Le Galloudec *et al.* (1989), também realizados em ratos anestesiados, demonstraram que a resposta para o glutamato microinjetado dentro do NTS foi bloqueada pela administração prévia de ácido quinurênico. Outros estudos têm mostrado que a estimulação elétrica das aferências vagais libera L-glutamato dentro do NTS (Granata e Reis, 1983; Granata *et al.*, 1984) e estudos de autorradiografia têm mostrado aí a presença de sítios de ligação para [³H]glutamato (Monaghan e Cotman, 1985), corroborando a hipótese do glutamato. Em meio a esses dados conflitantes, levantou-se a hipótese de que apenas parte dos receptores glutamatérgicos esteja integrada ao barorreflexo no NTS e que a resposta cardiovascular produzida pelo glutamato exógeno difere daquela produzida pela ativação das aferências dos barorreceptores (Leoni e Gordon, 1989; Talman, 1989).

Machado e Bonagamba (1992) observaram que microinjeções bilaterais de L-glutamato intra-NTS, em ratos acordados, produziram aumento dependente de concentração da pressão arterial média e, no mesmo grupo de animais, agora sob anestesia com uretana (ou cloralose) o glutamato provocou queda da pressão arterial média. Dessa forma, se em ratos anestesiados as alterações na pressão arterial média evocadas pelo glutamato microinjetado no NTS assemelha-se àquela da ativação das aferências barorreceptoras, em ratos não anestesiados a resposta é oposta, indicando que a anestesia pode ter grande influência na resposta cardiovascular para o glutamato. Além disso, a resposta de hipertensão para o glutamato microinjetado no NTS de ratos não anestesiados é

acompanhada por bradicardia dependente de concentração e o ácido quinurênico bloqueia ambas as respostas (Colombari *et al.*, 1994). Trabalhos mais recentes indicam que o processamento do componente parassimpatoexcitatório do barorreflexo (bradicardia) no NTS é mediado por receptores NMDA e não-NMDA, enquanto que o simpatoinibitório (hipotensão) parece ser apenas parcialmente mediado por esses receptores ionotrópicos e pode envolver receptores glutamatérgicos metabotrópicos ou um outro neurotransmissor que não o glutamato (Machado *et al.*, 2000).

Alguns estudos têm demonstrado que os receptores ionotrópicos não-NMDA parecem ser os principais responsáveis pela transmissão sináptica das baroafêrências no NTS (Gordon e Leoni, 1991; Andresen e Yang, 1990). O bloqueio dos receptores NMDA no NTS foi menos efetivo em inibir a resposta cardiovascular evocada por estimulação elétrica do nervo aórtico do que o bloqueio dos receptores não-NMDA. Enquanto o bloqueio dos receptores não-NMDA, com DNQX, foi capaz de abolir o barorreflexo, o DL-AP-5 apenas atenuou a resposta barorreflexa em 35 %, uma queda significativa somente quando o nervo aórtico foi estimulado em alta freqüência, sugerindo que os receptores NMDA no NTS possam exercer uma função modulatória na transmissão da informação barorreceptora aferente, particularmente em condições de alta freqüência de estímulos (Gordon e Leone, 1991).

É provável que os receptores glutamatérgicos metabotrópicos também estejam envolvidos na transmissão sináptica das aferências barorreceptoras no NTS (Pawloski-Dahm e Gordon, 1992). A administração de ACPD [agonista dos receptores metabotrópicos (Palmer *et al.*, 1989; Manzoni *et al.*, 1990)] intra-NTS

produz efeitos cardiovasculares similares àqueles evocados pela administração de glutamato e que não são bloqueados pelo ácido quinurênico, um antagonista não seletivo dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos (Pawloski-Dahm e Gordon, 1992; Machado e Bonagamba, 1998).

Estudos eletrofisiológicos, *in vitro*, têm demonstrado a participação de ambos os subtipos de receptores, NMDA e não-NMDA, na transmissão aferente no NTS (Brooks e Spyer, 1993; Aylwin *et al.*, 1997, 1998). A estimulação do TS em fatias transversais do tronco encefálico de ratos evocou potenciais excitatórios pós-sinápticos (PEPS) nos neurônios do NTS. Em 57 % desses neurônios os PEPS foram bloqueados por DNQX. Nos outros 43 % dos neurônios, a duração e a amplitude dos PEPS foram aumentadas quando o Mg^{2+} foi retirado do banho e foram bloqueados pelo antagonista do receptor NMDA, DL-AP5 (Brooks e Spyer, 1993). Trabalhos de Aylwin *et al.* (1997, 1998) demonstraram que as correntes excitatórias pós-sinápticas (CEPS) evocadas por estimulação tanto do TS quanto da área postrema, apresentam dois componentes com padrões temporais e relações *I-V* distintos. Há um componente rápido, que atinge um pico em 4,2 ms após o início da CEPS; decai rapidamente para uma menor amplitude em 20 ms após o pico da resposta; apresenta relação *I-V* linear e é abolido por DNQX, sugerindo ser mediado por receptores não-NMDA. O outro componente é lento e mais claramente observado 20 ms após o pico da resposta. Tem duração maior que 60 ms, a relação *I-V* não é linear e sua amplitude é atenuada por DL-AP5, sugerindo agora uma mediação por receptores NMDA. Por outro lado, em fatias longitudinais os PEPS observados no NTS e evocados com estimulação do TS, foram bloqueados por DNQX e resistentes ao DL-AP5 (Andresen e Yang, 1990).

Em neurônios isolados do NTS de ratos, o NMDA evoca correntes que são bloqueadas tanto por antagonistas competitivos do receptor NMDA (DL-AP5), como por antagonistas não competitivos (MK-801, Zn^{2+} e Mg^{2+}) (Nakagawa *et al.*, 1990). Por meio de registros eletrofisiológicos em fatias do tronco encefálico de ratos, O'Brien *et al.* (1997), evidenciaram que os receptores NMDA e não-NMDA estão co-localizados em motoneurônios do hipoglosso. Além disso, há algumas sinapses excitatórias, tais como aquelas da medula espinhal (Dale e Roberts, 1985), que trabalham com um duplo sistema de receptores: não-NMDA que geram resposta rápida de despolarização, e NMDA que são ativados após um certo nível de potencial de membrana ser atingido. Estas interações podem também estar presentes no NTS.

Estudos de eletrofisiologia também mostram um provável envolvimento dos receptores glutamatérgicos metabotrópicos em algumas das ações do glutamato no NTS (Glaum e Miller, 1992). Em fatias transversais do tronco encefálico o ACPD despolarizou neurônios localizados medialmente ao TS na região subpostremal do NTS. O ACPD também foi capaz de produzir correntes da ordem de 20 pA nos mesmos neurônios sob condições de *voltage-clamp* e na presença de DNQX, APV e bicuculina. Estes efeitos foram reproduzidos pelo glutamato (Glaum e Miller, 1992). Outra substância envolvida na neurotransmissão no NTS é o ácido γ - aminobutírico (GABA). Este aminoácido é o principal neurotransmissor inibitório no SNC dos vertebrados e ativa três classes diferentes de receptores: GABA_A, B, C. O receptor do tipo GABA_A é um pentâmero formado pela combinação de várias subunidades, incluindo α (1 – 6), β (1 – 4), γ (1 – 3), δ

(1) e ϵ (1) (Chebid e Johnston, 2000). Devido à possibilidade de muitas configurações diferentes, os receptores GABA_A são extremamente heterogêneos e sua composição pode diferir não apenas em partes diferentes do cérebro ou em diferentes células, mas também na mesma célula (Mehta e Ticku, 1999). A atividade do receptor GABA_A é modulada por vários ligantes endógenos, tais como o Zn²⁺ e o H⁺. Além disso, esse receptor é um dos principais alvos de agentes terapêuticos, incluindo ansiolíticos, sedativos, hipnóticos, anestésicos e relaxantes musculares (Mehta e Ticku, 1999). Vários trabalhos têm demonstrado claramente que a neurotransmissão GABAérgica apresenta função importante no controle autonômico, tal como a modulação da atividade cardiorrespiratória (Loewy, 1990). Estudos de eletrofisiologia mostram que a estimulação das aferências periféricas do NTS evoca correntes glutamatérgicas e GABAérgicas nos neurônios do núcleo (Grabauskas e Bradley, 2003; Bonham e Chen, 2002; Doyle e Andresen, 2001).

Assim, resumindo o exposto acima, os resultados de estudos *in vivo* e *in vitro* sugerem que os principais receptores envolvidos na neurotransmissão no NTS são NMDA, não-NMDA e GABA_A, podendo haver complexa inter-relação entre eles, sendo possível que os receptores não-NMDA se constituam na principal base para a transmissão sináptica, e os receptores NMDA e glutamatérgico metabotrópico atuem modulando essa transmissão (Andresen e Kunze, 1994).

1.4 A Glicina no NTS

O amino ácido glicina é um dos principais transmissores inibitórios do SNC e sua ação leva a um aumento da condutância ao íon cloreto (Iversen, 1984), com conseqüente hiperpolarização da célula. Os receptores glicinérgicos são bloqueados pela estricnina e por isso são conhecidos como “receptores glicinérgicos sensíveis à estricnina”. O envolvimento deste aminoácido na regulação cardiovascular no NTS é controverso (Van Giensbergen *et al.*, 1992). A glicina está presente no NTS em altas concentrações e é liberada no NTS de uma maneira dependente de cálcio, como mostrado em vários estudos (Kubo e Kihara, 1987; Meeley *et al.*, 1989; Talman *et al.*, 1992). Embora a liberação sináptica de glicina no NTS não esteja claramente demonstrada, várias evidências sugerem a presença de terminais e receptores glicinérgicos nesta estrutura (Cassel e Talman, 2000; Saha *et al.*, 1999; Takahama *et al.*, 1997).

A microinjeção de glicina na área medial do NTS de ratos produz aumento da pressão arterial e da frequência cardíaca (Kubo e Kihara, 1987). Não obstante, Talman e Robertson (1989) encontraram que a microinjeção de glicina no NTS de ratos anestesiados, assim como o glutamato, produz queda da pressão arterial e da frequência cardíaca de uma maneira dependente de concentração, sendo estes efeitos bloqueados pela estricnina. O efeito da glicina nas respostas cardiovasculares para o glutamato microinjetado no NTS foi investigado por Mauad *et al.* (1995). A administração prévia de glicina intra-NTS de ratos não anestesiados foi capaz de bloquear a resposta pressora, mas não a de bradicardia, evocadas pela microinjeção de glutamato. Estes resultados sugerem que a glicina pode ter um efeito modulatório mais intenso no

componente simpatoexcitatório (resposta pressora) do que no componente parassimpático (bradicardia) ativado pela microinjeção de glutamato dentro do NTS (Mauad *et al.*, 1995). Estudos *in vitro* também evidenciam a participação da glicina na atividade dos neurônios do NTS. Em fatias transversais do tronco encefálico, a administração de glicina ao banho provocou liberação de acetilcolina de uma maneira dependente de concentração, sendo esta resposta bloqueada pela estricnina, sugerindo a presença de receptores glicinérgicos sensíveis à estricnina (Talman *et al.*, 1994). Em neurônios agudamente dissociados do NTS a glicina evocou correntes de influxo (as quais foram sensíveis à estricnina - 1 μM) de maneira dependente de concentração (de 3 μM até 3.000 μM). A relação *I-V* da corrente evocada pela glicina é quase linear e o potencial de reversão, por estar próximo do potencial de equilíbrio do íon cloreto, indica que a corrente foi carregada por este íon (Takahama *et al.*, 1997).

1.5 A Glicina como Neuromodulador

A glicina, além de ser um dos principais neurotransmissores inibitórios do SNC, tem uma importante participação na ação excitatória glutamatérgica. Johnson e Ascher (1987), trabalhando em culturas primárias de neurônios corticais e diencefálicos de camundongos, demonstraram que a glicina, além de mediar a resposta inibitória por meio de receptores sensíveis à estricnina, pode também facilitar a transmissão excitatória via receptores NMDA. Naquela preparação, a glicina potencializou a resposta evocada tanto pelo NMDA quanto pelo glutamato, e este aumento não foi bloqueado pela estricnina. Além disso, a

glicina não alterou a resposta para o quisqualato e cainato (Johnson e Ascher, 1987). Experimentos feitos em motoneurônios do hipoglosso, em fatias do tronco encefálico, mostraram que a glicina e a D-serina (mas não a L-serina) aumentam o componente NMDA das correntes excitatórias pós-sinápticas espontâneas (Berger *et al.*, 1998; Berger e Isaacson, 1999). Há evidências que a ocupação do sítio da glicina por um agonista é essencial para a ativação do receptor NMDA, sendo a glicina considerada um co-agonista (Kleckner e Dingledine, 1988), e que o sítio da glicina reside na subunidade NR1 e o do glutamato na NR2 do receptor NMDA (Kuryatov *et al.*, 1994; Anson *et al.*, 1998). A cinética de ativação do receptor NMDA por glutamato e glicina mostra que são necessárias duas moléculas de glutamato e duas de glicina para sua ativação em neurônios hipocâmpais, e sugere a existência de uma interação alostérica negativa entre os sítios da glicina e do glutamato, de maneira que o acoplamento do glutamato diminui a afinidade do receptor NMDA para a glicina em aproximadamente sete vezes (Benveniste *et al.*, 1990; Benveniste e Mayer, 1991). Não obstante, experimentos com radioligantes não confirmam esta cooperatividade negativa entre os dois sítios. Ao contrário, mostram que o glutamato aumenta a ligação da [³H]glicina (Monaghan *et al.*, 1990) e a glicina aumenta a ligação do [³H]glutamato (Monaghan *et al.*, 1988). A glicina pode também regular a dessensibilização dos receptores NMDA. A aplicação de NMDA (ou glutamato) a neurônios hipocâmpais em cultura evoca correntes que dessensibilizam lentamente, em cerca de 250 ms. A adição de glicina reduz em muito essa dessensibilização do receptor NMDA e não altera a do AMPA e cainato (Mayer *et al.*, 1989).

A função regulatória da glicina na atividade dos receptores NMDA é incerta, porque a concentração da glicina na fenda sináptica é desconhecida e porque diferentes isoformas dos receptores NMDA apresentam diferentes afinidades para a mesma. A concentração da glicina medida nos espaços extracelulares (por microdiálise) e no fluido cérebro espinhal é da ordem de poucos micromolares (Westergren *et al.*, 1994) e pode não refletir a concentração da glicina no microambiente das sinapses glutamatérgicas (Berger *et al.*, 1998; Berger e Isaacson, 1999). A concentração extracelular de glicina é controlada por pelo menos dois transportadores (Zafra *et al.*, 1995), o GLYT1 que apresenta três isoformas (GLYT1a, GLYT1b e GLYT1c) (Kim *et al.*, 1994) e o GLYT2 que está presente seletivamente no tronco encefálico e na coluna espinhal (Liu *et al.*, 1993), áreas do SNC onde os receptores glicinérgicos sensíveis à estricnina são mais abundantes (Zafra *et al.*, 1995). Outros estudos têm demonstrado que a expressão de mRNA que codifica GLYT1 é relativamente alta em regiões do SNC tais como o córtex, o hipocampo ou o bulbo olfatório (Guastella *et al.*, 1992), regiões estas onde não tem sido encontrado nenhum neurônio glicinérgico inibitório, sugerindo então uma função adicional para GLYT1. No cérebro de ratos há uma sobreposição na distribuição dos mRNAs que codificam os transportadores da glicina e os receptores NMDA, sugerindo que a concentração de glicina nas sinapses que contêm receptores NMDA possa ser regulada (Smith *et al.*, 1992). Levantou-se, a partir daí, a hipótese de que os GLYT1 apresentem uma função regulatória nos níveis de glicina na neurotransmissão mediada por receptores NMDA, controlando a concentração de glicina na fenda sináptica (Smith *et al.*, 1992). Trabalhos de Supplisson e Bergman (1997) demonstraram

que os transportadores da glicina podem diminuir a concentração local de glicina em muitas ordens de magnitude, em espaços restritos. Estudos de imunocitoquímica mostram uma alta imunorreatividade para GLYT1 no NTS, concentrada nos astrócitos, e moderada para baixa imunorreatividade para GLYT2 (Zafra *et al.*, 1995).

Os D-amino ácidos, como a D-serina, podem também potencializar as respostas excitatórias do receptor NMDA, atuando no sítio da glicina insensível à estricnina (Kleckner e Dingledine, 1988). A presença da D-serina tem sido registrada no cérebro de ratos e a sua distribuição é paralela àquela dos receptores NMDA (Hashimoto *et al.*, 1992, 1993). Schell *et al.* (1995) sugeriram que o ligante endógeno predominante do sítio da glicina nos receptores NMDA é a D-serina e não a glicina. Em culturas de células gliais do córtex cerebral de ratos a liberação de D-serina é estimulada por agonistas dos receptores glutamatérgicos não-NMDA. Assim, levantou-se a hipótese de que o glutamato liberado pela terminação glutamatérgica pré-sináptica, não só atuaria no receptor NMDA da membrana pós-sináptica, mas também em receptores não-NMDA de astrócitos circundantes à sinapse, os quais em resposta liberariam D-serina e esta atuaria no sítio da glicina do receptor NMDA da membrana pós-sináptica, potencializando a transmissão excitatória (Schell *et al.*, 1995).

Alguns estudos *in vivo* e *in vitro* investigaram o sítio da glicina do receptor NMDA e sugeriram que a saturação do mesmo depende da região do SNC. Se a concentração de glicina é maior que a constante de dissociação da glicina no seu sítio no receptor NMDA, este sítio estará saturado e a modulação da resposta NMDA por glicina exógena ou por aquela liberada sinápticamente não é possível

(Berger e Isaacson, 1999). Enquanto alguns estudos demonstram que a aplicação exógena de glicina potencializa a resposta NMDA, sugerindo que a concentração de glicina não é saturante (Ahmadi *et al.*, 2003; Martina *et al.*, 2003; Wilcox *et al.*, 1996), outros sugerem que a glicina não modula a resposta NMDA (Fletcher *et al.*, 1989; Obrenovitch *et al.*, 1997). A falta da ação da glicina sugere que níveis saturantes de glicina extracelular podem ser encontrados em alguns receptores NMDA. Essas diferenças na sensibilidade à glicina podem refletir variações regionais na composição das subunidades dos receptores NMDA, assim como variações regionais no tipo e na densidade dos transportadores da glicina (Berger e Isaacson, 1999).

O EC_{50} da glicina para receptores NMDA heteroméricos varia de 100 nM até 3 μ M (McBain e Mayer, 1994). As subunidades que compõem os receptores NMDA variam com o desenvolvimento e entre diferentes regiões do SNC (Feldmeyer e Cull-Candy, 1996; Watanabe *et al.*, 1994).

Do exposto acima, pode-se inferir que a ação da glicina como um neuromodulador da transmissão NMDA depende da expressão local dos transportadores de glicina e do tipo de receptor NMDA envolvido. Estes dois fatores determinam o nível de saturação do sítio da glicina no receptor NMDA. Além disso, o efeito modulatório depende de uma fonte para prover glicina adicional à fenda sináptica NMDA.

1.6 Outros Neurotransmissores

Há, ainda, uma série de trabalhos, embora em menor número, indicando a participação de vários outros neurotransmissores/neuromoduladores no NTS, particularmente o GABA (Dietrich *et al.*, 1982; Van Giersbergen *et al.*, 1992; Talman *et al.*, 1980; Bousquet *et al.*, 1982), a serotonina (Callera *et al.*, 1997a,b), a acetilcolina (Ashworth-Preece *et al.*, 1998) e o ATP (Spyer *et al.*, 1997; Ueno *et al.*, 1992a,b; Ergene *et al.*, 1994b).

Do exposto anteriormente supõe-se que a neurotransmissão no NTS não deve ser exclusividade de um dado tipo de neurotransmissor, mas deve envolver a interação de vários deles, tanto no sentido de transmitir como de modular as informações que aí chegam.

2 OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo investigar a neurotransmissão no NTS subpostremal e, particularmente, se o sítio da glicina nos receptores NMDA do NTS subpostremal se encontra ou não saturado, de maneira que possamos inferir se a glicina pode atuar como um modulador da atividade dos receptores NMDA em neurônios do NTS.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados ratos *Wistar* com idade entre 30 e 35 dias de vida, de ambos os sexos, fornecidos pelo biotério central da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Os animais foram mantidos, no biotério do Departamento de Fisiologia, em um ciclo claro/escuro de 12 horas, água e alimentação *ad libitum*.

3.2 Preparação das Fatias (*slices*)

Os animais foram anestesiados (Nembutal; 50 mg/Kg de peso vivo, *i.p.*) e decapitados, aproximadamente ao nível da terceira ou quarta vértebra cervical, com o auxílio de uma tesoura. Em seguida fez-se craniotomia na linha média da estrutura dorsal da caixa craniana utilizando-se de uma pequena tesoura de pontas finas. O cérebro e o tronco encefálico foram rapidamente removidos e transferidos para um recipiente contendo solução de ACSF (fluido cérebro espinhal artificial, ver Soluções) a 0 °C, previamente equilibrada com mistura carbogênica (95% O₂ - 5% CO₂). O tempo desta operação não excedeu 2 minutos. O tronco encefálico, juntamente com o cérebro e o cerebelo, permaneceu submerso no ACSF a 0 °C durante 5 minutos. Após esse período, o cérebro e o cerebelo foram cuidadosamente removidos com o auxílio de uma lâmina de aço inoxidável (*Gillette*[®]) e de duas pequenas espátulas. O tronco encefálico, com o óbex localizado centralmente, foi gentilmente dissecado

utilizando-se de duas pinças finas. Todo este procedimento foi executado com o tronco encefálico submerso no ACSF a 0 °C. Em seguida a base rostral do tronco encefálico foi colada (com éster de cianoacrilato) em um suporte em forma de “L”, previamente preparado com ACSF-ágar a 4%, sendo que a superfície ventral do tronco encefálico ficou apoiada na porção vertical do suporte. Este por sua vez foi colado na plataforma acessória do vibrátomo (modelo NVSLM1, *World Precision Instruments, Inc.*) e o conjunto mergulhado em ACSF resfriado a 0°C contido em câmara própria do aparelho. O vibrátomo teve a lâmina (*Campden Instruments Limited*) posicionada em ângulo de 12 graus, frequência 7 e velocidade 3, para a obtenção de fatias do tronco encefálico de 300 µm de espessura. As duas ou três primeiras fatias obtidas foram sempre descartadas. Após a secção, cada fatia foi imediatamente colocada (com a ajuda de uma pipeta Pasteur de diâmetro apropriado) em uma câmara contendo ACSF a 35°C e continuamente borbulhada com mistura carbogênica, conforme descrito por Sakmann e Stuart (1995). Duas fatias contendo a área postrema foram obtidas de cada animal e mantidas na câmara de incubação durante um período de 30 a 60 minutos, após o que começaram a ser utilizadas para os registros eletrofisiológicos.

3.3 Eletrofisiologia

Após o período de incubação, uma fatia foi transferida, com o auxílio de uma pipeta Pasteur, à câmara de registros, montada sobre a platina de um microscópio (*Nikon E-600FN*) e observada com aumento de 40 vezes. A câmara foi perfundida com ACSF constantemente borbulhado com mistura carbogênica, a

um fluxo de 2 a 3 ml/min e em temperatura ambiente. Uma pequena grade, construída com fios de nylon e um aro de platina, foi colocada sobre a fatia para mantê-la imóvel no fundo da câmara.

Um eletrodo bipolar (cerca de 100 μm de diâmetro), confeccionado com fios de platina e conectado a um estimulador de pulso isolado (*DS2A, Digitimer Ltd.*), foi utilizado para aplicar pulsos de voltagem no TS. As micropipetas com pontas entre 2-3 μm de diâmetro e resistências de 4-8 $\text{M}\Omega$ (quando preenchidas com a solução de pipeta) foram fabricadas a partir de capilares de vidro borossilicato (sem filamento e 1,5 mm e 0,86 mm de diâmetros externo e interno, respectivamente – *Sutter Instrument Co.*) num estirador P-97 (*Sutter Instrument Co.*). As extremidades dos filamentos foram flambadas antes de estirados. As pontas das micropipetas muitas vezes foram polidas numa microforja especialmente desenhada para esse fim (*Narishige MF-83*) com a intenção de se obter selos mais estáveis. A pipeta, uma vez preenchida com solução apropriada, foi fixada ao “probe” montado em um micromanipulador (*Burleigh PSC 5000*) e conectada ao amplificador de *patch* (*EPC 7, List-Medical*) através de um eletrodo de Ag/AgCl. Um outro eletrodo de Ag/AgCl, imerso em solução de Agar 2,5% (diluído na solução de pipeta, com o intuito de diminuir ao máximo os potenciais de junção que obrigatoriamente se formam nessas condições) serviu como “ponte”, conectando o banho à terra. As saídas de corrente e voltagem do amplificador foram ligadas a um conversor A/D e D/A (*Axon Instruments -Digidata 1200B*), controlado por um microcomputador, para coleta e armazenagem dos dados em disco rígido. Os sinais de voltagem ou de corrente foram filtrados a 3 KHz (Low-

pass, 8 pole Bessel filter-LPF8, Warner Instruments Corp) e digitalizados a 10 KHz (Axon Instruments -Digidata 1200B). Tanto a aquisição quanto a análise *off line* dos sinais foi realizada com auxílio de programas do pacote PClamp6 (Axon Instruments). A placa digitalizadora também serviu para a geração e aplicação dos protocolos de pulsos de voltagem e de injeção de correntes inerentes a cada situação experimental.

Logo após uma fatia ter sido transferida à câmara de registros, o eletrodo de estímulo foi posicionado, sob controle visual, no trato solitário ipsolateral com o auxílio de um micromanipulador (Narishige-WR89). A micropipeta de vidro foi posicionada medialmente ao TS, no NTS, e o selo de alta resistência com a membrana celular foi alcançado em modo de *voltage clamp* e às cegas (*blind patch*). Em resumo, uma leve pressão positiva foi aplicada à pipeta antes da mesma penetrar no banho. Uma corrente através da pipeta é observada em resposta a um pulso teste de 10 a 15 mV quando a mesma penetra o banho, medindo-se sua resistência $R_p = \frac{\Delta V}{I}$. Com o auxílio do micromanipulador, a pipeta foi avançada até tocar a superfície da fatia, quando se observa um pequeno aumento da sua resistência. Lentamente a pipeta foi aprofundada no tecido até que a resistência dobrasse de valor. Neste momento a pressão positiva foi liberada e leve pressão subatmosférica foi aplicada, proporcionando a formação do selo pipeta-membrana (*cell-attached*), com resistência acima de 2 GΩ. Com a formação do *giga-seal* a voltagem foi fixada em -55 mV e leve pressão subatmosférica adicional foi aplicada à pipeta de maneira a romper a membrana celular e alcançar a configuração *whole cell* da técnica de *patch clamp*,

denunciada pelo aparecimento de transientes capacitivos, como descrito por Hamill *et al.* (1981). A resistência em série foi eletronicamente compensada (70 – 80%). O trato solitário foi, então, estimulado com duração, intensidade e frequência de 100 a 200 μ s, 1 a 20 V e 0,5 Hz, respectivamente, segundo critérios adotados por Miles (1986). Correntes iônicas pós-sinápticas produzidas em resposta aos estímulos, foram registradas e armazenadas em disco rígido para análise posterior. Foram também registradas e armazenadas correntes iônicas pós-sinápticas espontâneas (liberação quântica e intrínseca de vesículas sinápticas do terminal pré-sináptico). Respostas passivas (potenciais locais) e ativas (potenciais de ação) da membrana e a ação da glicina sobre o potencial de membrana das células, foram registradas com o amplificador no modo “current clamp”.

Os eventos eletrofisiológicos descritos acima foram sempre registrados numa condição controle para em seguida aplicar-se uma determinada droga e, quando possível, retornar à situação controle por lavagem com solução livre da droga. As soluções perfundiram a câmara de registros por gravidade e todas as drogas foram aplicadas em concentrações conhecidas trocando a linha de perfusão. A saída do líquido de perfusão da câmara foi também por gravidade.

3.4 Soluções

A solução de ACSF utilizada nos procedimentos de obtenção, manutenção e perfusão (controle) das fatias continha (em mM): NaCl 122; KCl 2,5; $MgCl_2$ 1,0; $CaCl_2$ 2,0; $NaHCO_3$ 25; NaH_2PO_4 1,25 e Glicose 25. Esta solução teve

osmolalidade de 305-310 mosm/Kg.H₂O e pH de 7,4 quando equilibrada com mistura carbogênica.

Para experimentos de *voltage-clamp* as pipetas foram preenchidas com solução de fluoreto de céσιο contendo (em mM): CsF 130; NaCl 10; MgCl₂ 1; K-ATP 3; EGTA 10 e HEPES 10 (pH 7,3 ajustado com CsOH, e osmolalidade de 295-305 mosm/Kg.H₂O). O céσιο foi escolhido como o cátion principal para bloquear a condutância ao potássio. Usamos o fluoreto como o principal ânion porque ele reduz as correntes de cálcio e porque aumenta a duração e estabilidade dos selos (Hestrin *et al.*, 1990). Além disso, foi com o CsF que mais facilmente conseguimos os *gigaseals*. Para experimentos de *current-clamp* utilizamos solução de gluconato de potássio (em mM): gluconato de Potássio 115; KCl 20; K-ATP 3; EGTA 10; HEPES 10 e MgCl₂ 2; pH 7,3 ajustado com KOH e osmolalidade de 295-305 mosm/Kg.H₂O.

3.5 Drogas

Os agonistas e antagonistas utilizados incluem: Glicina, DNQX (6,7-Dinitroquinolixalina-2,3 Diona), DL-AP5 (ácido DL-2-Amino-5-fosfonopentanóico), bicuculina, L-689-560 (*trans*-2-Carboxi-5,7-dicloro-4-phenilaminocarbonil amino-1,2,3,4-tetrahydroquinolina), (obtidos da TOCRIS Cookson Inc. - Ellisville, MO, USA), sulfato de cádmio (J.T. Baker *chemical*) e estricnina (Sigma Chemical Co - Saint Louis, MO, USA).

NaCl, KCl, MgCl₂, CaCl₂, HEPES, EGTA, NaHCO₃, NaH₂PO₄, Glicose, e K-ATP são da Sigma.

4 ANÁLISE DOS RESULTADOS

A análise dos resultados envolveu, essencialmente, medidas de amplitude, tempo de subida e constante de decaimento das correntes pós-sinápticas e carga transferida pelos eventos sinápticos. Usamos o programa Clampfit (*Axon Instruments*) para analisar as correntes pós-sinápticas evocadas e o Mini Analysis 4.3.2 da Synaptosoft para os eventos espontâneos. A análise estatística foi feita utilizando-se o teste t (pareado e não pareado) com nível de significância de $p < 0,05$. Os valores foram expressos como média \pm EPM.

O potencial de junção, formado entre a solução de pipeta e o banho, calculado utilizando-se o *Calculate Junction Potential* do *AxoScope 1.1* (*Axon Instruments*), foi igual a 10 mV. Esta diferença foi corrigida na análise *off-line* dos resultados.

Assumindo um modelo em que os íons Mg^{2+} bloqueiam o canal-receptor NMDA no estado aberto em um sítio localizado no campo elétrico da membrana (Woodhull, 1973; Neher e Steinbach, 1978; Ascher e Nowak, 1988), a equação:

$$I = \frac{[ag_{max}(V - V_R)]}{\left(a + [Mg^{2+}]_o e^{-V\delta F/RT}\right)} \quad (1)$$

onde V é o valor no qual o potencial de membrana foi fixado, V_R o potencial de reversão, g_{max} a condutância máxima (medida entre +10 e +40 mV), a representa a constante de dissociação do Mg^{2+} na ausência de potencial transmembrana, δ indica a fração do potencial de membrana atuando no sítio do Mg^{2+} no receptor NMDA e fornece a dependência de voltagem do receptor para o bloqueio pelo

Mg^{2+} , e R , T , z e F têm seus significados usuais, foi ajustada aos pontos experimentais da relação $I-V$ do componente NMDA das correntes glutamatérgicas evocadas por estimulação do TS.

Considerando a reação entre o neurotransmissor e o receptor fechado e a subsequente abertura do canal como uma reação química de primeira ordem, a relação, em escala semilogarítmica, tanto entre o tempo de subida, como entre a constante de tempo da fase de decaimento das correntes NMDA, não-NMDA e $GABA_A$ e o potencial de membrana, foi descrita pela seguinte equação:

$$\tau(V) = \frac{1}{Be^{AV}} \quad (2)$$

onde V é o potencial de membrana e A e B são constantes.

A relação concentração-resposta para a glicina foi descrita pela equação de Hill:

$$I = \frac{I_{max} [glicina]^n}{EC_{50} + [glicina]^n} \quad (3)$$

onde I_{max} é a resposta máxima, EC_{50} é a concentração de glicina que produz metade da resposta máxima, e n é o coeficiente de Hill, foi ajustada aos dados experimentais da relação concentração-resposta para a glicina.

5 RESULTADOS

A figura 1 mostra uma situação experimental típica: a fatia na câmara de registros com a micropipeta de registro no NTS e o eletrodo de estimulação no TS. As linhas paralelas e horizontais fazem parte da grade de nylon depositada sobre a fatia. A área postrema e o canal central também são indicados. Todos os registros foram feitos na região mostrada na figura 1, isto é, entre o trato solitário e a linha média.

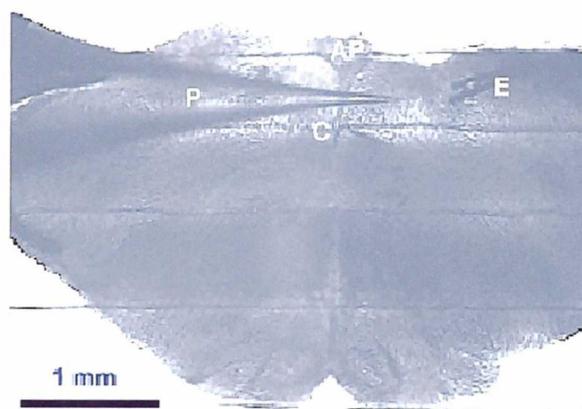


Figura 1. Fotografia mostrando uma fatia bulbar contendo o NTS subpostremal na câmara de registros. São visualizados o eletrodo de estimulação (E) no trato solitário e a micropipeta (P) localizada medialmente ao trato. AP, área postrema; C, canal central.

Muitos neurônios em que se conseguiu a configuração de *whole cell* foram descartados por (1) não apresentarem correntes transmembranas (espontâneas ou evocadas); (2) ruptura precoce do selo; ou (3) formação de selo de baixa resistência (< 400 M Ω). A figura 2A mostra que, com a formação de selos de baixa resistência, a célula apresenta (em modo de *current clamp*) potencial de

membrana de repouso despolarizado (-26 mV) e baixa amplitude dos potenciais de ação (o pico em -10 mV). No modo *voltage-clamp* o selo de baixa resistência não possibilita uma adequada fixação da voltagem, fazendo com que canais dependentes de voltagem possam ser ativados, desenvolvendo o que chamamos de correntes de ação. A figura 2B mostra correntes ativadas em potencial de membrana fixado em -40 mV que, por apresentarem cinética muito rápida (sobem em 1 ms), provavelmente se devam à abertura de canais para sódio dependentes de voltagem.

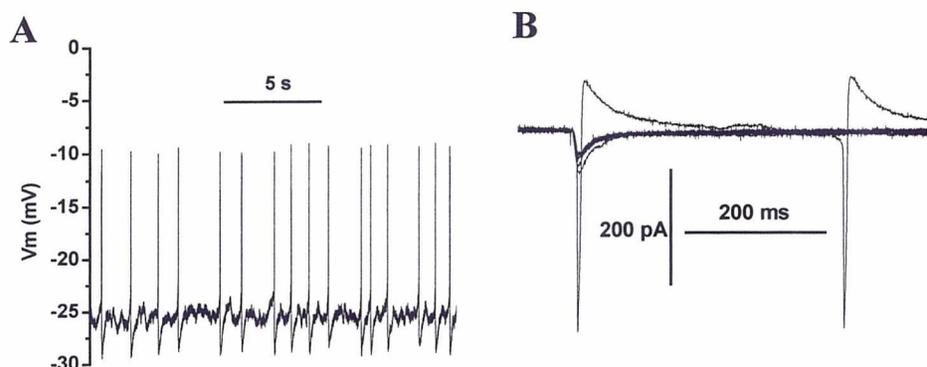


Figura 2. Selos de baixa resistência (< 400 M Ω). *A.* Em *current clamp* o potencial de repouso está despolarizado (-26 mV) e o pico dos potenciais de ação atinge apenas -10 mV. *B.* Em *voltage-clamp* a voltagem não é fixada adequadamente possibilitando a ativação de correntes de sódio quando da estimulação do TS, com o potencial de comando fixado em -40 mV.

5.1 Propriedades Passivas

Para avaliar as propriedades passivas da membrana, utilizamos um protocolo de voltagem consistindo de um pulso hiperpolarizante de -85 para -100 mV com 20 ms de duração (figura 3A). No início do pulso observa-se uma resposta de corrente para dentro, o transiente capacitivo, correspondendo à

corrente necessária para carregar o capacitor da membrana em 15 mV. Em seguida pode-se observar uma corrente para dentro estacionária (I_E); a corrente de vazamento. No final do pulso ocorre outro transiente capacitivo para fora, correspondendo à descarga do capacitor de membrana. A soma de duas ou três funções exponenciais ($2,56 \pm 0,08$ exponenciais, $n = 39$) foi necessária para descrever o decaimento do transiente capacitivo. A linha pontilhada, na figura 3A, é o ajuste de duas funções exponenciais ao transiente capacitivo com constantes de tempo de 0,15 ms e 2,45 ms. Obteve-se a quantidade de carga, acumulada na célula durante o transiente capacitivo, calculando-se a integral da corrente no tempo (figura 3A, linha tracejada). Com isto é possível obter-se a capacitância da membrana, igual a $41,19 \pm 2$ pF ($n = 39$), através da equação: $C = \frac{Q}{\Delta V}$, onde Q é a carga transferida e ΔV a amplitude absoluta do pulso de voltagem. A resistência em série $R_s = \frac{\Delta V}{I_p}$, onde ΔV é a amplitude absoluta do pulso de voltagem e I_p a amplitude da corrente no pico do transiente capacitivo, foi de $18,4 \pm 0,37$ M Ω ($n = 40$). A resistência de entrada – ou de *input* – $R_i = \frac{\Delta V - R_s I_E}{I_E}$, onde ΔV é a amplitude absoluta do pulso de voltagem, R_s é a resistência em série e I_E é a corrente estacionária, foi de 805 ± 44 M Ω ($n = 22$) variando de 557 até 1228 M Ω . O potencial de membrana de repouso, medido logo após a entrada na configuração de *whole-cell*, foi de $-57 \pm 0,76$ mV ($n = 65$).

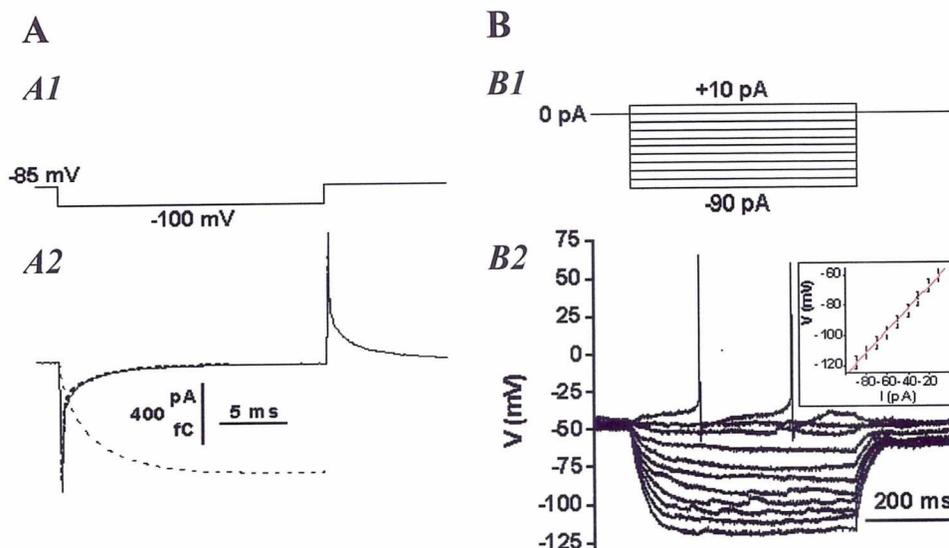


Figura 3. Propriedades passivas da membrana. **A.** Experimento de *voltage clamp*. **A1.** Protocolo de voltagem: pulso hiperpolarizante de 15 mV a partir de um de -85 mV. **A2.** Resposta de corrente (traço contínuo) ao pulso de voltagem. O transiente capacitivo foi descrito (linha pontilhada sobre o traço de corrente) pela soma de 2 exponenciais ($2,6 \pm 0,09$ exponenciais; $n = 40$). A linha tracejada é a integral do transiente capacitivo. **B.** Experimentos de *current-clamp*. **B1.** Protocolo de corrente: pulsos retangulares de correntes abrangendo de -90 até $+10$ pA em passos de 10 pA. **B2.** Respostas passivas e ativas da membrana em resposta aos pulsos de correntes. O *inset* mostra a relação $V-I$.

A resistência de entrada R_i dos neurônios do NTS foi avaliada também em experimentos de *current clamp*. O protocolo consistiu de pulsos retangulares de corrente com duração de 500 ms, abrangendo de -90 até $+10$ pA injetados em passos de 10 pA (figura 3B1). As respostas de voltagem a este protocolo são mostradas nas figura 3B2. Observa-se que aos pulsos de correntes hiperpolarizantes a célula responde passivamente. A corrente injetada carrega a capacitância de membrana até um platô de voltagem igual a $R_i I$. Correntes

despolarizantes, neste caso de +10 pA, descarregam a capacitância da membrana em quantidade suficiente para que ΔV seja supralimiar, de maneira que a célula responde disparando potenciais de ação. Os potenciais de ação apresentam cinética muito rápida (decorso temporal de cerca de 3 ms). O *inset* da figura 3B2 mostra a relação $V-I$ extraída das respostas passivas de voltagem (medidas no final do pulso com a voltagem estacionária). A inclinação da reta $V = R_i I + B$ (onde R_i é a resistência de entrada, I é a corrente injetada e B uma constante) que se ajusta aos pontos experimentais é a resistência de entrada R_i de 755 ± 46 M Ω ($n = 21$), um valor menor que o de 805 M Ω encontrado com os experimentos de *voltage-clamp*, mas que não diferem significativamente (Teste- t , não pareado, $n = 21$).

A figura 4 mostra, esquematicamente, as resistências do circuito elétrico envolvidas em nossa análise. A resistência de pipeta é determinada pelo seu

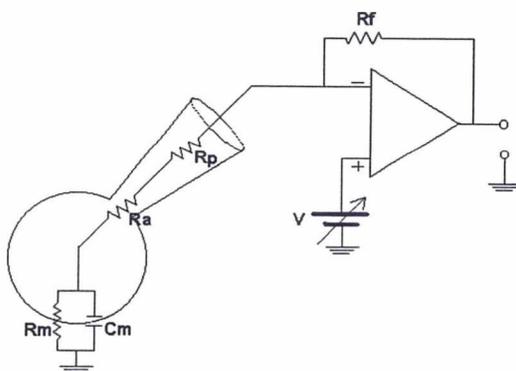


Figura 4. Esquema do circuito elétrico experimental. **R_p** – resistência de pipeta; **R_a** – resistência de acesso; **R_m** – resistência de membrana; **C_m** – capacitância de membrana; **V** – potencial de comando; **R_f** é a resistência de *feedback* do amplificador operacional.

diâmetro e pela solução de preenchimento. A resistência de acesso se origina principalmente da membrana rompida que permanece na configuração de *whole cell*. A resistência em série é a soma das resistências de pipeta e de acesso ($R_s = R_p + R_a$). A resistência de entrada (*input*) é a soma das resistências em série e de membrana ($R_i = R_s + R_m$). Compreende-se que quanto menor for a resistência em série, menor será a queda da voltagem nessa resistência, de maneira que a voltagem transmembrana se aproxima daquela do comando.

5.2 Correntes Pós-Sinápticas Evocadas por Estimulação do TS

O protocolo mais extensivamente utilizado nas nossas investigações é o mostrado na figura 5A. A partir de um potencial fixado em 0 mV (para manter os canais para sódio dependentes de voltagem no estado inativado) aplicam-se pulsos retangulares de voltagem abrangendo de -90 até $+50$ mV, em passos de 10 mV, com duração de 400 ms. O estímulo no TS ipsolateral é aplicado 115 ms após o início dos pulsos de voltagem, onde a corrente é estacionária. As primeiras correntes, as transientes, observadas no registro da figura 5B (e indicadas pelo número 1) são capacitivas, alterando a distribuição de cargas elétricas no capacitor de membrana em resposta aos pulsos de voltagens. Em seguida estão as correntes estacionárias (2). A primeira deflexão no registro após a corrente estacionária é o artefato de estímulo, seguida pelas correntes iônicas pós-sinápticas (3). O tempo entre o estímulo e o início da resposta é a latência.

Em suma: ao aplicarmos uma voltagem, através do eletrodo de estimulação, são gerados potenciais de ação nas fibras nervosas do TS. O

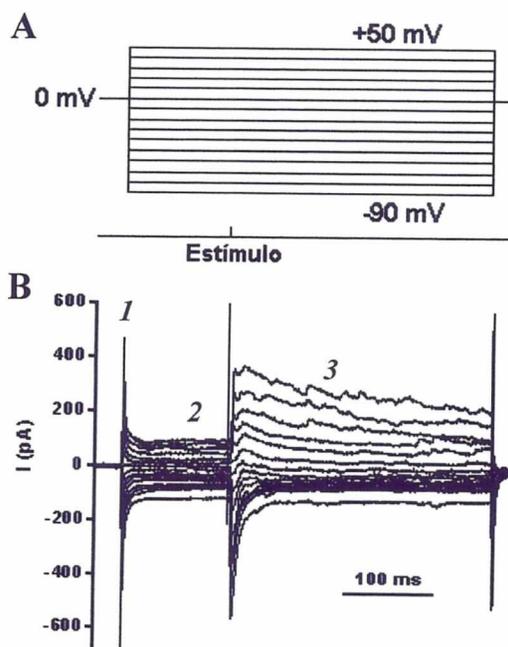


Figura 5. A. Protocolos de voltagem e de estímulo. A partir de 0 mV, pulsos de voltagens de -90 até +50 mV em passos de 10 mV são aplicados à célula. O estímulo no trato solitário é aplicado 115 ms após o início dos pulsos. B. Respostas de correntes transmembranas ao protocolo de voltagem em neurônio do NTS subpostremal. 1 – corrente capacitiva; 2 – corrente estacionária; 3 – correntes pós-sinápticas.

potencial de ação se propaga e, ao atingir o terminal pré-sináptico, causa a liberação do neurotransmissor, que ao ligar-se a receptores específicos alteram a condutância da membrana da célula pós-sináptica, causando fluxo de íons específicos através da mesma, a favor do gradiente de potencial eletroquímico de cada espécie, gerando assim a corrente pós-sináptica (CPS).

Na maioria das vezes a estimulação do TS produziu uma resposta mista de correntes excitatórias e inibitórias pós-sinápticas (CEPS/CIPS) na mesma célula do NTS subpostremal, como registrado previamente por outros

investigadores (Grabauskas e Bradley, 2003; Bonham e Chen, 2002; Doyle e Andresen, 2001; Smith *et al.*, 1998). A amplitude de pico dessas correntes variou com a intensidade e duração do estímulo. Fixando a intensidade e a duração do estímulo em 15 V e 100 μ s, respectivamente, a amplitude de pico, para uma mesma voltagem, teve menor variabilidade. A amplitude e a forma dessas correntes variou com o potencial de membrana. A figura 6 mostra um exemplo dessas CEPS/CIPS mistas registradas em potenciais de membrana variando de -90 até $+50$ mV em passos de 20 mV. O *inset* da figura 6 é a resposta de corrente para o potencial de membrana fixado em -10 mV, mostrando mais claramente os três componentes na resposta mista: duas correntes para dentro com um transiente para fora entre elas. As direções opostas das correntes em uma mesma voltagem indicam que elas são carregadas por diferentes íons. A bicuculina

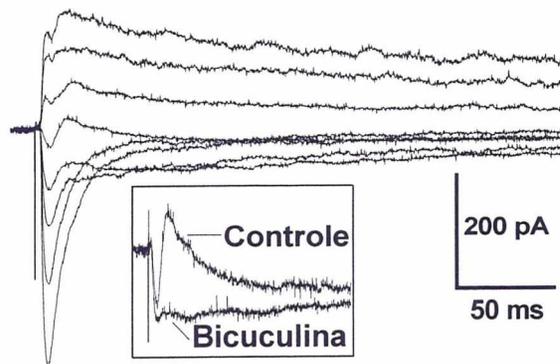


Figura 6. Correntes pós-sinápticas evocadas por estimulação do trato solitário. A resposta é um misto de correntes excitatórias (glutamatérgicas NMDA e não-NMDA) e inibitória (GABA_Aérgica). Em um potencial de -10 mV (*inset*) os três tipos de correntes são evidentes: duas correntes para dentro com um transiente para fora entre elas. A bicuculina (50μ M) bloqueia o componente para fora.

bloqueia o componente para fora, sugerindo que o mesmo é devido à ativação de receptores GABA_A. A resposta mista, evocada por estimulação do TS, pode ser isolada farmacologicamente e caracterizada eletrofisiologicamente, mostrando que a mesma se deve à ativação de receptores NMDA, não-NMDA e GABA_A.

Para testar se as respostas de correntes evocadas por estimulação do TS foram sinápticamente mediadas, usamos o sulfato de cádmio [CdSO₄ (100 μM)], um bloqueador de canais para cálcio. Em quatro células testadas, as CPS foram reversivelmente bloqueadas, indicando que essas correntes foram mediadas sinápticamente (Aylwin *et al.*, 1997). No experimento da figura 7, com um protocolo de pulso pareado², evidencia-se o efeito pré-sináptico do cádmio. A

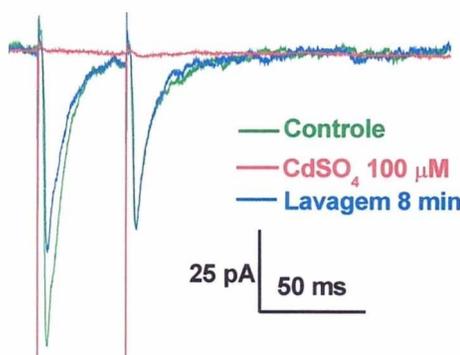


Figura 7. Mediação sináptica. Em verde a média de 5 CEPS (potencial de membrana fixado em -80 mV e na presença de bicuculina 50 μM e estricnina 5 μM) apresentando 40% de depressão pulso pareado (o intervalo entre os pulsos é de 41 ms). O sulfato de cádmio bloqueia as respostas (em vermelho). A segunda resposta retorna totalmente aos níveis controle enquanto que a primeira só o faz parcialmente com a lavagem (em azul, com 13% de depressão), sugerindo atuação pré-sináptica do sulfato de cádmio.

² Estimulação pulso-pareado (dois estímulos sucessivos com pequeno intervalo entre eles) é classicamente utilizada para o estudo da plasticidade neuronal de curta duração. A facilitação pulso pareado é geralmente explicada por um aumento na probabilidade de liberação do neurotransmissor durante o segundo estímulo (Ca²⁺ residual). A depressão pulso pareado pode ser devido à dessensibilização do receptor, mas é geralmente aceito que se deva a mecanismos pré-sinápticos (depleção das vesículas sinápticas).

resposta controle, com depressão pulso pareado de 40%, foi bloqueada com a aplicação de sulfato de cádmio. Com a lavagem, a resposta de corrente do primeiro pulso retornou parcialmente, enquanto que aquela do segundo pulso retornou totalmente à amplitude controle (depressão de 13 %), sugerindo que o sulfato de cádmio atuou pré-sinápticamente (se o seu sítio de ação fosse localizado pós-sinápticamente, as variações de ambas as respostas deveriam ser iguais).

5.2.1 Correntes Excitatórias Pós-Sinápticas

Na presença de bicuculina (50 μM) e estriçnina (5 μM), bloqueadores dos receptores GABA_A e glicina, respectivamente, a estimulação do TS ipsolateral gerou correntes excitatórias pós-sinápticas (CEPS) com dois componentes: um rápido não-NMDA e um lento NMDA (figura 8), como registrado por outros investigadores (Alwin *et al.*, 1997; Bonham e Chen, 2002). Note que em potenciais hiperpolarizados (-90 mV, traço vermelho), somente o componente rápido não-NMDA está presente e que, com a despolarização da membrana surge o componente lento NMDA, o qual é bem evidente em potenciais positivos (+50 mV, traço azul), onde o bloqueio pelo Mg²⁺ é ausente. Com a aplicação de bloqueadores específicos dos receptores NMDA e não-NMDA estes componentes podem ser isolados.

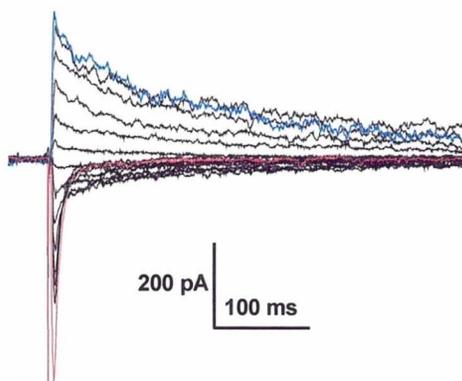


Figura 8. Correntes excitatórias pós-sinápticas. Na presença de bicuculina ($50 \mu\text{M}$) e estriçnicina ($5 \mu\text{M}$) a estimulação do trato solitário evoca correntes glutamatérgicas com duplo componente. Com o potencial de membrana fixado em -90 mV (traço vermelho) somente o componente não-NMDA está presente e em $+50 \text{ mV}$ o NMDA é bastante evidente (traço azul)

5.2.2 Correntes Excitatórias Pós-Sinápticas não-NMDA

Perfundindo a preparação com bicuculina ($50 \mu\text{M}$), estriçnicina ($5 \mu\text{M}$) e DL-AP5 ($50 \mu\text{M}$ – bloqueador específico dos receptores NMDA) isolou-se farmacologicamente as CEPS não-NMDA como mostrado na figura 9A. A adição de DNQX ($5 \mu\text{M}$ - bloqueador específico dos receptores não-NMDA) anulou completamente a resposta sináptica (figura 9A, *inset*) indicando que essas correntes são mediadas por receptores não-NMDA. Como é de se esperar para receptores não-NMDA, a relação I - V é linear (figura 9B; $n = 7$) com potencial de reversão próximo de zero ($-3,8 \text{ mV}$).

O componente não-NMDA das correntes sinápticas é bastante rápido. Em voltagem próxima do potencial de membrana de repouso (-60 mV), o tempo de

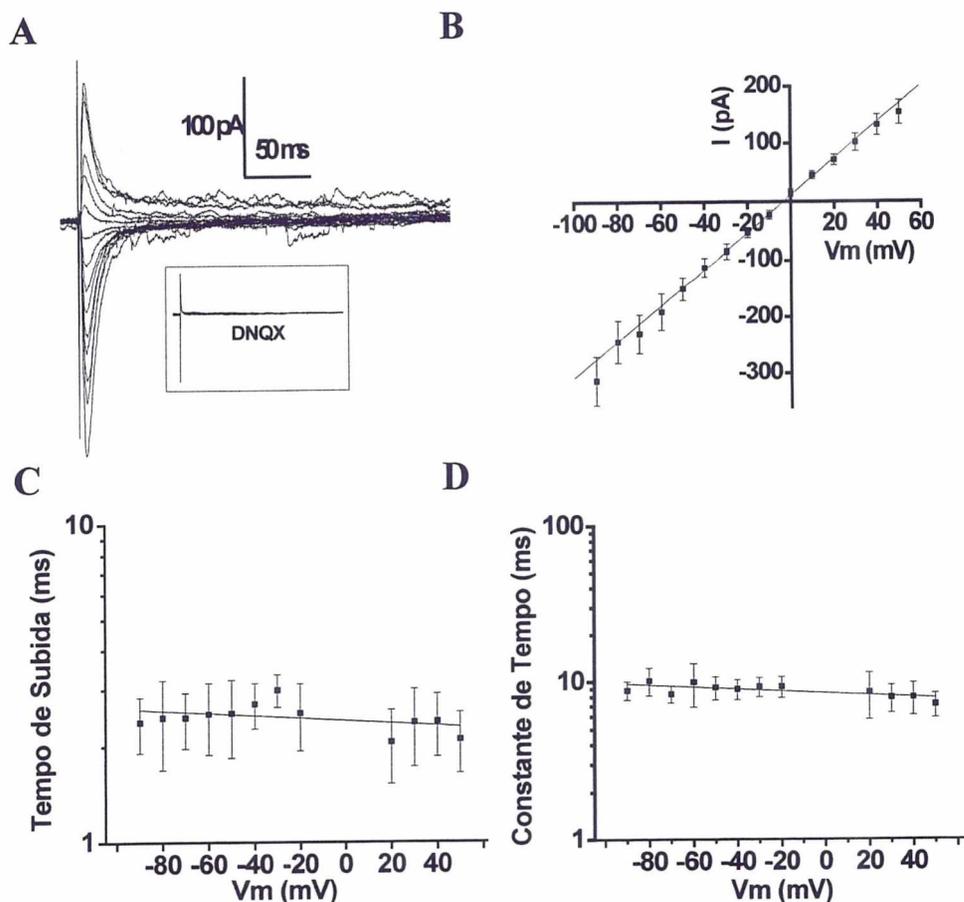


Figura 9. Correntes excitatórias pós-sinápticas não-NMDA (CEPS não-NMDA). A. Isolamento farmacológico das CEPS não-NMDA com a aplicação de bicuculina (50 μ M), estricnina (5 μ M) e DL-AP5 (50 μ M). O potencial de membrana variou de -90 até +50 mV em passos de 10 mV. Adicionando DNQX (5 μ M) à solução de banho as correntes sinápticas foram bloqueadas (*inset*). B. Relação *I-V* do pico das CEPS não-NMDA ($n = 7$). A linha reta é um ajuste linear aos pontos experimentais. C. Gráfico do tempo de subida contra o potencial de membrana. A linha contínua é um ajuste exponencial aos pontos experimentais. D. Gráfico da constante de decaimento das CEPS não-NMDA contra o potencial de membrana. A linha é um ajuste exponencial aos dados experimentais (equação 2, ver em Análise dos Resultados).

subida (medido entre o início e o pico da resposta) tem valor médio de $2,5 \pm 0,62$ ms ($n = 7$) variando de 1,9-3,3 ms. Em nossas condições experimentais, uma

única função exponencial (ver figura 16A) ajustou-se à fase de descida das correntes não-NMDA em voltagens fixadas de -90 até $+50$ mV, em passos de 10 mV. O valor médio da constante de decaimento em -60 mV foi de $9,9 \pm 3$ ms, variando de 6,7 até 13,5 ms. Embora exista uma pequena diminuição no tempo de subida e na constante de decaimento ($\tau_{\text{non-NMDA}}$) com a despolarização da membrana (figuras 9C e 9D, respectivamente), nenhuma dependência de voltagem acentuada foi observada.

5.2.3 Correntes Excitatórias Pós-Sinápticas NMDA

Correntes excitatórias pós-sinápticas NMDA evocadas por estimulação do TS foram isoladas na presença de DNQX ($5 \mu\text{M}$), estricnina ($5 \mu\text{M}$) e bicuculina ($50 \mu\text{M}$) para bloquear receptores não-NMDA, glicinérgicos e GABA_Aérgicos, respectivamente (Figura 10A). Esta resposta foi bloqueada por DL-AP5 ($50 \mu\text{M}$) (figura 9A, *inset*), indicando sua mediação por receptores do tipo NMDA. Ao contrário dos receptores não-NMDA, estes ativam mais lentamente com valores de 10 até 50 ms (Wyllie *et al.*, 1998) e desativam com um decurso temporal mais lento ainda. Neste trabalho, o tempo de subida das CEPS NMDA mostrou notável variabilidade, abrangendo tempos de 14,8 até mais de 40 ms em diferentes voltagens. Existe uma tendência do tempo de subida ser mais rápido em voltagens mais despolarizadas (*e-vezes/140* mV), mas não observamos diferença estatística entre as voltagens de -70 e $+50$ mV. Por outro lado, a constante de decaimento (uma única função exponencial se ajustou à fase de descida das correntes – ver figura 16A) é claramente dependente da voltagem de membrana, sendo

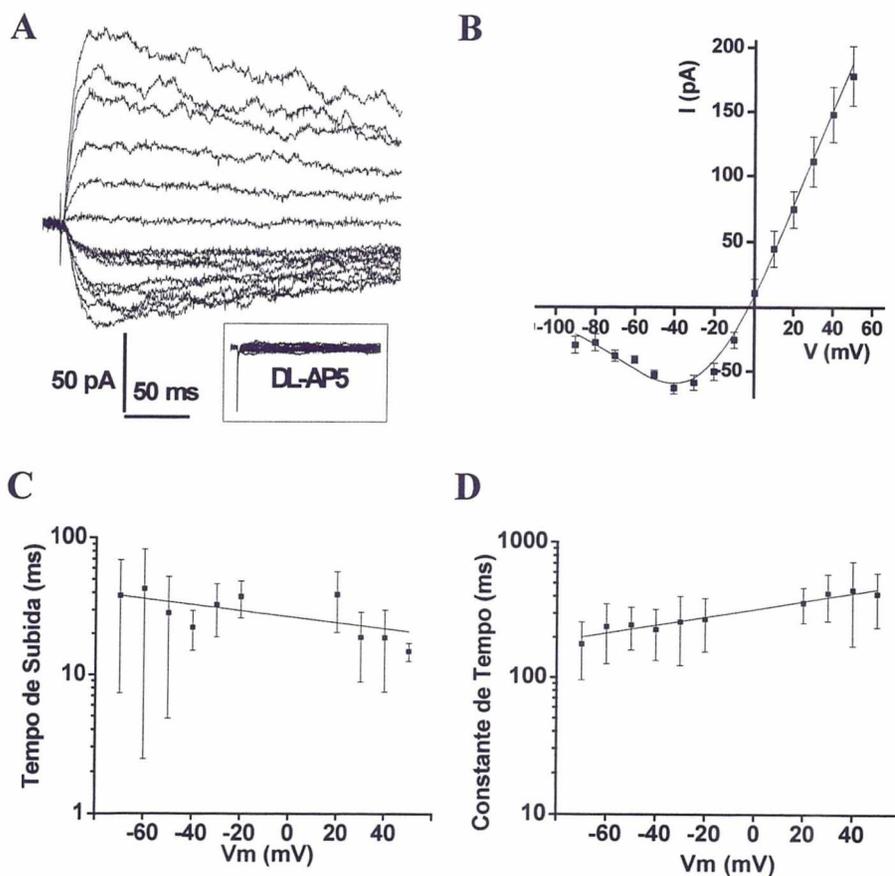


Figura 10. Correntes excitatórias pós-sináptica NMDA (CEPS NMDA). *A.* Isolamento farmacológico das CEPS NMDA com a aplicação de bicuculina (50 μ M), estriçnina (5 μ M) e DNQX (5 μ M). O potencial de membrana variou de -90 até $+50$ mV em passos de 10 mV. Adicionando DL-AP5 (50 μ M) à solução de banho as correntes sinápticas foram totalmente bloqueadas (*inset*). *B.* Relação I - V do pico das CEPS NMDA ($n = 5$). A linha contínua é o ajuste da equação 1 (ver Análise dos Resultados) aos dados experimentais. *C.* Gráfico do tempo de subida contra o potencial de membrana. A linha contínua é o ajuste exponencial aos pontos experimentais. *D.* Gráfico da constante de decaimento das CEPS NMDA contra o potencial de membrana. A linha contínua é um ajuste exponencial aos dados experimentais (equação 2, ver em Análise dos Resultados).

prolongada de maneira exponencial com a despolarização da membrana (e-vezes/145 mV). As constantes de decaimento nas voltagens de -70 and $+50$ mV,

177 ± 36 e 417 ± 80 ms, respectivamente, foram estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

A relação I - V da resposta NMDA mostra a característica forma de “J” com uma região de condutância negativa em voltagens mais hiperpolarizadas que -40 mV, onde o bloqueio dos receptores NMDA pelo Mg^{2+} é evidente (figura 10B, $n = 5$). A intensidade do bloqueio pelo Mg^{2+} depende do tipo de receptor NMDA, sendo que aqueles compostos pelas subunidades NR2A e NR2B são mais sensíveis ao bloqueio do que aqueles que contêm as subunidades NR2C e NR2D. Para avaliar a sensibilidade dos receptores NMDA no NTS subpostremal para o bloqueio pelo Mg^{2+} , a equação 1 (ver Análise dos Resultados) foi ajustada às curvas I - V de 5 neurônios do NTS subpostremal (figura 10B). O potencial de reversão foi de $-2,1 \pm 7,3$ mV. A condutância máxima $\left(g_{max} = \frac{dI}{dV} \right)$, derivada da faixa linear da relação I - V (de +10 até +50 mV), foi de $3,4 \pm 0,6$ nS. O parâmetro δ da equação 1 é a fração do potencial de membrana atuando sobre o sítio do Mg^{2+} no receptor NMDA ou, em outras palavras, a dependência de voltagem do bloqueio pelo Mg^{2+} . O valor de δ foi de $0,67 \pm 0,17$, sugerindo que o sítio do Mg^{2+} está cerca de 67 %, partindo do lado externo, no campo elétrico da membrana [mas não necessariamente 67% da distância através da membrana, se o campo elétrico não for constante (Woodhull, 1973)]. Em outras palavras, pode-se dizer que o receptor NMDA em questão tem uma dependência eletrostática relativamente fraca ao Mg^{2+} .

5.2.4 Correntes Inibitórias Pós-Sinápticas GABA_A

A estimulação do TS na presença dos bloqueadores dos receptores não-NMDA, NMDA e glicinérgicos, evocou correntes pós-sinápticas que foram bloqueadas por bicuculina (50 μ M) (figura 11A), indicando que elas são resultado da ativação de receptores do tipo GABA_A. Um ajuste linear aos pontos experimentais não descreve bem a relação *I-V* das respostas GABA_A (figura 11B; $n = 5$) sugerindo uma leve retificação para fora, como tem sido mostrado em outras preparações (Segal e Barker, 1984; Gray e Johnston, 1985; Nakagawa *et al.*, 1991; Huang e Dillon, 2001). O grau de retificação é dependente da composição dos receptores GABA_A, em termos de subunidades. Por exemplo, Burgard *et al.* (1996) demonstraram que as correntes dos receptores contendo as subunidades $\alpha 1\beta 3\gamma 2$ retificam menos que aquelas dos receptores contendo as subunidades $\alpha 5\beta 3\gamma 2$. O potencial de reversão das CIPS GABA_A obtidas da relação *I-V* em nossos experimentos foi de -50 mV, um valor deslocado positivamente em 10 mV do potencial de reversão do íon cloreto (E_{Cl^-} , -60 mV, em nossas condições de registro), o que sugere que outro íon, além do Cl^- , possa contribuir, embora minoritariamente, para esta CIPS GABA_A.

O tempo de subida das CIPS GABA_A foi insensível às variações no potencial de membrana, tendo valores de $5,1 \pm 2$ ms em potencial de membrana de -90 mV e de $5,0 \pm 1,7$ ms em $+50$ mV (variando de 2,2 até 8,3 ms) (figura 11C). Uma única função exponencial descreveu a fase de decaimento das CIPS GABA_A (ver figura 16A) com um valor médio para a constante de tempo de $25,5 \pm 8,6$ ms em potencial de membrana de -90 mV. A constante de tempo da fase de

decaimento depende da voltagem da membrana e varia e -vezes/243 mV, sendo diferente estatisticamente entre as voltagens de -90 e $+50$ mV.

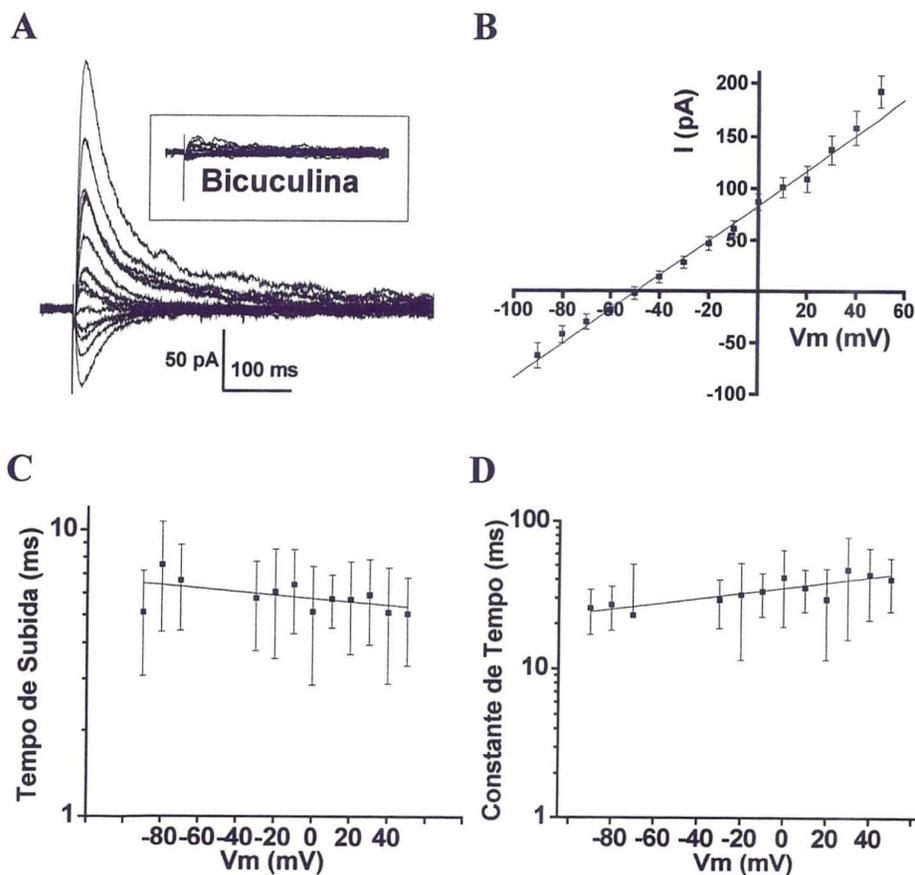


Figura 11. Correntes inibitórias pós-sinápticas GABA_Aérgicas (CIPS GABA_A). *A.* Isolamento farmacológico das CIPS GABA_A com a perfusão de DL-AP5 ($50 \mu\text{M}$), estricnina ($5 \mu\text{M}$) e DNQX ($5 \mu\text{M}$). O potencial de membrana variou de -90 até $+50$ mV em passos de 10 mV. Adicionando bicuculina ($50 \mu\text{M}$) à solução de banho as correntes sinápticas foram bloqueadas (*inset*). *B.* Relação I - V do pico das CIPS GABA_A ($n = 5$). A linha contínua é um ajuste linear aos dados experimentais. *C.* Gráfico do tempo de subida contra o potencial de membrana. A linha reta é um ajuste exponencial aos pontos experimentais. *D.* Gráfico da constante de decaimento das CIPS GABA_A contra o potencial de membrana. A linha contínua é um ajuste exponencial aos dados experimentais (equação 2, ver em Análise dos Resultados).

Vários trabalhos sugerem que o glutamato é o neurotransmissor liberado pelas aferências periféricas primárias dentro do NTS (Doyle e Andresen, 2001). É provável, pois, que estas correntes GABAérgicas que se observam em nossos experimentos, sejam evocadas devido à estimulação de interneurônios GABAérgicos, diretamente pelo eletrodo de estímulo ou por espalhamento de corrente do eletrodo de estímulo até interneurônios locais que se projetam para a célula registrada. Por outro lado, algumas correntes pós-sinápticas evocadas com estimulação do TS apresentando os três componentes (figura 12A), são bloqueadas com a perfusão concomitante de DNQX e DL-AP5 (figura 12B); sugerindo que a corrente inibitória seja polissináptica. Neste caso estaríamos estimulando fibras do TS fazendo sinapses com interneurônios GABAérgicos, e estes com a célula pós-sináptica onde se está fazendo o registro.

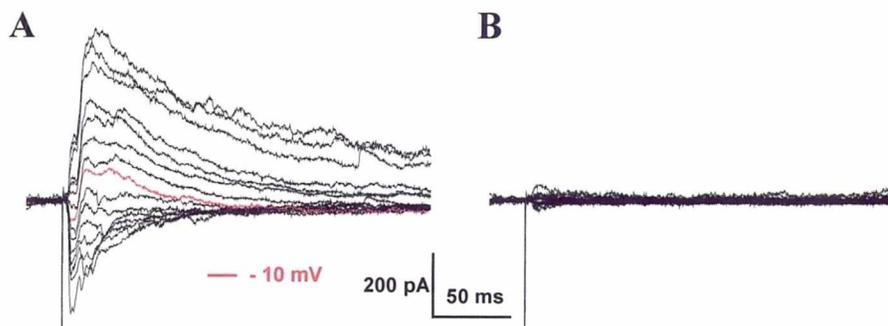


Figura 12. Correntes inibitórias polissinápticas. *A.* Correntes pós-sinápticas evocadas com estimulação do TS (voltagem fixada de -90 até $+50$ mV, em passos de 10 mV) apresentando os três componentes. Com o potencial fixado em -10 mV (traçado vermelho) três tipos de correntes estão presentes: duas para dentro e uma para fora situada entre elas. *B.* Todas as três correntes são bloqueadas com a aplicação de DNQX ($5 \mu\text{M}$) e DL-AP5 ($50 \mu\text{M}$), sugerindo que a corrente com características de CIPS GABAérgica seja polissináptica.

5.3 Correntes Pós-Sinápticas Espontâneas

Correntes pós-sinápticas espontâneas (CPSe) foram observadas em 74 % dos neurônios do NTS subpostremal. Em 46 células estudadas, 43,4 % apresentaram somente correntes inibitórias pós-sinápticas espontâneas (CIPSe), 23,9 % apenas correntes excitatórias pós-sinápticas espontâneas (CEPSe), 6,5 % apresentaram CEPSe/CIPSe em uma mesma célula e 26,2 % não apresentaram atividade sináptica espontânea. Esta atividade sináptica espontânea no NTS subpostremal confirma a ativação dos três tipos de receptores: NMDA, não-NMDA e GABA_A, como registrado nas CPS evocadas por estimulação do TS.

5.3.1 Correntes Excitatórias Pós-Sinápticas Espontâneas

Em potencial de membrana fixado em -70 mV e com ACSF sem Mg²⁺ na solução de banho, as CPSe foram para dentro (figura 13A, B e C). Nessa voltagem (-70 mV), as correntes GABAérgicas não aparecem ou não podem ser distinguidas do ruído, devido ao pequeno gradiente de potencial eletroquímico para o cloreto. O decaimento dessas correntes apresenta dois componentes: um rápido e um lento, os quais são característicos da ativação dos receptores não-NMDA e NMDA, respectivamente. De fato, foram necessárias duas funções exponenciais para descrever a fase de decaimento desses eventos (como seria de se esperar para CPS com duplo componente - ver figura 16B). As constantes de tempo foram de $7,6 \pm 1,2$ ms e $133,4 \pm 23,6$ ms ($n = 5$), de maneira que a constante de tempo rápida está correspondendo ao componente não-NMDA e a lenta ao NMDA. Este duplo componente, NMDA e não-NMDA, em um mesmo evento excitatório espontâneo indica que esses dois receptores podem estar co-

localizados em uma mesma sinapse nos neurônios do NTS subpostremal, como tem sido mostrado em motoneurônios do hipoglosso (O'Brien *et al.*, 1997). Com o potencial de membrana fixado em -70 mV, a adição de Mg^{2+} (1 mM) à solução de

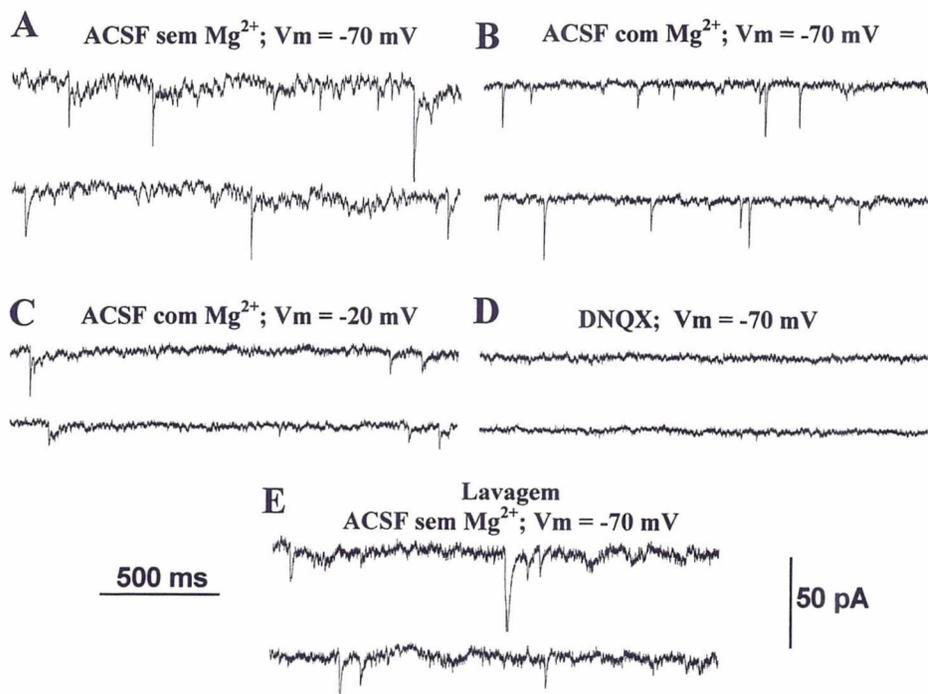


Figura 13. Correntes excitatórias pós-sinápticas espontâneas (CEPSe). *A.* Traços representativos de CEPSe glutamatérgicas registradas com ACSF sem Mg^{2+} e com o potencial fixado em -70 mV. As CEPSe apresentam os dois componentes glutamatérgicos ionotrópicos, NMDA e não-NMDA. *B.* A adição de Mg^{2+} (1 mM) ao banho bloqueia o componente NMDA em voltagens hiperpolarizadas (-70 mV). *C.* Com o potencial fixado em -20 mV o bloqueio do Mg^{2+} é parcialmente desfeito. As CEPSe apresentam os dois componentes. *D.* Com a voltagem fixada em -70 mV a adição de DNQX (5 μ M) bloqueia a atividade sináptica. *E.* Com o potencial fixado em -70 mV, a lavagem da droga com ACSF sem Mg^{2+} as correntes glutamatérgicas apresentam novamente ambos os componentes, NMDA e não-NMDA. Todos os registros são da mesma célula.

banho, bloqueou o componente lento NMDA (como é de se esperar do receptor NMDA em potenciais hiperpolarizados), permanecendo apenas o componente rápido não-NMDA (figura 13B). Uma única função exponencial pode, agora, ajustar-se à fase de decaimento desses eventos (ver figura 16B) com uma constante de tempo de $6,3 \pm 0,7$ ms ($n = 6$). A figura 13C mostra que com ACSF contendo Mg^{2+} (1 mM), é possível observar CEPSe com duplo componente, NMDA e não-NMDA, em potenciais mais despolarizados (-20 mV), no qual o Mg^{2+} não bloqueia o canal. Com o potencial de membrana fixado em -70 mV, a adição de DNQX (5 μ M) ao banho bloqueou toda a atividade sináptica (figura 13D), indicando mais uma vez o envolvimento dos receptores não-NMDA. A lavagem da droga com ACSF sem Mg^{2+} e com o potencial de membrana fixado em -70 mV, mostra novamente CEPSe com duplo componente (figura 13E).

5.3.2 Correntes Inibitórias Pós-Sinápticas Espontâneas

O neurotransmissor GABA e seu receptor do tipo $GABA_A$, estão presentes no NTS (Kawai e Senba, 1999; Terai *et al.*, 1998; Xia e Haddad, 1992). De fato, nós observamos que a maioria dos neurônios estudada aqui apresentou atividade sináptica espontânea GABAérgica, sugerindo que esta neurotransmissão apresenta importante papel funcional no NTS subpostremal.

Em algumas células, onde a atividade espontânea excitatória não estava presente em potencial de membrana fixado em -70 mV, pudemos observar correntes espontâneas para fora em potenciais mais despolarizados (+45 mV, figura 14A). Estes eventos espontâneos foram bloqueados por bicuculina (50 μ M) (figura 14B), sugerindo que esta atividade é devida à ativação de receptores do

tipo GABA_A. O tempo de subida dessas CIPSe foi de $5,9 \pm 1,6$ ms e o decaimento foi adequadamente descrito por uma única função exponencial (ver figura 16B) com constante de tempo de $21,2 \pm 1,6$ ms ($n = 9$).

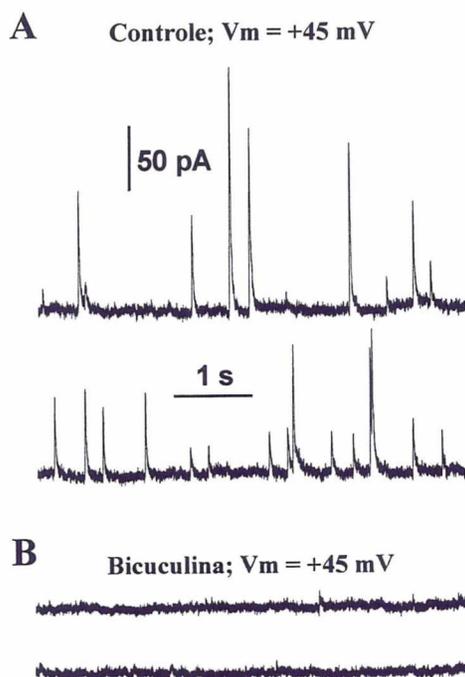


Figure 14. . Correntes inibitórias pós-sinápticas espontâneas (CIPSe). A. Traços representativos de CIPSe GABA_Aérgicas. B. A adição de bicuculina (50 μ M) bloqueia as CIPSe.

As constantes de tempo da fase de decaimento dos eventos espontâneos apresentaram grande variabilidade: de 4,4 a 8,6 ms ($n = 6$) para as CEPSe não-NMDA; de 14,2 a 27,2 ms para as CIPSe GABA_A e de 5,4 a 11,1 ms e 43,6 a 184,4 ms para as duas constantes das CEPSe com duplo componente NMDA e

não-NMDA. Esta variabilidade sugere que uma população heterogênea de CEPSe e CIPSe foi registrada. Um outro fator que pode contribuir para esta variação no decurso temporal é um fraco *space clamping*. Em experimentos de *voltage clamp*, quando uma voltagem é aplicada através da membrana do soma, a voltagem através da membrana dendrítica não é adequadamente fixada (exceto em células com pequena arborização dendrítica). Devido às propriedades de cabo dos dendritos, as correntes sinápticas são distorcidas (decurso temporal mais lento) e atenuadas (em amplitude) quando registradas no soma. No caso de um fraco *space clamp*, uma correlação negativa seria esperada entre o tempo de decaimento e a amplitude dos eventos (Gold e Martin, 1983). A ausência de tal correlação negativa é mostrada na figura 15A e 15B, para CEPSe não-NMDA e CIPSe GABA_A, respectivamente, o que é indicativo de *space clamp* adequado.

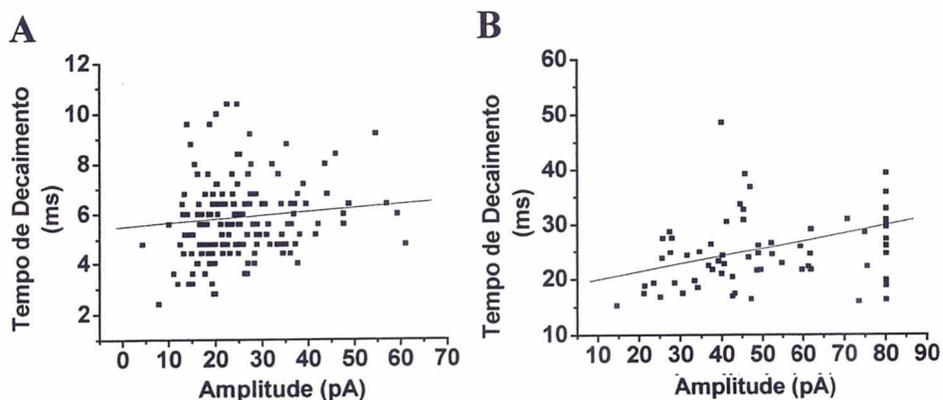


Figura 15. *Space clamp*. A. . Gráfico do tempo de decaimento contra a amplitude das CEPSe não-NMDA. B. . Gráfico do tempo de decaimento contra a amplitude das CIPSe GABA_A. A correlação positiva é indicativa de um bom *space clamp*.

A figura 16 resume o decurso temporal das CEPS e CIPS evocadas por estimulação do TS e das CEPSe e CIPSe observadas em neurônios do NTS

subpostremal. As linhas pontilhadas sobrepostas aos traços de correntes são funções exponenciais simples que se ajustam à fase de decaimento das respostas, com exceção do decaimento das CEPSe com duplo componente NMDA e não-NMDA que é a soma de 2 funções exponenciais (figura 16B). Note as características cinéticas dos três tipos de CPS evocadas por estimulação do TS. A ordem dos tempos de subida é nãoNMDA < GABA_A < NMDA (figura 16A). O mesmo aspecto temporal pode ser observado para o decaimento das CEP evocadas. Para comparação, a figura 16B mostra o decurso temporal dos três tipos de CPSe. É evidente a similaridade entre o decurso temporal das CPSe e

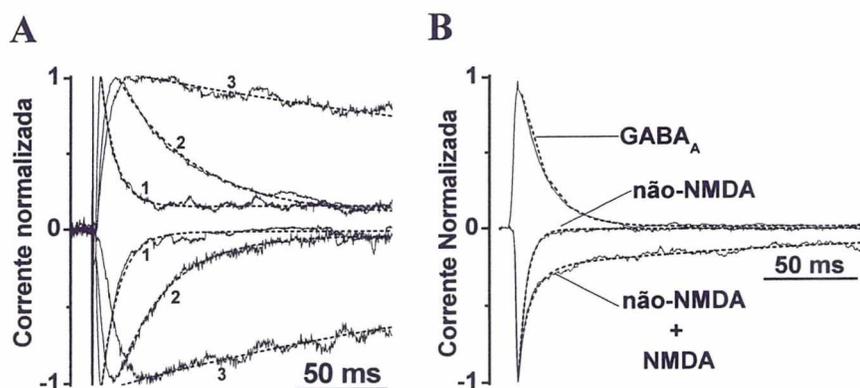


Figura 16. Decurso temporal das correntes pós-sinápticas (CPS). *A.* CPS evocadas por estimulação do trato solitário. As linhas pontilhadas sobrepostas sobre os traços de correntes são funções exponenciais simples que descrevem a fase de descida das correntes pós-sinápticas. As correntes para dentro 1 e 2 são CPS não-NMDA e GABA_A, respectivamente, com o potencial de membrana fixado em -90 mV e 3 é CPS NMDA em -40 mV. As CPS para fora 1, 2 e 3 são não-NMDA, GABA_A e NMDA, respectivamente, em potencial de membrana de $+50$ mV. *B.* CPS espontâneas. As linhas pontilhadas são funções exponenciais simples, com exceção da corrente não-NMDA + NMDA onde duas funções exponenciais são necessárias. As CPS espontâneas glutamatérgicas e GABAérgica foram registradas com o potencial de membrana fixado em -70 e $+45$ mV, respectivamente. Todos os traços de correntes estão normalizados pela corrente máxima de cada caso.

das CPS evocadas. Em geral, as constantes de tempo das CPS evocadas foram mais lentas que as CPSe, o que provavelmente se deva à liberação assíncrona do neurotransmissor em diferentes sítios sinápticos. Vale a pena ressaltar que as respostas evocadas foram geradas por estimulação de múltiplos axônios presentes no TS.

5.4 Glicina

Uma vez que o glutamato, ativando receptores NMDA e não-NMDA, e o GABA, ativando receptores GABA_A, são os principais neurotransmissores no NTS, o TS foi estimulado na presença de bicuculina (50 μ M) para evocarmos somente as correntes pós-sinápticas glutamatérgicas (CPSG). Estrícina (5 μ M) também estava presente na solução de banho para bloquear receptores glicinérgicos sensíveis à estrícina. Nestas condições, a aplicação de glicina aumentou o componente NMDA sem alterar o não-NMDA das CPSG. A figura 17A mostra que em voltagem hiperpolarizada (-90 mV), com os receptores NMDA bloqueados pelo Mg²⁺, a glicina em concentrações de 50 μ M e 100 μ M não teve efeito sobre as correntes para dentro do tipo não-NMDA. Entretanto, a glicina em concentrações maiores (1000 μ M) causou um pequeno aumento, sugerindo que o bloqueio pelo Mg²⁺ dos receptores NMDA não é total, nesta voltagem de membrana. Este bloqueio incompleto pelo Mg²⁺ foi também observado com a aplicação de L-689-560 (10 μ M), um bloqueador do sítio da glicina nos receptores NMDA, que causou uma pequena diminuição na resposta. Por outro lado, com o potencial fixado em +50 mV, a glicina aumentou as respostas NMDA de uma maneira dependente de

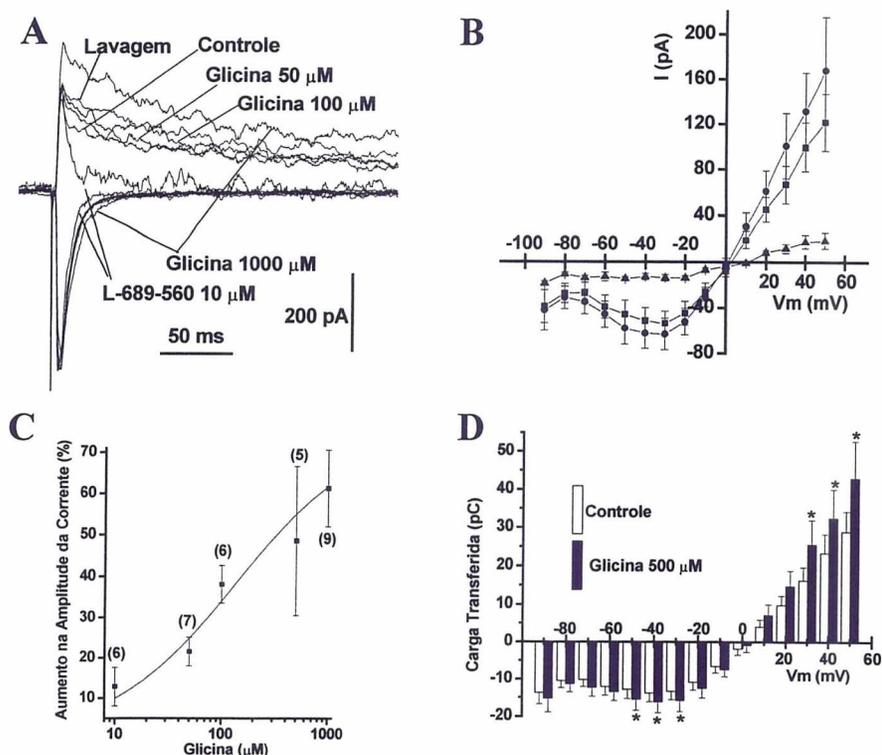


Figura 17. Aplicação exógena de glicina aumenta o componente NMDA das correntes pós-sinápticas glutamatérgicas (CPSG) evocadas por estimulação do trato solitário. **A.** CPSG sobrepostas com o potencial de membrana fixado em -90 mV (correntes para dentro) e $+50$ mV (correntes para fora) na condição controle, na presença de glicina em três diferentes concentrações, após a lavagem e na presença de L-689-560, como indicado. **B.** Relação I - V ($n = 7$) do componente NMDA das CPSG, medido 60 ms após o pico, na condição controle (quadrados), na presença de glicina ($500 \mu\text{M}$; círculos) e L-689-560 ($10 \mu\text{M}$; triângulos). **C.** Curva concentração-resposta para a glicina com o potencial de membrana fixado em $+50$ mV. A linha contínua é o ajuste da equação de Hill (ver Análise dos Resultados) aos pontos experimentais. Os números entre parênteses indicam o número de células. **D.** Relação entre a carga total transferida pelas CPSG, medida do início da resposta até 225 ms após, e a voltagem ($n = 7$) na situação controle, e na presença de glicina ($500 \mu\text{M}$). Os asteriscos indicam valores estatisticamente diferentes (Teste t , $p < 0,05$).

concentração. Este efeito foi parcialmente reversível e a aplicação de L-689-560 (ou de DL-AP5 $50 \mu\text{M}$) bloqueou o componente lento das CPSG, confirmando que

o mesmo é mediado por receptores NMDA (figura 17A). A amplitude da corrente NMDA foi medida 60 ms após o pico das CPSG, onde a corrente não-NMDA já decaiu completamente. A relação I - V da figura 17B mostra que a glicina (500 μ M) aumentou a amplitude das correntes em voltagens mais despolarizadas que -50 mV sem deslocar o potencial de reversão. A condutância que permanece na presença de L-689-560 não é constante com a voltagem e, portanto, deve ser devido a um bloqueio incompleto dos receptores NMDA. A figura 17C mostra a relação entre a porcentagem de aumento na amplitude da corrente e a concentração de glicina, com o potencial de membrana fixado em $+50$ mV. O efeito da glicina foi dependente de concentração na faixa de 10 até 1000 μ M. A concentração de glicina que causou metade do aumento máximo (EC_{50}) foi de 130 μ M e o n foi de 0,74, como deduzido a partir do ajuste da equação de Hill (ver Análise dos Resultados) aos pontos experimentais. Para melhor analisar o efeito da glicina, plotamos a integral da corrente no tempo das CPSG entre o início da resposta e 225 ms depois (carga total transferida), contra o potencial de membrana (-90 mV até $+50$ mV, em passos de 10 mV). A figura 17D mostra que a glicina (500 μ M) aumentou significativamente ($p < 0,05$, $n = 7$) a quantidade da carga total transferida pelas CPSG em voltagens mais despolarizadas que -50 mV. Note que nesta faixa de voltagem a contribuição do componente NMDA para a CPSG é mais relevante de maneira que a glicina tem um efeito pronunciado. Por outro lado, em voltagens hiperpolarizadas o componente não-NMDA é o maior contribuinte das CPSG e a glicina não tem nenhum efeito significativo.

O efeito da glicina foi também observado em correntes pós-sinápticas glutamatérgicas espontâneas (CPSGe) registradas na presença de bicuculina (50 μM) e estricnina (5 μM). Com ACSF sem Mg^{2+} na solução de banho, as CPSGe

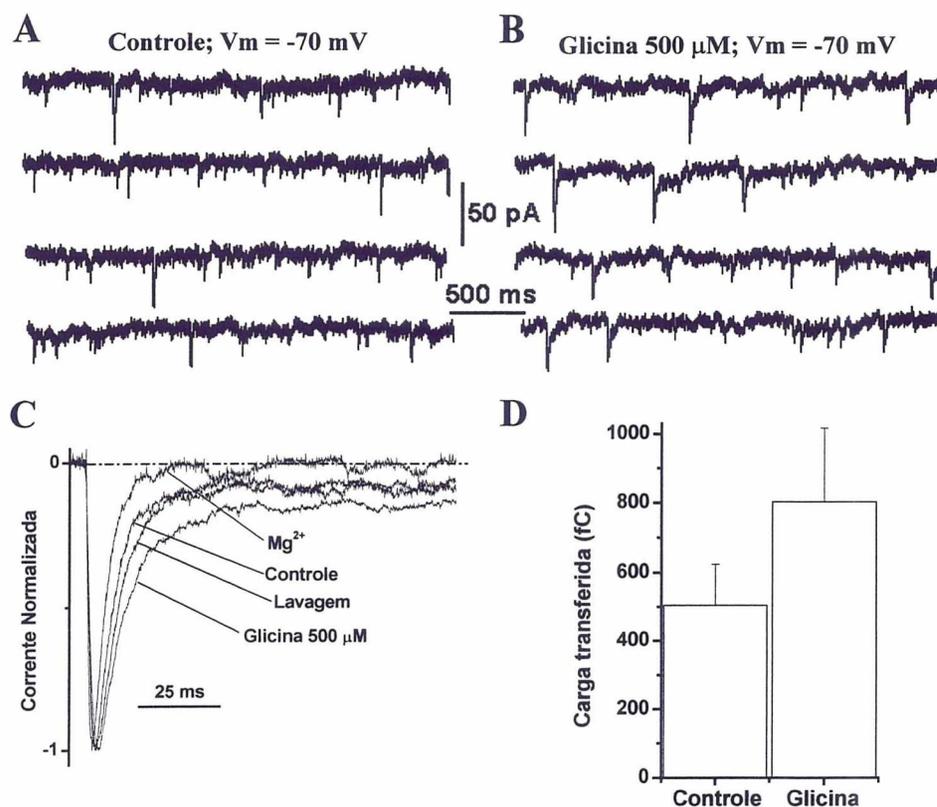


Figura 18. Aplicação exógena de glicina potencializa o componente NMDA das correntes excitatórias pós-sinápticas espontâneas (CEPSe). *A.* e *B.* Traços representativos de CEPSe na condição controle e na presença de glicina (500 μM), respectivamente. As CEPSe foram registradas com ACSF sem Mg^{2+} e com o potencial de membrana fixado em -70 mV . *C.* Médias das CEPSe derivadas de 138, 222, 101 e 48 eventos na situação controle, na presença de glicina, após a lavagem e após a adição de Mg^{2+} (1 mM), respectivamente. A média das CEPSe é do mesmo neurônio mostrado em *A* e *B*. *D.* Carga transferida pelas CEPSe ($n = 3$) com potencial de membrana fixado em -70 mV , medida do pico até 150 ms, na condição controle e na presença de glicina (500 μM).

apresentaram os dois componentes: NMDA e não-NMDA (figure 18C). As figuras 18A e 18B mostram CPSGe registradas com o potencial de membrana fixado em -70 mV, na situação controle e na presença de glicina ($500 \mu\text{M}$), respectivamente. A glicina prolongou o decaimento das CPSGe (figura 18C) resultando em um aumento de $62 \pm 25 \%$ ($n = 3$) na carga total transferida (figura 18D). Este efeito foi reversível e a adição de Mg^{2+} (1 mM) na solução de banho bloqueou o componente NMDA das CPSGe (figura 18C). A glicina não alterou a frequência de aparecimento dos eventos, sugerindo um mecanismo de ação pós-sináptico.

O efeito da glicina em potencializar as respostas NMDA pode ter ocorrido por três maneiras diferentes: (1) através do sítio da glicina nos receptores NMDA, uma ação demonstrada em outras áreas do SNC (Ahmadi *et al.*, 2003), (2) atuando nos receptores NMDA contendo as subunidades NR3A ou NR3B, os quais são ativados pela glicina na ausência de glutamato (Chatterton *et al.*, 2002) ou (3) por uma ação pré-sináptica nos receptores glicinérgicos sensíveis à estriçnina, facilitando a liberação de glutamato (Turecek e Trussell, 2001). Para testar essas possibilidades, nós usamos a D-serina, um agonista do sítio da glicina no receptor NMDA, que não tem afinidade para os receptores glicinérgicos sensíveis à estriçnina e, ao contrário da glicina, bloqueia os receptores NMDA contendo as subunidades NR3A ou NR3B (Chatterton *et al.*, 2002). A figura 19A mostra que a D-serina ($50 \mu\text{M}$) potencializou o componente NMDA e não alterou o não-NMDA das CPSG evocadas por estimulação do TS. Este efeito foi reversível. Com o potencial fixado em $+50$ mV, a D-serina aumentou de maneira significativa ($68,4 \pm 19 \%$; $p < 0,05$; $n = 5$) a amplitude das correntes NMDA medidas 60 ms

após o pico das respostas (figura 19B). A D-serina também aumentou a carga total transferida, medida desde o início das respostas até 225 ms após, pelas CPSG ($66 \pm 11 \%$, $p < 0,05$; $n = 5$; figura 19C). Esses resultados com a D-serina sugerem que o efeito potencializador da glicina aqui observado não é devido à ativação de receptores NMDA contendo as subunidades NR3A ou NR3B, ou de receptores glicinérgicos pré-sinápticos sensíveis à estricnina. Além disso, em nossos experimentos as CPSG foram sempre registradas na presença de estricnina e o componente não-NMDA não foi alterado pela glicina. Esses resultados suportam a hipótese de a glicina estar atuando no seu sítio no receptor NMDA.

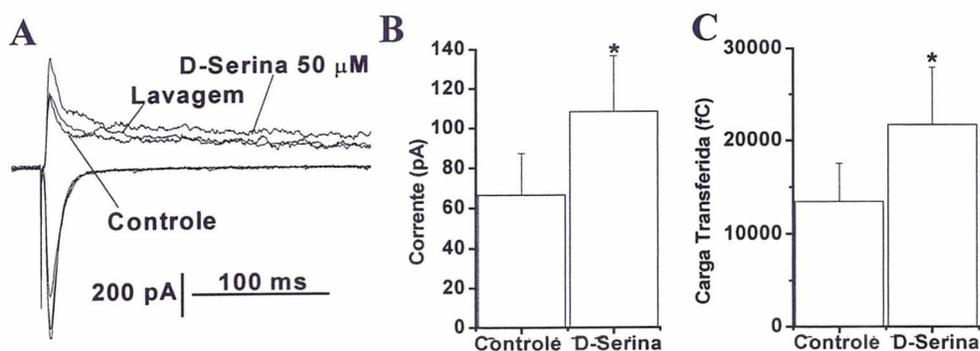


Figura 19. Aplicação exógena de D-serina aumenta o componente NMDA das correntes pós-sinápticas glutamatérgicas (CPSG) evocadas por estimulação do trato solitário. **A.** CPSG sobrepostas com o potencial de membrana fixado em -90 mV (traços para dentro) e em $+50$ mV (traços para fora) na condição controle, na presença de D-serina e após a lavagem. **B.** Amplitude do componente NMDA das CPSG ($n = 5$) com potencial de membrana em $+50$ mV, medido 60 ms após o pico, na condição controle e na presença de D-serina ($50 \mu\text{M}$). **C.** Carga total transferida ($n = 5$) pelas CPSG com o potencial de membrana em $+50$ mV, medida do início da resposta até 225 ms após, na condição controle e na presença de D-serina ($50 \mu\text{M}$). Os asteriscos indicam diferença estatística (Test- t , $p < 0,05$).

O mecanismo de ação da glicina nos receptores NMDA não é totalmente entendido. Alguns estudos sugerem que ela bloqueia a dessensibilização do receptor NMDA (Mayer *et al.*, 1989; Vyklicky *et al.*, 1990; Martina *et al.*, 2003), enquanto outros não encontraram nenhuma evidência desta ação (Wilcox *et al.*, 1996). Experimentos onde se mediram correntes passando por um único canal, mostram que a glicina aumenta a freqüência de abertura do canal NMDA (Johnson e Ascher, 1987). Nós investigamos, em um potencial de membrana fixado em +50 mV, o efeito da

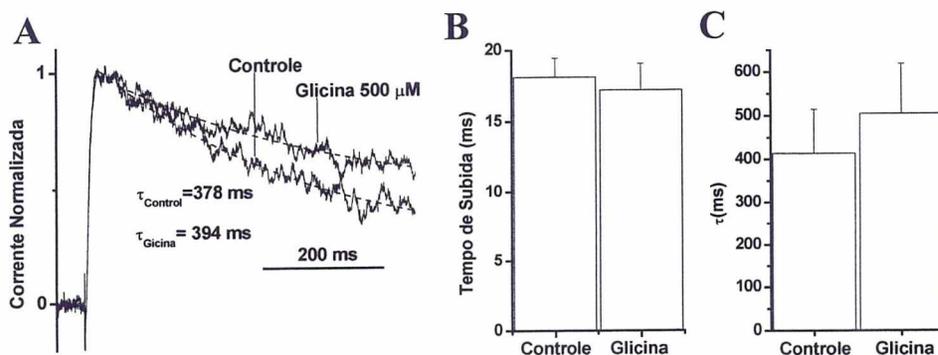


Figura 20. Glicina não altera o decurso temporal das correntes NMDA evocadas por estimulação do trato solitário. A. Correntes NMDA normalizadas pela corrente máxima com o potencial de membrana fixado em +50 mV na condição controle e na presença de glicina. As linhas tracejadas sobre a fase de decaimento das correntes são funções monoexponenciais com constantes de tempo de 378 ms e 394 ms para controle e glicina, respectivamente. As correntes foram registradas na presença de DNQX (5 μM), bicuculina (50 μM) e estricnina (5 μM). B. Tempo de subida ($n = 6$) das correntes NMDA com o potencial de membrana de +50 mV, medido do início da resposta até o pico, na condição controle e na presença de glicina (500 μM). C. Constante de decaimento ($n = 6$) das correntes NMDA com o potencial de membrana em +50 mV na condição controle e na presença de glicina (500 μM).

glicina (500 μM) no decurso temporal das correntes NMDA evocadas por estimulação do TS, na presença de DNQX (5 μM), bicuculina e estricnina. O tempo de subida, medido do início da resposta até o pico, não foi alterado de maneira significativa e houve uma tendência da constante de decaimento das correntes NMDA ser mais lenta na presença de glicina (figuras 20A e 20B), embora sem diferença estatística.

Outra questão importante é a origem da glicina para a neurotransmissão glutamatérgica NMDA. Alguns trabalhos sugerem que interneurônios glicinérgicos podem ser a fonte de glicina, de maneira que este neurotransmissor alcança os receptores NMDA circunvizinhos por difusão, um processo comumente denominado de *spillover* (Ahmadi *et al.*, 2003; Berger e Isaacson, 1999). A liberação sináptica de glicina no NTS não é demonstrada diretamente, e a estimulação do TS (Doyle e Andresen, 2001) ou do nervo vago (Smith *et al.*, 1998) evoca apenas correntes glutamatérgicas e GABA_Aérgicas. Entretanto, correntes glicinérgicas podem ser evocadas por aplicação local de glicina em neurônios do NTS dissociados agudamente (Takahama *et al.*, 1997), sugerindo a presença de receptores glicinérgicos inibitórios sensíveis à estricnina. Nós confirmamos esta possibilidade com a preparação de fatias. Em experimentos de *current clamp* (n = 4), a aplicação de glicina (500 μM) causou hiperpolarização da membrana, cessando o disparo de potenciais de ação (figura 21). Este efeito foi reversível e bloqueado por estricnina (5 μM), sugerindo que o efeito hiperpolarizante da glicina foi devido à ativação de receptores glicinérgicos inibitórios sensíveis à estricnina.

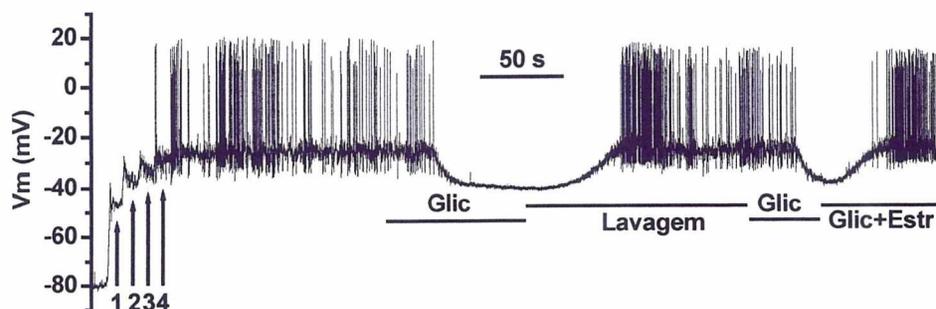


Figura 21. Receptores glicinérgicos sensíveis à estriçnina. A aplicação de glicina (Glic - 500 μ M) leva à hiperpolarização (reversível com a lavagem) do potencial de membrana, cessando o disparo de potenciais de ação. A estriçnina (Estr - 5 μ M) bloqueia o efeito da glicina. Os números 1-4 indicam a injeção de corrente despolarizante de 35, 45, 50 e 55 pA, respectivamente, aplicada para levar o potencial de membrana até o limiar de disparo.

6 DISCUSSÃO

Neste trabalho nós estudamos alguns aspectos da transmissão sináptica no NTS subpostremal. O objetivo principal foi analisar se o sítio da glicina no receptor NMDA se encontra ou não saturado, para avaliar se a glicina atua ou não como um neuromodulador da transmissão sináptica excitatória NMDA. Nós encontramos correntes pós-sinápticas glutamatérgicas NMDA e não-NMDA, e GABAérgica, GABA_A, tanto por estimulação do TS quanto pela liberação espontânea de transmissores em neurônios do NTS subpostremal, sendo que a glicina exógena potencializou as correntes NMDA de maneira dependente de concentração.

Embora os amino ácidos glutamato e GABA são considerados os principais neurotransmissores no NTS, existem evidências que as aferências periféricas primárias para o NTS sejam glutamatérgicas, excluindo a possibilidade de fibras GABAérgicas serem ativadas por estimulação do TS (Bonham e Chen, 2002; Aylwin *et al.*, 1997; Doyle e Andresen, 2001). Em preparações de fatias transversais, a estimulação elétrica do TS pode causar também potenciais de ação (por espalhamento de corrente a partir da ponta do eletrodo de estimulação) em neurônios locais ou fibras de passagem que se projetam para a célula registrada, não possibilitando saber se a resposta evocada se origina apenas por ativação das aferências periféricas (Smith *et al.*, 1998). Este problema pode ser parcialmente resolvido utilizando: 1) técnicas de marcação anterógrada, de maneira a reconhecermos o neurônio de segunda ordem no NTS (Doyle e Andresen, 2001; Loewy, 1990), e 2) preparação de fatias horizontais. Neste caso

(fatias horizontais), o trajeto rostro-caudal do TS é exposto e o eletrodo de estímulo pode ser posicionado no TS a uma distância maior do sítio de registro, minimizando a ativação de interneurônios (Doyle e Andresen, 2001). No presente estudo, nós utilizamos fatias transversais, de maneira que não é possível afirmar que os neurônios registrados estavam monossinápticamente conectados pelas aferências periféricas ou mesmo se o TS foi a única estrutura estimulada.

6.1 Propriedades Passivas

Alguns trabalhos mostram que as propriedades morfológicas e eletrofisiológicas dos neurônios do NTS são muito heterogêneas e que essas células são relativamente pequenas, com diâmetro do corpo neuronal entre 12 – 15 μm (Deuchars *et al.*, 2000; Kawai e Senba, 1996, 1999; King e Bradley, 1994; Paton *et al.*, 1993). Para um neurônio com diâmetro médio de 13,3 μm (Kawai e Senba, 1996), sua capacitância somática é de aproximadamente 5,5 pF (considerando-se a capacitância específica da membrana neuronal igual a 1 $\mu\text{F}/\text{cm}^2$). Por outro lado, a maioria dos neurônios pequenos do NTS apresenta uma extensa arborização dendrítica (Kawai e Senba, 1996, 1999; Deuchars, *et al.*, 2000) e, como sugerido por Rall e Segev (1985), a área superficial dendrítica de um neurônio pode ser 10, 20 ou mesmo 100 vezes maior que a área superficial do soma neuronal, resultando numa grande capacitância distribuída, que está eletricamente unida àquela do soma. Uma extensa estrutura dendrítica também é sugerida em nossos experimentos pela necessidade de duas ou três funções exponenciais para descrever o decaimento do transiente capacitivo gerado pelo

pulso de voltagem hiperpolarizante (figura 2A). Estas considerações ajudam a explicar o valor elevado da capacitância (~41 pF) obtidos em alguns de nossos experimentos, indicando a presença de neurônios com grande arborização dendrítica. A resistência de entrada calculada em nosso estudo variou de 557 até 1228 M Ω , com média de 834 ± 82 M Ω . Estes valores estão em concordância com estudos prévios realizados em neurônios do NTS. Por exemplo, a resistência de entrada medida por Smith *et al.* (1998) variou de 217 até 1200 M Ω . Grabauskas e Bradley (2001) mediram um valor médio de 852 M Ω para neurônios de ratos de 0 – 7 dias de vida e 427 M Ω para neurônios de ratos com > 55 dias de vida. Em relação ao tamanho do corpo neuronal, Kawai e Senba (1996) mostraram três tipos de neurônios no NTS subpostremal: pequeno, médio e grande. Os neurônios pequenos têm resistência de entrada média de 1131 M Ω e os médios e grandes de 852 M Ω . Os valores abrangendo de 557 até 1228 M Ω observados em nossos experimentos estão de acordo com os resultados de Kawai e Senba, sugerindo que nós observamos todos os tipos de neurônios por eles observados (pequenos, médios e grandes).

6.2 Correntes Excitatórias Pós-Sinápticas não-NMDA

O componente não-NMDA das correntes sinápticas é notavelmente rápido. Em voltagem próxima do potencial de membrana de repouso (-60 mV), o tempo de subida das correntes não-NMDA foi de $2,5 \pm 0,62$ ms variando de 1,9-3,3 ms. CEPS não-NMDA registradas em sinapses próximas do corpo neuronal ou no próprio soma têm tempo de subida menor que 1 ms (Finkel e Redman, 1983;

Nelson *et al.*, 1986; Barnes-Davies e Forsythe, 1995). A provável explicação para o lento tempo de subida observado em nossos experimentos é a inabilidade do “clamp” seguir a fase de subida da corrente, como sugerido por Hestrin *et al.* (1990) para neurônios hipocampais.

Em nossas condições experimentais, a fase de descida das correntes não-NMDA foi bem descrita por uma única função exponencial (figura 16A) em voltagens de -90 até $+50$ mV. O valor médio da constante de decaimento em -60 mV foi de $9,9 \pm 3$ ms, variando de 6,7 até 13,5 ms. O decurso temporal das correntes sinápticas mediadas por receptores ionotrópicos é influenciada por vários fatores tais como o decurso temporal da liberação do neurotransmissor, a vida média do neurotransmissor na fenda sináptica, as propriedades dos receptores pós-sinápticos (Otis *et al.*, 1996) e a estrutura eletrotônica da célula (Hestrin *et al.*, 1990). A combinação desses fatores determina a forma da fase de decaimento das CPS. Os valores das constantes de decaimento das CEPS não-NMDA ($\tau_{\text{non-NMDA}}$) variam em diferentes áreas do CNS, de 0,8 ms, por exemplo, em neurônios do núcleo medial do corpo trapezóide (Barnes-Davies e Forsythe, 1995) até 16-19 ms em neurônios hipocampais (McBain e Dingledine, 1992). Essas diferenças podem refletir expressão diferenciada das subunidades dos receptores não-NMDA (Mosbacher *et al.*, 1994; Geiger *et al.*, 1995; Ravindranathan *et al.*, 2000). Deve-se considerar também que a variabilidade nos tempos de subida e descida das CEPS pode refletir a localização das sinapses em diferentes distâncias do soma e, portanto o sinal deve ser filtrado com diferentes intensidades (Hestrin *et al.*, 1990).

6.3 Correntes Excitatórias Pós-Sinápticas NMDA

Correntes pós-sinápticas NMDA foram evocadas por estimulação do TS na presença de DNQX, bicuculina e estricnina. O decurso temporal dessas correntes é nitidamente lento, quando comparado com aquele das correntes não-NMDA. O tempo de subida mostrou uma tendência de ser mais rápido com a despolarização da membrana, embora sem diferença estatística significativa. A fase de decaimento da resposta NMDA foi descrita por uma única função exponencial e as constantes de decaimento se tornam mais lentas com a despolarização da membrana, sendo diferentes estatisticamente ($p < 0,05$) nas voltagens de -70 e +50 mV. Esta dependência de voltagem do τ_{NMDA} foi observada também em outras áreas do SNC (O'Brien *et al.*, 1997; Anchisi *et al.*, 2001). Considerando a reação entre o neurotransmissor e o receptor e a subsequente abertura do canal como uma reação química de primeira ordem, a relação da constante de decaimento contra o potencial de membrana pode ser descrita com a equação 2. Então, o gráfico dos valores do τ_{nmda} contra a voltagem, em escala semilogarítmica, fica próximo de uma reta (figura 4D), de maneira que o $\tau_{\text{nmda}}(\text{V})$ obedece, aparentemente, a relação exponencial teórica da equação 2, e aumenta *e*-vezes a cada 145 mV.

Kuner e Schoepfer (1996) mostraram que receptores NMDA contendo as subunidades NR2A ou NR2B têm uma grande dependência de voltagem ($\delta \sim 1$) e a máxima corrente para dentro ocorre quando a voltagem está próxima de -25 mV. Já aqueles receptores contendo as subunidades NR2C ou NR2D, têm menor

dependência de voltagem ($\delta \sim 0,7$) e corrente máxima para dentro em -35 mV. Nossos resultados mostram que a corrente NMDA máxima para dentro, medida nas curvas $I-V$, ocorreu em $-38,7 \pm 4,2$ mV e o valor de δ de $0,67 \pm 0,17$. Então, esses dois valores, δ e a amplitude da corrente máxima para dentro, sugerem que os neurônios do NTS subpostremal são compostos pelas subunidades NR2C ou NR2D. Assim a intensidade do bloqueio do canal pelo Mg^{2+} é relativamente fraca, de maneira que o receptor pode ser ativado em potenciais de membrana próximos daquele de repouso (-60 mV), permitindo passar corrente despolarizante com amplitude ao redor de $-41,2 \pm 5,5$ pA. Uma vez que as CEPS NMDA têm a fase de decaimento mais lenta que a das CEPS não-NMDA, Anchisi *et al.* (2001) mostraram que a carga transferida através da membrana pelos receptores NMDA é maior que aquela transferida pelos receptores não-NMDA. Esses dados, juntos, indicam que nos neurônios do NTS subpostremal, em potencial de membrana próximo do repouso, os receptores NMDA contribuem de maneira significativa para o sinal sináptico. Além disso, receptores NMDA contendo subunidades NR2C/NR2D desativam mais lentamente do que aqueles contendo as subunidades NR2A/NR2B (Kuner e Schoepfer, 1996; Monyer *et al.*, 1994; Vicini *et al.*, 1998), o que pode determinar uma maior somação temporal das entradas sinápticas.

6.4 Correntes Inibitórias Pós-Sinápticas GABAérgicas

Apesar de muitas evidências indicarem que a maior parte da corrente fluindo pelos receptores GABA_A seja carregada pelos íons Cl⁻ (Eccles *et al.*, 1977; Bormann *et al.*, 1987), vários trabalhos mostram que o complexo canal-receptor GABA_A tem uma permeabilidade relativa para o íon bicarbonato de aproximadamente 0,2-0,3 (Inomata *et al.*, 1986; Kaila *et al.*, 1993). Se assumirmos que HCO₃⁻ e Cl⁻ atuam como carreadores de carga através do canal receptor GABA_A com uma permeabilidade relativa (HCO₃⁻ / Cl⁻) de 0,2, o deslocamento positivo do potencial de reversão em 10 mV em relação ao E_{Cl⁻} encontrado em nossos experimentos, está de acordo com o deslocamento de 9-16,2 mV em neurônios neocorticais, observado por Kaila *et al.*, 1993, utilizando concentrações de Cl⁻ e bicarbonato ([Cl⁻]_i = 5; [HCO₃]_E = 25; [Cl⁻]_E = 131) próximas das usadas em nossos experimentos. Isto sugere que o íon HCO₃⁻ pode ser o outro íon que contribui para as CIPS GABA_A em neurônios do NTS subpostremal, de maneira que o potencial de reversão dessas correntes é mais positivo que o potencial de equilíbrio do cloreto.

Como descrito por Lewis e Faber (1996), embora uns poucos investigadores tenham registrado correntes GABAérgicas com o decaimento descrito por dupla exponencial (2 e 54 ms, Edwards *et al.*, 1990; 21 e 58 ms, Schneggenberger e Konnerth, 1992), a maioria registrou decaimentos descritos por uma exponencial simples (5,8 ms, Otis *et al.*, 1991; 11 ms, Collingridge *et al.*, 1984; 19 ms, Gleason *et al.*, 1993; 25 ms, Ropert *et al.*, 1990; 29 ms, Hosokawa *et al.*, 1994). Grabauskas e Bradley (2003) encontraram ambos, isto é, decaimento das CIPS GABAérgicas em neurônios do NTS rostral descritos por uma e também

por duas funções exponenciais. Essas diferenças no decurso temporal das CIPS GABAérgicas podem refletir uma composição molecular distinta dos receptores GABA_A (Schofield *et al.*, 1987; Lewis e Faber, 1996). Alterações na composição das subunidades do canal receptor GABA_A podem determinar as propriedades cinéticas do mesmo (Verdoorn *et al.*, 1990). Vale a pena ressaltar também que as diferentes distâncias eletrotônicas a que as sinapses se encontram a partir do soma podem contribuir para a diversidade cinética da fase de decaimento das CPS. Como registrado em outras sinapses GABAérgicas (Dudel, 1977; Collingridge *et al.*, 1984; Schneggenburger e Konnerth, 1992), as constantes de tempo da fase de decaimento das CIPS em nossos experimentos aumentou com a despolarização (figura 11C), e-vezes/243 mV

6.5 Glicina

Nós mostramos que o sítio da glicina nos receptores NMDA dos neurônios do NTS subpostremal não se encontra saturado. Observamos também que a glicina não altera a cinética das correntes NMDA evocadas por estimulação do TS. Na presença de bicuculina e estricnina, a estimulação do TS evocou CEPS. O antagonista do sítio da glicina no receptor NMDA, L-689-560, bloqueou o componente lento das CEPS, enquanto que o DNQX aboliu o componente rápido (figuras 17A e 20A). Este perfil farmacológico, e o decurso temporal das correntes, confirmam que as CEPS são mediadas por receptores glutamatérgicos do tipo NMDA e não-NMDA. Nós analisamos o efeito da glicina na amplitude das CEPS 60 ms após o pico e a carga total transferida medindo a integral de tempo das correntes do início da resposta até 225 ms depois. A relação *I-V*, com a

característica forma de “J “ do componente NMDA, mostrou que a condutância da membrana é maior na presença de glicina (figura 17B). Além disso, nós observamos que a glicina potencializou as CEPSe registradas na presença de bicuculina e estricnina e ACSF sem Mg^{2+} na solução de banho. Nessas condições, e com o potencial de membrana fixado em -70 mV, as CEPSe são glutamatérgicas com ambos os componentes, NMDA e não-NMDA. (figura 19C).

Desde que Johnson e Ascher (1987) demonstraram que a glicina pode facilitar a neurotransmissão NMDA, vários trabalhos tiveram como objetivos duas questões principais, ainda não completamente resolvidas: (1) o mecanismo de ação da glicina no receptor NMDA e (2) se o sítio da glicina nos receptores NMDA se encontra saturado *in vivo*.

Alguns estudos *in vitro* (Fletcher *et al.*, 1989; Kemp *et al.*, 1988) sugerem que o sítio da glicina no receptor NMDA não se encontra saturado, enquanto outros *in vivo* (Chen *et al.*, 2003; Salt, 1989) e *in vitro* (Martina *et al.*, 2003; Wilcox *et al.*, 1996) apontam contra esta hipótese. Parece provável que isto depende das diferenças regionais na expressão dos subtipos de receptores NMDA, da concentração local de glicina ou D-serina e da expressão de transportadores específicos de glicina (Parsons *et al.*, 1998). O receptor NMDA é composto pelas subunidades NR1, NR2A-NR2D (Monyer *et al.*, 1994) e NR3A-3B (Chatterton *et al.*, 2002). Acredita-se que a subunidade NR1 é um componente obrigatório dos receptores funcionais, enquanto que as subunidades NR2A-NR2D geram receptores com propriedades funcionais distintas (Monyer *et al.*, 1994). A subunidade NR1 está presente em todo o SNC, enquanto que as subunidades NR2A-NR2D são expressadas diferencialmente de modo espaço-temporal,

sugerindo a existência de uma variedade de receptores nativos NMDA (Kew *et al.*, 1998; Monyer *et al.*, 1994). É conhecido que a afinidade para a glicina depende da composição dos receptores NMDA (Mori e Mishina, 1995). Embora alguns estudos mostram uma afinidade relativa de NR1/NR2C [™] NR1 (homomérico) > NR1/NR2B = NR1/NR2D > NR1/NR2A (Laurie e Seeburg, 1994), a maioria dos estudos eletrofisiológicos indicam NR1/NR2D > NR1/NR2C > NR1/NR2B > NR1/NR2A (Katsuwada *et al.*, 1992; Priestley *et al.*, 1995; Buller e Monaghan, 1997). Uma vez que a concentração de glicina no fluido cerebrospinal é da ordem de micromolar (Westergren *et al.*, 1994), os receptores NMDA com baixa afinidade para a glicina estariam entre 20 % a 65 % ocupados, enquanto aqueles com alta afinidade estariam quase todos saturados (Martina *et al.*, 2003). Embora nós tenhamos mostrado que a glicina exógena potencializa as respostas NMDA (figura 17), nossos resultados (fraco bloqueio do Mg²⁺; $\delta = 0,67$) e os de Nabekura *et al.* (1994) sugerem que os receptores NMDA do NTS são compostos pela subunidade NR2C ou NR2D, as quais apresentam alta afinidade para a glicina. Entretanto, o efeito potencializador da glicina variou de célula para célula em nossos experimentos. Por exemplo, com concentração de 500 μ M (figura 17C) a potencialização foi de 27 até 124 %, sugerindo níveis diferentes de saturação do sítio da glicina nos receptores NMDA. Isto pode ser devido a populações heterogêneas desses receptores no NTS subpostremal ou a diferentes concentrações de glicina no microambiente sináptico. De fato, Kew *et al.*, (1998) mostraram que populações de receptores NMDA com diferentes afinidades para a glicina podem co-existir em diferentes neurônios corticais de ratos. Além disso,

alguns trabalhos sugerem que a concentração de glicina na fenda sináptica, próxima dos receptores NMDA, é regulada eficientemente por transportadores de glicina de alta afinidade, mantendo sua concentração em baixos níveis (Chen *et al.*, 2003; Supplisson e Bergman, 1997). Existem pelo menos dois tipos de transportadores de glicina, o GLYT1 e o GLYT2 (Kim *et al.*, 1994; Liu *et al.*, 1993). O GLYT2 está presente em terminais pré-sinápticos de neurônios glicinérgicos e regula a neurotransmissão glicinérgica sensível à estricnina no tronco encefálico e medula espinhal, enquanto o GLYT1 está presente no encéfalo, tronco encefálico e medula espinhal (Zafra *et al.*, 1997; Smith *et al.*, 1992). Foi sugerido que o GLYT1 pode estar co-localizado com receptores NMDA e poderia estar regulando a concentração de glicina próxima aos receptores NMDA, na fenda sináptica (Bergeron *et al.*, 1998; Fedele *et al.*, 1993; Smith *et al.*, 1992; Supplisson e Bergman, 1997). Estudos de imunohistoquímica mostram uma alta imunorreatividade para GLYT1 e moderada para baixa para GLYT2 no NTS (Zafra *et al.*, 1995). Isto sugere que esses transportadores poderiam manter a concentração de glicina na fenda sináptica em níveis baixos, e que o sítio da glicina no receptor NMDA não se encontra saturado no NTS subpostremal.

Tem sido sugerido que uma fonte potencial de glicina para o receptor NMDA é a glicina liberada sinápticamente (Ahmadi *et al.*, 2003; Berger e Isaacson, 1999). Embora os terminais vindos do TS aparentemente não liberam glicina, existem demonstrações da presença de receptores e de terminais glicinérgicos no NTS (Cassell e Talman, 2000; Saha *et al.*, 1999; Takahama *et al.*, 1997). Estudos de imunohistoquímica demonstram que fibras e terminais com altos níveis de imunorreatividade para a glicina estão concentrados no NTS subpostremal e áreas

circunvizinhas do TS (Saha *et al.*, 1999; Sweazey, 1996). Neste trabalho nós mostramos eletrofisiologicamente a presença de receptores glicinérgicos sensíveis à estricnina no NTS subpostremal (figura 21). Embora a origem dos terminais glicinérgicos do NTS permaneça desconhecida, estudos de Pickel *et al.* (1996) sugerem que as projeções da amígdala para o NTS possam ser glicinérgicas. A função da glicina na neurotransmissão no NTS não é bem compreendida. Enquanto em ratos anestesiados a microinjeção de glicina no NTS pode evocar aumento (Kubo e Kihara, 1987) ou diminuição (Talman e Robertson, 1989) da pressão arterial e da frequência cardíaca, em ratos conscientes não altera nem a pressão arterial nem a frequência cardíaca (Mauad *et al.*, 1995). Trabalhos mais recentes, entretanto, mostram que a microinjeção de glicina no NTS aumenta a pressão arterial média e abole a resposta pressora para a ativação do quimiorreflexo (Pimentel *et al.*, 2003). Talman e Robertson (1989) sugeriram que as respostas de bradicardia e hipotensão (em ratos anestesiados) podem estar associadas à ação da glicina em seu sítio no receptor NMDA, potencializando a transmissão glutamatérgica.

Embora tradicionalmente a glicina seja considerada o co-agonista do sítio da glicina no receptor NMDA, a D-serina tem sido sugerida como o ligante endógeno predominante para este sítio. Os astrócitos circunvizinhos das sinapses glutamatérgicas, podem liberar D-serina em resposta à estimulação glutamatérgica (Schell *et al.*, 1997). Portanto, os terminais glicinérgicos ou os astrócitos contendo D-serina podem ser a fonte endógena do ligante para o sítio da glicina no receptor NMDA nos neurônios do NTS subpostremal.

7 CONCLUSÕES

- 1) Os três principais receptores envolvidos na neurotransmissão no NTS subpostremal são os ionotrópicos NMDA, não-NMDA e GABA_A.
- 2) Os receptores glutamatérgicos NMDA e não-NMDA podem estar co-localizados na mesma sinapse.
- 3) Os receptores NMDA são fracamente bloqueados pelo Mg²⁺ em potenciais de membrana próximos daquele de repouso, sugerindo que os mesmos possam contribuir significativamente para o sinal sináptico.
- 4) Os receptores NMDA do NTS subpostremal devem ser constituídos pelas subunidades NR2C-2D.
- 5) As correntes GABA_A retificam para fora e um outro íon, talvez o bicarbonato, permeia o canal.
- 6) O sítio da glicina no receptor NMDA dos neurônios do NTS subpostremal não se encontra saturado, de maneira que a glicina pode atuar como um modulador da neurotransmissão glutamatérgica NMDA.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMADI, S.; MUTH-SELBACH, U.; LAUTERBACH, A.; LIPFERT, P.; NEUHUBER, W.L.; ZEILHOFER, H.U. Facilitation of spinal NMDA receptor currents by spillover of synaptically released glycine. **Science** 300:2094 - 2097, 2003.
- AIZENMAN, E.; LIPTON, S. A.; LORING, R. H. Selective modulation of NMDA responses by reduction and oxidation. **Neuron** 2:1257 - 1263, 1989.
- ANCHISI, D.; SCELFO, B.; TEMPIA, F. Postsynaptic currents in deep cerebellar nuclei. **J. Neurophysiol.** 85:323 – 331, 2001.
- ANDRESEN, M. C.; KUNZE, D. L. Nucleus tractus solitarius-gateway to neural circulatory control. **Annu. Rev. Physiol.** 56:93 - 116, 1994.
- ANDRESEN, M. C.; YANG, M. Non-NMDA receptors mediate sensory afferent synaptic transmission in medial nucleus tractus solitarius. **Am. J. Physiol.** 259:307 - H1311, 1990.
- ANSON, L. C.; CHEN, P. E.; WYLLIE, D. J. A.; COLQUOUN, D.; SCHOEPFER, R. Identification of amino acids residues of NR2A subunit that control glutamate potency in recombinant NR1/NR2A NMDA receptors. **J. Neurosc.**, 18:581 – 589, 1998.
- ASCHER, P.; NOWAK, L. The role of divalent cations in the N-methyl-D-aspartate responses of mouse central neurones in culture. **J. Physiol.** 399:247 – 266, 1988.
- ASHWORTH-PREECE, M. A.; JARROTT, B.; LAWRENCE, A. J. Nicotinic acetylcholine receptor mediated modulation of evoked excitatory amino acid release in the nucleus tractus solitarius of the rat: evidence from *in vivo* microdialysis. **Brain Res.** 806:287 - 91, 1998.
- AYLWIN, M. L.; HOROWITZ, J. M.; BANHAM, A. C. NMDA Receptors contribute to primary visceral afferent transmission in the nucleus of the solitary tract. **J. Neurophysiol.** 77:2539 - 2548, 1997.

- AYLWIN, M. L.; HOROWITZ, J. M.; BONHAM, A. C. Non-NMDA and NMDA receptors in the synaptic pathway between area postrema and nucleus tractus solitarius. **Am. J. Physiol.** 275:H1236 - H1246, 1998.
- BARNES-DAVIES, M.; FORSYTHE, I. D. Pre and postsynaptic glutamate receptors at a giant excitatory synapse in rat auditory brainstem slices. **J. Physiol.** 488:387 - 406, 1995.
- BARRACO, R. **Nucleus of the Solitary Tract**. I. Robin A. Barraco (ed.), CRC Press, Boca Raton, 1994.
- BARRACO, R.; EL-RIDI, M.; ERGENE, E.; PARIZON, M.; BRADLEY, D. An atlas of the rat subpostremal nucleus tractus solitarius. **Brain Res. Boll.** 29:703 - 765, 1992.
- BENVENISTE, M.; CLEMENTS, J.; UYKLUCKY, L.; MAYER, M. L. A kinetic analysis of the modulation of N-methyl-D-aspartic acid receptors by glycine in mouse cultured hippocampal neurones. **J. Physiol.** 428:333 - 357, 1990.
- BENVENISTE, M.; MAYER, M. L. Kinetic analysis of antagonist action at N-methyl-D-aspartic acid receptors. Two binding sites each for glutamate and glycine. **Biophys. J.** 59:560 - 573, 1991.
- BENVENISTE, M.; MAYER, M. L. Multiple effects of spermine on N-methyl-D-aspartic acid receptor responses of rat cultured hippocampal neurones. **J. Physiol.** 464:131 - 163, 1993.
- BERGER, A. J.; DIENDONNÉ, S.; ASCHER, P. Glycine uptake governs glycine site occupancy at NMDA receptors of excitatory synapses. **J. Neurophysiol.** 80:3336 - 3340, 1998.
- BERGER, A. J.; ISAACSON, J. S. Modulation of motoneuron N-methyl-D-aspartate receptors by the inhibitory neurotransmitter glycine. **J. Physiol.** 93:23 - 27, 1999.
- BERGERON, T; MEYER, T. M.; COYLE, J. T.; GREENE, R. W. Modulation of N-methyl-D-aspartate receptor function by glycine transport. **Proc Natl Acad Sci USA** 95:15730 - 15734, 1998.

- BONHAM, A. C.; CHEN, C. Y. Glutamatergic neural transmission in the nucleus tractus solitarius: *N*-methyl-D-aspartate receptors. **Clin Exp Pharmacol Physiol.** 29:497 - 502, 2002.
- BORMANN, J.; HAMILL, O.P.; SAKMANN, B. Mechanism of anion permeation through channels gated by glycine and GABA in mouse cultured spinal neurones. **J. Physiol.** 385:243 - 286, 1987.
- BOUSQUET, P.; FELDMAN, B. R.; SCHWARTZ, J. Evidence for a neuromodulatory role of GABA at the first synapse of the baroreceptor reflex pathway. Effects of GABA derivatives injected into the NTS. **Naun. Schmied. Arch. Pharmacol.** 319:168 - 171, 1982.
- BROOKS, P. A.; SPYER, K. M. Evidence for NMDA receptor-mediated synaptic events in the rat nucleus tractus solitarii *in vitro*. **J Physiol.** 467:421P, 1993.
- BURGARD, E. C.; TIETZ, E. I.; NEELANDS, T. R.; MACDONALD, R. L. Properties of recombinant gamma-aminobutyric acid A receptor isoforms containing the alpha 5 subunit subtype. **Mol. Pharmacol.** 50:119 - 127, 1996.
- BURNASHEV, N.; ZHOU, Z.; NEHER, E.; SAKMANN, B. Fractional calcium currents through recombinant GluR channel of the NMDA, AMPA and kainite receptor subtypes. **J. Physiol.** 485.2:403 - 418, 1995.
- CALLERA, J. C.; BONAGAMBA, L. G. H.; SÉVOZ, C.; LAGUZZI, R.; MACHADO, B. H. Cardiovascular effects of microinjection of low doses of serotonin into the NTS of unanesthetized rats. **Am. J. Physiol.** 272:R1135 - R1142, 1997a.
- CALLERA, J. C.; SÉVOZ, C.; LAGUZZI, R.; MACHADO, B. H. Microinjection of a serotonin 3 receptor agonist into the NTS of unanesthetized rats inhibits the bradycardia evoked by activation of the baro- and chemoreflex. **J. Auton. Nerv. Syst.** 63:127 - 136, 1997b.
- CASSELL, M. D.; TALMAN, W. T.; Glycine receptor (gephyrin) immunoreactivity is present on cholinergic neurons in the dorsal vagal complex. **Neurosci.** 95(2):489 - 497, 2000.
- CHATTERTON, J. E.; AWOBULUYI, M.; PREMKUMAR, L. S.; TAKAHASHI, H.; TALANTOVA, M.; SHIN, Y.; CUI, J.; TU, S.; SEVARINO, K. A.; NAKANISHI, N.;

- TONG, G.; LIPTON, S. A.; ZHANG, D. Excitatory glycine receptors containing the NR3 family of NMDA receptor subunits. **Nature**. 415:793 - 798, 2002.
- CHEBID, M; JOHNSTON, G. A. GABA-activated ligand gated ion channels: medicinal chemistry and molecular biology. **J. Med. Chem.** 43:1427-1447, 2000.
- CHEN, L.; MUHLHAUSER, M.; YANG, C. R. Glycine transporter-1 blockade potentiates NMDA-mediated responses in rat prefrontal cortical neurons in vitro and in vivo. **J Neurophysiol.** 89:691 - 703, 2003.
- CHOI, D. W.; ROTHMAN, S. M. The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemic neuronal death. **Ann. Rev. Neurosci.** 13:171 - 182, 1990.
- CIABARRA, A. M.; SULLIVAN, J. M.; GAHN, L. G.; PECHT, G.; HEINEMMAN, S.; SEVARINO, K. A. Cloning and characterization of chi-1: a developmentally regulated member of a novel class of the ionotropic glutamate receptor family . **J Neurosci.** 15(10):6498 - 508, 1995.
- COLLINGRIDGE, G. L.; GAGE, P. W.; ROBERTSON, B. Inhibitory postsynaptic currents in rat hippocampal CA1 neurons. **J. Physiol.** 356:551 – 564, 1984.
- COLOMBARI, E.; BONAGAMBA, L. G. H.; MACHADO, B. H. Mechanisms of pressor and bradycardic responses to L-glutamate microinjected into the NTS of conscious rats. **Am. J. Physiol.** 266:R730 - R738, 1994.
- CONTRERAS, R. J.; BECKSTEAD, R. M.; NORNGREN, R. The central projections of the trigeminal, facial, glossopharyngeal and vagus nerves: an autoradiographic study in the rat. **J. Auto. Nerv. Syst.** 6:303 – 322, 1982.
- COTMAN, C. W.; MANAGHAN, D. T.; OTTERSEN, O.; STORM-MATHISEN, J. Anatomical organization of excitatory amino acid receptors and their pathways. **Trends Neurosci.** 10:273 - 280, 1987.
- DALE, N.; ROBERTS, A. Dual-component amino-acid-mediated synaptic potential: excitatory drive for swimming in *Xenopus* embryos. **J. Physiol.** 363:35 - 59, 1985.

- DANYSZ, W.; PARSONS, C. G. Glycine and *N*-methyl-D-aspartate: physiological significance and possible therapeutic applications. **Pharmacol Rev.** 50:598 - 664, 1998.
- DEUCHARS, J.; LI, Y.; KASPACOV, S.; PATON, J. F. R. Morphological and electrophysiological properties of neurones in the dorsal vagal complex of the rat activated by arterial baroreceptors. **J. Comp. Neurol.** 417:233 – 249, 2000.
- DIETRICH, W. D.; LOWRY, O. H.; LOWRY, A. D. The distribution of glutamate GABA and aspartate in the nucleus tractus solitarius of the cat. **Brain Res.** 237:254 - 260, 1982.
- DINGLEDINE, R.; BORGES, K.; BOWIE, D.; TRAYNELIS, S. F. The glutamate receptor ion channel. **Pharmacol. Rev.** 7:51 - 61, 1999.
- DUDEL, J.. Voltage dependence of amplitude and time course of inhibitory synaptic current in crayfish muscle. **Pflügers Arch.** 371:167 – 174, 1977.
- DUNBAR, J. C.; ERGENE, E.; BARRACO, R. Neuropeptide-Y stimulation of insulin secretion is mediated via the nucleus tractus solitarius. **Horm Metab Res.** 24:103 - 105, 1992.
- ECCLES, J. C.; NICOLL, R. A.; OSHIMA, T.; RUBIA, F. J. The anionic permeability of the inhibitory postsynaptic membrane of hippocampal pyramidal cells. **Royal Society of London B.** 198:345 – 361, 1977.
- EDWARDS, F. A.; KONNERTH, A.; SAKMANN, B. Quantal analysis of inhibitory synaptic transmission in the dentate gyrus of rat hippocampal slices; a patch-clamp study. **J. Physiol.** 430:213 – 249, 1990.
- ERGENE, E.; DUNBAR, J. C.; BARRACO, R. A. Role of the nucleus of the solitary tract in nutrient homeostasis and ingestive behavior. In: **Nucleus of the Solitary Tract.** I. Robin A. Barraco (ed.), CRC Press, Boca Raton, 1994, pp. 341.
- ERGENE, E.; DUNBAR, J. C.; O'LEARY, D. S.; BARRACO, R. A. Activation of P₂ –purinoceptors in the nucleus tractus solitarius mediate depressor responses. **Neurosci. Lett.** 174:188 - 192, 1994b.

- FEDELE, E.; SMITH, D.; FOSTER, A. C. Autoradiographical evaluation of [³H]glycine uptake in rat forebrain: cellular localization in the hippocampus. **Neurosci. Lett.** 161:4 - 8, 1993.
- FELDER, R. B.; MIFFLIN, S. W. Baroreceptor and chemoreceptor afferent processing in the solitary tract nucleus. In: **Nucleus of the Solitary Tract**. I. Robin A. Barraco (ed.), CRC Press, Orlando, FL, 1994, pp. 169-186.
- FELDMEYER, D.; CULL-CANDY, S. Functional consequences of changes in NMDA receptor subunit expression during development. **J. Neurocytol.** 25:857 - 867, 1996.
- FINKEL, A. S.; REDMAN, S. J. The synaptic current evoked in cat spinal motoneurons by impulses in single group Ia axons. **J. Physiol.** 342: 615 - 632, 1983.
- FLETCHER, E. J.; MILLAR, J. D.; ZEMAN, S.; LODGE, D. Non-competitive antagonism of N-methyl-D-aspartate by displacement of an endogenous glycine-like substance **Eur. J. Neurosci.** 1:196 - 203, 1989.
- GEISER, J. R.; MELCHER, T.; KOH, D. S.; SAKMANN, B.; SEEBURG, P. H.; JONAS, P.; MONYER, H. Relative abundance of subunit mRNAs determines gating and Ca²⁺ permeability of AMPA receptors in principal neurons and interneurons in rat CNS. **Neuron.** 15(1):193 - 204, 1995.
- GLAUM, S. R.; MILLER, R. J. Metabotropic glutamate receptors mediate excitatory transmission in the nucleus of the solitary tract. **J. Neurosci.** 12:2251 - 2258, 1992.
- GLEASON, E.; BORGES, S.; WILSON, M. Synaptic transmission between pairs of retinal amacrine cells in culture. **J. Neurosci.** 13:2359 - 2370, 1993..
- GOLD, M. R.; MARTIN, A. R. Characteristics of inhibitory post-synaptic currents in brain-stem neurones of the lamprey. **J. Physiol.** 342:85 - 98, 1983.
- GORDON, F. J.; LEONE, C. Non-NMDA receptors in the nucleus of the tractus solitarius play the predominant role in mediating aortic baroreceptor reflexes. **Brain Res.** 568:319 - 322, 1991.

- GRABAUSKAS, G.; BRADLEY, R. M. Frequency-dependent properties of inhibitory synapses in the rostral nucleus of the solitary tract. **J Neurophysiol.** 89:199 - 211, 2003.
- GRABAUSKAS, G.; BRADLEY, R. M. Postnatal development of inhibitory synaptic transmission in the rostral nucleus of the solitary tract. **J. Neurophysiol.** 85:2202 – 2212, 2001.
- GRANATA, A. R.; REIS, D. J. Release of [³H]L-glutamate acid (L-glu) and [³H]D-aspartate (D-asp) in the area of the nucleus tractus solitarius *in vivo* produced by stimulation of the vagus nerve. **Brain Res.** 259:77 - 93, 1983.
- GRANATA, A. R.; SVED, A. F.; REIS, D. J. In vivo release by vagal stimulation of L-³H-glutamic acid in the nucleus tractus solitarius preloaded with L-³H]glutamine. **Brain Res. Bull.** 12:5 - 9, 1984.
- GRAY, R.; JOHNSTON, D. Rectification of single GABA-gated chloride channels in adult hippocampal neurons. **J. Neurophysiol.** 54(1):134 - 42, 1985.
- GUASTELLA, J.; BRECHA, M.; WEIGMANA, C.; LESTER, H. A.; DAVIDSON, N. Cloning, expression, and localization of a rat high affinity glycine transporter. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 89:7189 - 7193, 1992.
- HAMILL, O. O. P.; MARTY, A.; NEHER, E.; SAKMANN, B.; SIGWORTH, F. J. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cell and cell-free membrane patches. **Pflügers Arch.** 391:85 - 100, 1981.
- HAMILTON, R. B.; NORNGREN, R. Central projections of gustatory nerves in the rat. **J. Comp. Neurol.** 222:560 – 577, 1984.
- HASHIMOTO, A.; NISHIKAWA, T.; OKA, T.; TAKAHASHI, K. Endogenous D-serine in rat brain: N-methyl-D-aspartate receptor-related distribution and aging. **J. Neurochem.** 60:783 - 786, 1993.
- HASHIMOTO, A.; NISHIKAWA, T.; HAYASHI, T.; FUJII, N.; HARADA, K.; OKA, T.; TAKAHASHI, L. The presence of free D-serine in rat brain. **FEBS.** 296:33 - 36, 1992.
- HESTRIN, S.; NICOLL, R. A.; PERKEL, D. J.; SAH, P. Analysis of excitatory synaptic action in pyramidal cells using whole-cell recording from rat hippocampal slices. **J. Physiol.** 422:203 – 225, 1990.

- HOSOKAWA, Y.; SCIANCALEPORE, M.; STRATTA, F.; MARTINA, M.; CHERUBINI, E. Developmental changes in spontaneous GABAA-mediated synaptic events in rat hippocampal CA3 neurons. **Eur. J. Neurosci.** 6:805 – 813, 1994.
- HUANG, R. Q.; DILLON, G. H. Functional analysis of GABA(A) receptors in nucleus tractus solitarius neurons from neonatal rats. **Brain Res.** 921(1-2):183 – 94, 2001.
- IKEDA, K.; NAGASAWA, M.; MORI, H.; ARAKI, K.; SAKIMURA, K.; WATANABE, M.; INOUE, Y.; MISHINA, M. Cloning and expression of the $\epsilon 4$ subunit of the NMDA receptor channel. **FEBS Lett.** 313:34 – 38, 1992.
- INOMATA, N.; OOMURA, Y.; AKAIKE, N.; EDWARDS, C. The anion selectivity of the γ -aminobutyric acid controlled chloride channel in the perfused spinal ganglion cell of frog. **Neurosci. Res.** 3:371 – 383, 1986.
- IVERSEN, L. L. Amino acids and peptides: fast and slow chemical signals in the nervous system. **Proc. R. Soc. Lond.** B221:245 – 260, 1984.
- JOHNSON, J. W.; ASCHER, P. Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons. **Nature**, 325:529 – 531, 1987.
- KAILA, K.; VOIPIO, J.; PAALASMAA, P.; PASTERNAK, M.; DEISZ, R. A. The role of bicarbonate in GABA_A receptor-mediated IPSCs of rat neocortical neurones. **J. Physiol.** 464:273 – 289, 1993.
- KAPUR, J.; HAAS, K. F.; MACDONALD, R. L. Physiological properties of GABA_A receptors from acutely dissociated rat dentate granule cells. **J Neurophysiol.** 81:2462 – 2471, 1999.
- KAWAI, Y.; SEMBA, E. Electrophysiological and morphological characterization of cytochemically-defined neurons in the caudal nucleus of tractus solitarius of the rat. **Neurosci.** 89:1347 – 1355, 1999.
- KAWAI, Y.; SENBA, E. Organization of excitatory and inhibitory local networks in the caudal nucleus of tractus solitarius of rats revealed in in vitro slice preparation. **J. Comp. Neurol.** 373:309 – 321, 1996.

- KEMP, J. A.; FOSTER, A. C.; LEESON, P. D.; PRIESTLEY, T.; TRIDGETT, R.; IVERSEN, L.L.; WOODRUFF, G. N. 7-chlorokynurenic acid is a selective antagonist at the glycine modulatory site of the N-methyl-D-aspartate receptor complex. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 85:6547 - 6550, 1988.
- KEW JNC, RICHARDS JG, MUTEL V AND KEMP JA. Development changes in NMDA receptor glycine affinity and ifenprodil sensitivity reveal three distinct populations of NMDA receptors in individual rat cortical neurons. **J Neurosci.** 18:1935 - 1943, 1998.
- KIM, K. M.; KINGSMORE, S. F.; HAN, H.; YANG-FENG, T. L.; GODINOT, N.; SELDIN, M. F.; CARON, M. G.; GIROS, B. Cloning of the human glycine transporter type 1: molecular and pharmacological characterization of novel isoform variants and chromosomal localization of the gene in the human and mouse genomes. **Mol. Pharmacol.** 45:608 - 617, 1994.
- KING, M. S.; BRADLEY, R. M. Relationship between structure and function of neurons in the rat rostral nucleus tractus solitarii. **J. Comp. Neurol.** 344:50-64, 1994.
- KLECKNER, N. W.; DINGLEDINE, R. Requirement for glycine in activation of NMDA receptor expressed in *Xenopus* oocytes. **Science** 241: 835 - 837, 1988.
- KUBO, T.; KIAHARA, M. Evidence for gamma-aminobutyric acid receptor-mediated modulation of the aortic baroreceptor reflex in the nucleus tractus solitarii of the rat. **Neurosci. Lett.** 89:156 - 160, 1988.
- KUBO, T.; KIHARA, M. Evidence for the presence of GABAergic and glycine-like systems responsible for cardiovascular control in the nucleus tractus solitarii of the rat. **Neurosci. Lett.** 74:331 - 336, 1987.
- KUNER, T.; SCHOEPFER, R. Multiple structural elements determine subunit specificity of Mg²⁺ block in NMDA receptor channels. **J. Neurosci.** 16:3549 - 58, 1996.
- KURYATOV, A.; LAUBE, B.; BETZ, H.; KUHZE, J. Mutational analysis of the glycine-binding site of the NMDA receptor: structural similarity with bacterial amino acid-binding proteins. **Neuron** 12:1291 - 300, 1994.

- KUTSUWADA, T.; KASHIWABUCHI, N.; MORI, H.; SUKIMURA, K.; KASHIYA, E.; ARAKE, K.; MEGURO, H.; MASAKI, H.; KUMANISHI, T.; ARAKAWA, M.; MISHINA, M. Molecular diversity of the NMDA receptor channel. **Nature** 358:36 - 41, 1992.
- LAWRENCE, A. J.; JARROTT, B. Neurochemical modulation of cardiovascular control in the nucleus tractus solitarius. **Prog. Neurobiol.** 48:21 - 53, 1996.
- LE GALLOUDEC, E.; MERAHI, N.; LAGUZZI, R. Cardiovascular changes induced by drugs in the rat nucleus tractus solitarii. **Brain Res.** 503:322 - 325, 1989.
- LEONE, C.; GORDON, F. J. Is L-glutamate a neurotransmitter of baroreceptor innervation in the nucleus tractus solitarius. **J Pharmacol. Exp. Ther.** 250:953 - 962, 1989.
- LEWIS, C. A.; FABER, D. S.. Properties of spontaneous inhibitory synaptic currents in cultured rat spinal cord and medullary neurons. **J. Neurophysiol.** 76:448 - 460, 1996.
- LIU, Q. R.; LÓPEZ-CORCUERA, B.; MANDIYAN, S.; NELSON, H.; NELSON, N. Cloning and expression of a spinal cord- and brain-specific glycine transporter with novel structure features. **J. Biol. Chem.** 268:22802 - 22808, 1993.
- LOEWY, A. D.. Central autonomic pathway. *In* **Central Regulation of Autonomic Functions.** A. D. Loewy & K. M. Spyer, Ed. : pp 88 - 103. Oxford. New York, 1990
- LUO, J.; WANG, Y.; YASUDA, R. P.; DUNAH, A. W.; WOLFE, B.B. The majority of N-methyl-D-aspartate receptor complexes in adult rat cerebral cortex contain at least three different subunits (NR1/NR2A/NR2B). **Mol. Pharmacol.** 51:79 - 86, 1997.
- MACDERMOTT, A. B.; MAYER, M. L.; WESTBROOK, G. L.; SMITH, S. J.; BARKER, J. L. NMDA-receptor activation increases cytoplasmic calcium concentration in cultured spinal cord neurones. **Nature** 321:519 - 522, 1986.
- MACHADO, B. H., BONAGAMBA, L. G. H. Cardiovascular response to microinjection of *trans*-(±)-ACPD into the NTS were similar in conscious and chloralose anesthetized rats. **Braz. J. Med. Biol. Res.** 31:573 - 579, 1998.

- MACHADO, B. H.; BONAGAMBA, L. G. H. Microinjection of L-glutamate into the nucleus tractus solitarii increases arterial pressure in conscious rats. **Brain Res.** 576:131 - 138, 1992.
- MACHADO, B. H.; CASTANIA, J. A.; BONAGAMBA, L. G. H.; SALGADO, H. C. Neurotransmission of autonomic components of aortic baroreceptor afferents in the NTS of awake rats. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.** 279:H67 – H75, 2000.
- MALEY, B. E. Immunocytochemical localization of neurochemical synaptic circuits of the nucleus tractus solitarii at the light microscopic and ultrastructural level. In: **Nucleus of the Solitary Tract**. I. Robin A. Barraco (ed.), CRC Press, Orlando, FL, pp. 63-73, 1994.
- MANZONI, O.; FAGNI, L.; PIN J-P.; RESENDREN, F.; POULAT, F.; SLADECCZEK, F., BOCKAERT, J. (*Trans*)-1-amino-cyclopentyl-1,3-dicarboxylate stimulates quisqualate phosphoinositide-coupled receptors but not ionotropic glutamate receptors in striatal neurons and *Xenopus* oocytes. **Mol. Pharmacol.** 38:1 – 6, 1990.
- MARTINA, M.; KRASTENIAKOV, N. V.; BERGERON, R. D-Serine differently modulates NMDA receptor function in rat CA1 hippocampal pyramidal cells and interneurons. **J. Physiol.** 548.2:411 – 423, 2003.
- MAUAD, H.; COLOMBARI, D.; BONAGAMBA, C. G. H.; MACHADO, B. H. Glycine blocks the pressor response to L-glutamate microinjected into the nucleus tractus solitarii of conscious rats. **Brazilian J. Med. Biol. Res.** 28:699 – 704, 1995.
- MAYER, M. L.; VYKICKY, L.; CLEMENTS, J. Regulation of NMDA receptor desensitization in mouse hippocampal neurons by glycine. **Nature** 338:425 - 427, 1989.
- MAYER, M. L.; WESTBROOK, G. L.; GUTHRIE, P. B. Voltage-dependent block by Mg²⁺ of NMDA responses in spinal cord neurones. **Nature** 309:261 – 263, 1984.

- McBAIN, C. J.; DINGLEDINE, R. Dual component miniature excitatory synaptic currents in rat hippocampal CA3 pyramidal neurons. **J. Neurophysiol.** 68:16 – 27, 1992.
- McBAIN, C. J.; MAYER, M. L. *N*-methyl-D-aspartic acid receptor structure and function. **Physiol. Rev.** 74:723 - 760, 1994.
- McLENNAN, H.; LIU, J. The action of six antagonist of the excitatory amino acids on neurons of the rat spinal cord. **Exp. Brain Res.** 45:151 - 156, 1982.
- MEELEY, M. P.; UNDERWOOD, M. D.; TALMAN, W. T.; REIS, D. J. Content and *in vitro* release of endogenous amino acids in the area of the nucleus of the solitary tract of the rat. **J. Neurochem.** 53:1807 - 1817, 1989.
- MEHTA, A. K.; TICKU, M. K. An update on GABA_A receptors. **Brain Res. Rev.** 29:196 – 217, 1999.
- MEREU, G.; COSTA, E.; ARMSTRONG, D. M.; VICINI, S.. Glutamate receptor subtypes mediate excitatory synaptic currents of dopamine neurons in midbrain slices. **J. Neurosci.** 11:1359 – 1366, 1991.
- MILES, R. Frequency dependence of synaptic transmission in nucleus of the solitary tract *in vitro*. **J. Neurophysiol.** 55:1076 - 1090, 1986.
- MONAGHAM, D. T.; COTMAN, C. W. Distribution of *N*-methyl-D-aspartate sensitive L-³H-glutamate-binding sites in rat brain. **J. Neurosci.** 11:2909 - 2919, 1985.
- MONAGHAN, D. T.; BRIDGES, R. J.; COTMAN, C. W. The excitatory amino acid receptors: their classes, pharmacology, and distinct properties in the function of the central nervous system. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.** 29:365 - 402, 1989.
- MONAGHAN, D. T.; OLVERMAN, H. J.; NGUYEN, L.; WATKINS, J. C.; COTMAN, C. W. Two classes of *N*-methyl-D-aspartate recognition sites: differential distribution and differential regulation by glycine. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 85:9836 – 9840, 1988.
- MONAGHAN, J. B.; BIESTERFELDT, J. P.; HOOD, W. F.; COMPTON, M. I.; CORDI, A. A.; VASQUEZ, M. I.; LAUTHORN, T. H.; WOOD, P. L. Differential

- modulation of the associated glycine recognition site by receptor antagonists. **Mol. Pharmacol.** 37:780 - 784, 1990.
- MONYER, H.; BURNASHEV, N.; LAURIE, D. J.; SAKMANN, B.; SEEBURG, P. H. Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. **Neuron** 12:529 - 540, 1994.
- MONYER, H.; SPRENGEL, R.; SCHOEPFER, R.; HERB, A.; HIGUCHI, M.; LOMELI, H.; BURNASHEV, N.; SAKMANN, B.; SEEBURG, P. H. Heteromeric NMDA receptors: Molecular and functional distinctions of subtypes. **Science** 256:1217 - 1221, 1992.
- MORI, H.; MISHINA, M. Structure and function of the NMDA receptor channel. **Neuropharmacol** 34(10):1219 - 37, 1995.
- MORIYOSHI, K.; MASU, M.; ISHII, T.; SHIGEMOTO, R.; MIZUNO, N.; NAKANISHI, S. Molecular cloning and characterization of the rat NMDA receptor. **Nature** 354:31 - 37, 1991.
- MOSBACHER, J.; SCHOEPFER, R.; MONYER, H.; BURNASHEV, N.; SEEBURG, P. H.; RUPPERSBERG, J. P. A molecular determinant for submillisecond desensitization in glutamate receptors. **Science.** 11;266(5187):1059 - 62, 1994.
- NABEKURA J, KAWAMOTO I AND AKAIKE N. Developmental change in voltage dependency of NMDA receptor-mediated response in nucleus tractus solitarii neurons. **Brain Res.** 648:152 - 156, 1994
- NAKAGAWA T, WAKAMORI M, SHIRASAKI T, NAKAYE T, AKAIKE N. gamma-Aminobutyric acid-induced response in acutely isolated nucleus solitarii neurons of the rat. **Am. J. Physiol.** 260(4 Pt 1):C745 - 9, 1991.
- NAKAGAWA, T.; SHIRASAKE, T; TATEISHI, N.; MURASE, K.; AKAIKE, N. Effects of antagonist on N-methyl-D-aspartate response in acutely isolated nucleus tractus solitarii neurons of the rat. **Neurosci. Lett.** 113:169 - 174, 1990.
- NAKANISHI, S. Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain functions. **Science** 258:597 - 603, 1992.

- NEHER, E.; STEINBACH, J. H. Local anaesthetics transiently block currents through single acetylcholine-receptor channels. **J. Physiol.** 277:153 – 176, 1978.
- NELSON, D. O.; COHEN, H. L.; FELDMAN, J. L.; MCCRIMMON, D. R. Cardiovascular function is altered by picomole injections of glutamate into rat medulla. **J. Neurosci.** 8(5):1684 - 1693, 1988.
- NELSON, P. G.; PUN, R. Y. K.; WESTBROOK, G. L. Synaptic excitation in cultures of mouse spinal cord neurones: receptor pharmacology and behavior of synaptic currents. **J. Physiol.** 372: 169 – 190, 1986.
- NISHI, M.; HINDS, H.; LU, H.; KAWATA, M.; HAYASHI, Y. Motoneuron specific expression of NR3B, a novel NMDA-type glutamate receptor subunit that works in a dominant-negative manner. **J. Neurosc.** 21:RC185:1 - 6, 2001.
- NOWAK, C. M.; BREGESTOVSKI, P.; ACHER, P.; HERBET, A.; PROCHIANTZ, A. Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurons. **Nature** 307:462 - 465, 1984.
- O'BRIEN, J.; ISAACSON, J. S.; BERGER, A. J. NMDA and non-NMDA receptors are co-localized at excitatory synapses of rat hypoglossal motoneurons. **Neurosci. Lett.** 227:5 - 8, 1997.
- OBRENOVITCH, T. P.; HARDY, A. M.; URENJAK, J. High extracellular glycine does not potentiate *N*-methyl-D-aspartate-evoked depolarization *in vitro*. **Brain Res.** 746:190 - 194, 1997.
- OTIS, T. S.; STALEY, K. J.; MODY, I. Perpetual inhibitory activity in mammalian brain slices generated by spontaneous GABA release. **Brain Res.** 545:142 – 150, 1991.
- OTIS, T. S.; WU, Y. C.; TRUSSEL, L. O. Delayed clearance of transmitter and the role of glutamate transporters at synapses with multiple release sites. **J. Neurosci.** 16:1634 – 1644, 1996.
- OZAWA, S.; KAMIYA, H.; TSUZUKI, K. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. **Prog. Neurobiol.** 54:581 - 618, 1998.

- PALKOVITS, M. Neuropeptides and biogenic amines in central cardiovascular control mechanisms. In: **Central Nervous System Mechanisms in Hypertension**. J. P. Buckoey and C. M. Ferrario (Eds.), New York, Raven Press, pp. 73-87. 1981.
- PALMER,, E.; MONAGHAN, D. T.; COTMAN, C. W. *Trans*-ACPD, a selective agonist of the phosphoinositide-coupled excitatory amino acid receptor. **Eur. J. Pharmacol.** 166:585 - 587, 1989.
- PARSONS CG, DANYSZ W, HESSELINK M, HARTMANN S, LORENZ B, WOLLWNBURG C AND QUARCK G. Modulation of NMDA receptors by glycine – introduction to some basic aspects and recent developments. **Amino Acids** 14(1-3):207 - 216, 1998.
- PATON, J. F.; FOSTER, W. R.; SCHWABER, J. S. Characteristic firing behavior of cell types in the cardiorespiratory region of the nucleus tractus solitarii of the rat. **Brain Res.** 26;604(1-2):112 - 25, 1993.
- PAWLOSKI-DAHM, C.; GORDON, F. J. Evidence for a kynurenate-insensitive glutamate receptor in nucleus tractus solitarii. **Am. J. Physiol.** 262:H1611 - H1615, 1992.
- PICKEL, V. M.; VAN BOCKSTAELE, E. J.; CHAN, J.; CESTARI, D. M. GABAergic neurons in rat nuclei of solitary tract receive inhibitory-type synapses from amygdaloid efferents lacking detectable GABA-immunoreactivity. **J Neurosci Res.** 44:446 - 458, 1996.
- PIMENTEL, F. F.; BONAGAMBA, L. G. H.; MACHADO, B. H. Pressor response to chemoreflex activation before and after microinjection of glycine into the NTS of awake rats. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.** 284:R1000 – R1009, 2003.
- PRIESTLEY, T.; LAUGHTON, P.; MYERS, J.; LE BOURDELLES, B.; KERBY, J.; WHITING, P.J. Pharmacological properties of recombinant human *N*-methyl-D-aspartate receptors comprising NR1a/NR2A and NR1a/NR2B subunit assemblies expressed in permanently transfected mouse fibroblast cells. **Mol. Pharmacol.** 48:841 - 848, 1995.

- RALL, W.; SEGEV, I. Space-clamp problems when voltage clamping branched neurons with intracellular microelectrodes. *In* **Voltage and Patch Clamping With Microelectrodes**. American Physiology Society, p.p. 191-215, 1985.
- RAVINDRANATHAN, A.; DONEVAN, S. D.; SUGDEN, S. G.; GREIG, A.; RAO, M.S.; PARKS, T. N. Contrasting molecular composition and channel properties of AMPA receptors on chick auditory and brainstem motor neurons. **J Physiol.** 15:523 Pt 3:667 - 84, 2000.
- ROPERT, N.; MILES, R.; KORN, H. Characteristics of miniature inhibitory postsynaptic currents in CA1 pyramidal neurones of rat hippocampus. **J. Physiol.** 428:707 – 722, 1990.
- SAHA, S.; BATTEN, T. F.; MCWILLIAM, P. N. Glycine-immunoreactive synaptic terminals in the nucleus tractus solitarii of the cat: ultrastructure and relationship to GABA-immunoreactive terminals. **Synapse** 33(3):192 - 206, 1999.
- SAKMANN, B.; STUART, G. Patch-pipette recordings from the soma dendrites, and axon of neurons in brain slices. *In*: **Single-Channel Recording second edition** (Ed. By Bert Sakmann and Erwin Neher), pp 199-211, 1995.
- SALT, T. E. Modulation of NMDA receptor-mediated responses by glycine and D-serine in the rat thalamus in vivo. **Brain Res.** 481:403 - 406, 1989.
- SALT, T. E.; EATON, S. A. Functions of ionotropic and metabotropic glutamate receptors in sensory transmission in the mammalian thalamus. **Prog. Neurobiol.** 48:55 - 72. 1996.
- SATO, K.; KIYAMA, H. H.; TOHYAMA, M. The differential expression patterns of messenger RNAs encoding non-N-methyl-D-aspartate glutamate receptor subunits (GluR 1-4) in the rat brain. **Neuroscience** 52:515 - 539, 1993.
- SAWCHENKO, P. E. Central connections of the sensory and motor nuclei of the vagus nerve. **J. Auton. Nerv. Syst.** 9:13 - 26, 1983.
- SCHELL, M. J.; BRADY, R. O. JR; MOLLIVER, M. E.; SNYDER, S. H. D-serine as a neuromodulator: regional and developmental localization in rat brain glia resemble NMDA receptors. **J. Neurosci.** 17:1604 - 1615, 1997.

- SCHELL, M. J.; MOLLIVER, M. E.; SNYDER, S. H. D-serina, an endogenous synaptic modulator: localization to astrocytes and glutamate-stimulated release. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 92:3948 - 3952, 1995.
- SCHNEGGENBURGER, R.; KONNERTH, A. GABA-mediated synaptic transmission in neuroendocrine cells: a path-clamp study in a pituitary slice preparation. **Pflügers Arch.** 421:364 - 373, 1992.
- SEGAL, M.; BARKER, J. L. Rat hippocampal neurons in culture: properties of GABA-activated Cl⁻ ion conductance. **J. Neurophysiol.** 51(3):500 - 15, 1984.
- SHOFIELD, P. R.; DARLISON, M. G.; FUJITA, N.; BURT, D. R.; STEPHENSON, F. A.; RODRIGUEZ, H.; RHEE, L. M.; RAMACHANDRAN, J.; REALE, V.; GLENCORSE, T. A.; SEEBURG, P. H.; BARNARD, E. A. Sequence and functional expression of the GABA_A receptor shows a ligand-gated receptor superfamily. **Nature** 328:221 - 227, 1987.
- SMITH, B. N.; DOU, P.; BARBER, W. D.; DUDEK, F. E. Vagally evoked synaptic currents in the immature rat nucleus *tractus solitarii* in an intact *in vitro* preparation. **J. Physiol.** 512:149 - 162, 1998.
- SMITH, K. E.; BORDEN, L. A.; HARTING, P. R.; BRANCHEK, T.; WEINSHANK, R. L. Cloning and expression of a glycine transporter reveal co-localization with NMDA receptors. **Neuron** 8:927 - 935, 1992.
- SPENCER, S. E.; TALMAN, W. T. Central modulation of gastric pressure by substance P: a comparison with glutamate and acetylcholine. **Brain Res.** 385:371 - 374, 1986.
- SPYER, K. M.; LAMBERT, J. H.; THOMAS, T. Central nervous system control of cardiovascular function: neural mechanisms and novel modulators. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.** 24:743 - 747, 1997.
- SUCHER, N. J.; AKBARIAN, S.; CHI, C. L.; LECLERC, C. L.; AWOBULUYI, M.; DEITCHER, D. L.; WU, M. K.; YUAN, J. P.; JONES, E. G.; LIPTON, S. A. Developmental and regional expression pattern of a novel NMDA receptor-like subunit (NMDAR-L) in the rodent brain. **J. Neurosci.** 15(10):6509 - 20, 1995.

- SUGIYAMA, H.; ITO, I.; HIRONO, C. A new type of glutamate receptor linked to inositol phospholipid metabolism. **Nature** 325:531 - 533, 1987.
- SUPPLISSON, S.; BERGMAN, C. Control of NMDA receptor activation by a glycine transporter co-expressed in *Xenopus* oocytes. **J. Neurosci.** 17:4580 - 4590, 1997.
- SWEAZEY, R. D. Distribution of GABA and glycine in the lamb nucleus of the solitary tract. **Brain Res.** 737:275 - 286, 1996.
- TAKAHAMA, K.; FUKUSHIMA, H.; ISOHAMA, Y.; KAI, H.; MIYATA, T. Inhibition of glycine currents by dextromethorphan in neurones dissociated from the guinea-pig nucleus tractus solitarii. **Br. J. Pharmacol.** 120:690 - 694, 1997.
- TALMAN, W. T. Kynurenic acid microinjected into the nucleus tractus solitarius of rat blocks arterial baroreflex but not responses to glutamate. **Neurosci. Lett.** 102:247 - 252, 1989.
- TALMAN, W. T.; PERRENE, M. H.; REIS, D. J. Evidence for L-glutamate as the neurotransmitter of baroreceptor afferent nerve fibers. **Science** 209:813 - 815, 1980.
- TALMAN, W. T.; PERRENE, M. H.; SCHER, P.; KWO, S.; REIS, D. J. Antagonism of the baroreceptor reflex by glutamate diethyl ester an antagonist to L-glutamate. **Brain Res.** 2170:186 - 191, 1981.
- TALMAN, W. T.; ROBERTSON, S. C. Glycine, like glutamate, microinjected into the nucleus tractus solitarii of rat decreases arterial pressure and heart rate. **Brain Res.** 477:7 - 13, 1989.
- TALMAN, W. T.; ROBERTSON, S. C.; CASSELL, M. D. Mechanisms of cardiovascular responses to glycine injected into the dorsal vagal motor nucleus in rat. **Hypertension** 2:1187 - 1192, 1992.
- TALMAN, W. T.; WELLENDORF, L.; MARTINEZ, D.; ELIISON, S.; LI, X.; CASSEL, M.; OHTA, H. Glycine elicits release of acetylcholine from the nucleus tractus solitarii. **Brain Res.** 650:253 - 259, 1994.
- TANG, C. M.; DICHTER, M.; MORAD, M. Modulation of the N-methyl-D-aspartic channel by extracellular H⁺. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 87:6445 - 6449, 1990.

- TERAI, K.; TOOYAMA, I.; KIMURA, H. Immunohistochemical localization of GABA_A receptors in comparison with GABA-immunoreactive structures in the nucleus tractus solitarii of the rat. **Neurosci.** 82:843 – 452, 1998.
- TIAN, B.; HARTLE, D. K. Cardiovascular effects of NMDA and MK-801 infusion at area postrema and mNTS in rat. **Pharmacol. Biochem. Beh.** 49:489 - 495, 1994.
- TORVIK, A. Afferent connections to the sensory trigeminal nuclei, the nucleus of the solitary tract and adjacent structures; an experimental study in the rat. **J. Comp. Neurol.** 106:51 – 141, 1956.
- TURECEK, R.; TRUSSELL, L. O. Presynaptic glycine receptors enhance transmitter release at a mammalian central synapse. **Nature** 411:587 - 590, 2001.
- UENO, S.; HARATA, N.; INONE, K.; AKAIKE, N. ATP-gated current in dissociated rat nucleus solitarii neurons. **J. Neurophysiol.** 68L:778 - 785, 1992a.
- UENO, S.; ISHIBASHI, H.; AKAIKE, N. Perforated-patch method reveals extracellular ATP-induced K⁺ conductance in dissociated rat nucleus solitarii neurons. **Brain Res.** 597:176 - 179, 1992b.
- VAN GIERSBERGEN, P. L. M.; PALKOVITS, M.; DE JONG, W. Involvement of neurotransmitters in the nucleus tractus solitarii in cardiovascular regulation. **Physiol. Rev.** 72: 789 - 824, 1992.
- VERDOORN, T. A.; DRAGUHN, A.; YMER, S.; SEEBURG, P.; SAKMANN, B. Functional properties of recombinant rat GABA_A receptors depend on subunit composition. **Neuron** 4:919 – 928, 1990.
- VICINI, S.; WANG, J. F.; LI, J. H.; ZHU, W. J.; WANG, Y. H.; LUO, J. H.; WOLFE, B. B.; GRAYSON, D. R. Functional and pharmacological differences between recombinant N-methyl-D-aspartate receptors. **J. Neurophysiol.** 79(2):555 - 66, 1998.
- VYKLYCKY, L.; BENVENISTE, M. J. R.; MAYER, M. L. Modulation of N-methyl-D-aspartic acid receptor desensitization by glycine in mouse cultured hippocampal neurones. **J. Physiol Lond.** 428:313 - 331, 1990.

- WATANABE, M.; MISHINA, M. L.; INONE, Y. Distinct distributions of five NMDA receptor channel subunit mRNAs in the brainstem. **J. Comp. Neurol.** 343:520 - 531, 1994.
- WATKINS, J. C.; EVANS, R. H. Excitatory amino acid transmitters. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.** 21:165 - 204, 1981.
- WESTERGREN, I.; NYSTROM, B.; HAMBERGEN, A.; NORDBORG, C.; JOHANSSON, B. P. Concentrations of amino acids in intracellular fluid after opening of the blood-brain barrier by intracarotid infusion of protamine sulfate. **J. Neurochem.** 62:159 - 165, 1994.
- WILCOX, K. S.; FITZSIMONDS, R. M.; JOHNSON, B.; DICHTER, M. A. Glycine regulation of synaptic NMDA receptors in hippocampal neurons. **J. neurophysiol.** 76:3415 - 3424, 1996.
- WOLLMUTH, L. P.; KUNER, T.; SAKMANN, B. Adjacent asparagines in the NR2-subunit of the NMDA receptor channel control the voltage-dependent block by extracellular Mg^{2+} . **J. Physiol.** 506:13 - 32, 1998.
- WOODHULL, A. M. Ionic blockage of sodium channels in nerve. **J. Gen. Physiol.** 61:687 - 708, 1973.
- WYLLIE, D. J.; BEHE, P.; COLQUHOUN, D. Single-channel activations and concentration jumps: comparison of recombinant NR1a/NR2A and NR1a/NR2D NMDA receptors. **J. Physiol.** 1;510 (Pt 1):1 - 18, 1998.
- XIA, Y.; HADDAD, G. G. Ontogeny and distribution of GABA_A receptors in rat brainstem and rostral brain regions. **Neurosci.** 49:973 - 978, 1992.
- ZAFRA, F.; ARAGON, C.; GIMENEZ, C. Molecular biology of glycinergic neurotransmission. **Mol. Neurobiol.** 14:117 -142, 1997.
- ZAFRA, F.; ARAGON, C.; OLIVARES, L.; DANBOLT, N. C.; GIMÉNEZ, C.; STORM-MATHISEN, J. Glycine transporters are differentially expressed among CNS cell. **J. Neurosci.** 15:3952 - 3969, 1995.

**The Glycine Binding Site of the NMDA Receptor in Subpostremal NTS
Neurons is not Saturated**

Vander Baptista and Wamberto Antonio Varanda

Department of Physiology - Faculty of Medicine of Ribeirão Preto/USP. Av.
Bandeirantes 3900 14049-900 Ribeirão Preto - Brazil.

Address Correspondence to:

Dr. Wamberto Antonio Varanda - Department of Physiology, Faculty of Medicine of
Ribeirão Preto/USP - Av. Bandeirantes, 3900 - 14049-900 - Ribeirão Preto/SP,
Brazil Phone: 55 16 602 3024 Fax: 55 16 633 0017

e-mail: wvaranda@fmrp.usp.br

Running Head: Glycine binding site of the NMDA receptors in the subpostremal
NTS neurons.

ABSTRACT

The nucleus of the *tractus solitarius* (NTS), located in the medulla oblongata, plays an important role in the control of several autonomic reflex functions and the involvement of the subpostremal NTS in the integration of the cardiopulmonary information is well established. Although glutamate and GABA are the main neurotransmitters within the NTS, a number of other substances may act as neurotransmitters or neuromodulators. Glycine, besides being an inhibitory neurotransmitter, is considered a co-agonist for the NMDA receptor and, depending on its concentration at the synaptic cleft, can modulate the NMDA excitatory transmission. In this work we investigate whether the glycine site of the NMDA receptor is saturated or not. Glutamatergic postsynaptic currents (GPSC), isolated by adding bicuculline and strychnine to the bath, were studied by whole cell recordings in subpostremal NTS neurons in slices of 30 to 35 days old rats. Our results show that the exogenous glycine, acting at its site on the NMDA receptor, potentiated the NMDA responses in a concentration-dependent manner. Glycine (500 μM) significantly enhanced the total charge transferred by the GPSC at holding potentials more depolarized than -50 mV. The kinetics of the NMDA currents, recorded in the presence of DNQX, was not changed by glycine. In current clamp experiments, the addition of glycine (500 μM) to the preparation hyperpolarized the membrane potential leading to a depression in action potential firing rate. This effect was blocked by strychnine suggesting the presence of inhibitory glycinergic receptors. Taken together, these data support the hypothesis that the glycine site of the NMDA receptor in neurons of the subpostremal NTS is

not saturated and that glycine may act as a modulator of the NMDA transmission in this nucleus.

INTRODUCTION

The nucleus of the *tractus solitarius* (NTS) is the first synaptic site in the central nervous system (CNS) for a host of peripheral sensory inputs. Several authors have suggested that the NTS is not simply a relay site but can also contribute to the processing and integration of the visceral information through an intrinsic neuronal circuitry, playing an important role in the coordination of several autonomic reflex functions (Mifflin and Felder 1990). The subpostremal NTS is that part of the caudal NTS comprising a region from the level of the obex to the posterior tip of the area postrema (Barraco et al. 1992) and serves as the major NTS region for the integration of cardiopulmonary afferent information (Barraco and El-Ridi 1989; Nelson et al. 1988). In addition, this NTS region is also involved in the regulation of gastric secretion and motility (Spencer and Talman 1986) and in the modulation of the pancreatic insulin releasing (Dunbar et al. 1992). Although there is a large variety of known neurotransmitters and neuromodulators within the NTS, several studies suggest that glutamate and GABA are the main neurotransmitters (Grabauskas and Bradley 2003; Bonham and Chen 2002; Doyle and Andresen 2001). It is accepted that glutamate, released by the first-order visceral afferent fibers, acts on NMDA and non-NMDA ionotropic receptors in second-order neurons within the NTS (Bonham and Chen 2002; Aylwin et al. 1997). Although the synaptic release of glycine in the NTS is not clearly demonstrated, several lines of evidence suggest the presence of both glycinergic

terminals and receptors in the NTS (Cassel and Talman 2000; Saha et al. 1999; Takahama et al. 1997). Microinjection of glycine into NTS elicits significant effects in the arterial pressure and heart rate (Kubo and Kihara 1987; Talman and Robertson 1989).

The binding of two agonists is required for activation of the NMDA receptor: glutamate and glycine (Kleckner and Dingledine 1988). While the glutamate plays the neurotransmitter role, glycine appears to present a more modulatory function depending on its concentration at the synaptic cleft (for review, see Danysz and Parsons 1998). If its concentration is higher than the glycine dissociation constant at its site on the NMDA receptor, this site will be saturated and the modulation of the NMDA response by exogenous or synaptically released glycine is not possible (Berger and Isaacson 1999). Measurements of glycine concentration in the extracellular and cerebrospinal fluids in the micromolar range (Westergren et al. 1994) suggest that the glycine site in the NMDA receptor is saturated. However, the local concentration of glycine at glutamatergic synapses is unclear and its concentration close to the NMDA receptors can be regulated by high-capacity transporters (GLYT1 and GLYT2), which could maintain the glycine concentration at the synaptic cleft at low levels (Bergeron et al. 1998; Supplisson and Bergman 1997). Zafra et al. (1995) found immunoreactivity for both GLYT1 and GLYT2 in the NTS.

A number of *in vivo* and *in vitro* studies have investigated the glycine site in the NMDA receptor and suggest that its saturation depends on the region of the CNS. While some studies have demonstrated that the application of exogenous glycine potentiates the NMDA response, suggesting that the glycine concentration is not

saturating (Ahmadi et al. 2003; Martina et al. 2003; Wilcox et al. 1996), others found no modulation (Fletcher et al. 1989; Obrenovitch et al. 1997).

In this work we have used the patch clamp technique to investigate the effect of glycine and D-serine (a glycine-site NMDA receptor agonist) on the NMDA responses evoked by stimulation of the solitary tract (ST) and on spontaneous events in the subpostremal NTS. We have found that glycine enhances the amplitude of both events in a concentration-dependent manner without altering the kinetics of the NMDA currents. These results suggest that the glycine site is not saturated and that glycine may act as a modulator of the NMDA transmission in subpostremal NTS.

METHODS

Brain Slices

Transverse brain slices of the medulla oblongata containing the subpostremal NTS were prepared from 30-35 days-old Wistar rats of either sex. The animals were anesthetized with Nembutal (50 mg/Kg, *i.p.*). Following decapitation and craniotomy, the brain and upper cervical spinal cord were removed and submerged in ice-cold (2-3 °C) artificial cerebrospinal fluid (ACSF) pH 7.35-7.4, equilibrated with carbogen (95 % O₂, 5 % CO₂). The ACSF contained (mM): 122 NaCl; 2.5 KCl; 1.0 MgCl₂; 2.0 CaCl₂; 25 NaHCO₃; 1.25 NaH₂PO₄; 25 Glucose and the osmolality was 305-310 mOsm/Kg.H₂O. After the brain stem was dissected, it was glued with cyanoacrylate glue to an L-shaped agar block (4 % agar in ACSF) and taken to the stage of a Vibratome (MA756-Campdem Instruments, England). Two transversal

slices (300 μm thick) containing the area postrema were obtained from each animal. After cutting, the slices were incubated for 60 minutes at 32 °C in ACSF constantly gassed with carbogen. A single slice was transferred to the recording chamber on the stage of an upright microscope (E600 Nikon Inc., Tokyo Japan), held in place with a nylon net mounted on a platinum wire, and continuously superfused with ACSF (saturated with carbogen) at a rate of 2-3 ml/min, driven by gravity. All drugs were applied at known concentrations by changing the perfusion line. Experiments were performed at room temperature (23-25 °C). Strychnine was purchased from Sigma Chemical Co (Saint Louis, MO, USA), DL-AP5 (DL-2-Amino-5-phosphonopentanoic acid), DNQX (6,7-Dinitroquinolixaline-2,3 Dione), L-689-560 (*trans*-2-Carboxy-5,7-dichloro-4-phenylaminocarbonyl amino-1,2,3,4-tetrahydroquinoline) and bicuculline methochloride were from TOCRIS Cookson Inc. (Ellisville, MO, USA). All other salts are purchased from Sigma. Efforts were made to minimize the number of animals used and their suffering in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the Faculty of Medicine of Ribeirão Preto/USP.

Electrophysiology

Patch pipettes were pulled from borosilicate glass tubing (Sutter Instrument Co. Novato, CA, USA) on a P-97 puller (Sutter Instrument Co., Novato, CA, USA) and had the tip fire polished on a microforge (Narishige MF-83, Tokyo, Japan). The internal solutions were (mM): 130 CsF; 10 NaCl; 1 MgCl_2 ; 3 K-ATP; 10 EGTA; 10 HEPES; pH adjusted to 7.3 with CsOH and osmolality of 295-305 mOsm/Kg.H₂O for the voltage-clamp experiments or (mM): 115 potassium gluconate; 20 KCl; 2

MgCl₂; 3 K-ATP; 10 EGTA; 10 HEPES; pH 7.3 adjusted with KOH and osmolality 295-305 mOsm/Kg.H₂O for the current-clamp experiments. The indifferent electrode was a Ag/AgCl wire connected to the extracellular solution via an agar bridge (2.5 % in the internal solutions). When filled with the above solutions the pipettes had resistance between 4-8 MΩ. Junction potentials were calculated using the Axoscope 1.0 program and the results corrected accordingly. Cells were approached by the 'blind patch' method and seal resistances in excess of 2-5 GΩ were obtained prior to entering the whole-cell configuration. Access resistances were corrected between 70-80 %. Recordings were made with an EPC-7 (List Medical - Darmstadt, Germany) patch clamp amplifier. Whole-cell currents and voltages were low-pass filtered at 3 KHz (8 pole Bessel filter - LPF8 - Warner Instruments Corp, Hamden CT, USA) digitized at 10 KHz by a computer driven A/D converter (Digidata 1200B - Axon Instruments – Foster City, USA), and stored on hard disk using the pClamp6 software (Axon Instruments). Data were analyzed off-line using the MiniAnalysis program (Synaptosoft, New Jersey, USA), Clampfit or Axoscope (Axon Instruments). Synaptic responses of the NTS neurons were evoked by electrical stimulation (15 V, 50-100 μs, 0.2-0.5 Hz, stimulus isolation unit-DS2A-Digitimer Ltd., Garden City, England) delivered by a twisted pair (bipolar) platinum electrode (100 μm diameter) positioned on the ipsilateral solitary tract over visual control. Glycine concentration-response curve was fitted according

to the Hill equation:
$$I = \frac{I_{max} [Glycine]^n}{EC_{50} + [Glycine]^n}$$
, where I_{max} is the maximal response, EC_{50}

is the glycine concentration yielding a current half of the I_{max} and n is the Hill

coefficient. The pooled data are expressed as the mean \pm SE and statistical significance between values ($p < 0.05$) were determined by the Student's *t* test.

RESULTS

Whole cell recordings were made in subpostremal NTS neurons located between the solitary tract (ST) and the medial line. Since glutamate, activating NMDA and non-NMDA receptors, and GABA, activating GABA_A receptors, are the major neurotransmitters within the NTS (Grabauskas and Bradley 2003; Bonham and Chen 2002; Doyle and Andresen 2001), the ST was stimulated in the presence of 50 μ M bicuculline (GABA blocker) in order to evoke pure glutamatergic postsynaptic currents (GPSC). Strychnine (5 μ M) was also present in bath solution to block strychnine-sensitive glycine receptors. In this condition, the application of glycine to the preparation enhanced the NMDA component and had no effect upon the non-NMDA part of the GPSC. Figure 1A shows that at a hyperpolarized voltage (-90 mV), with the NMDA receptors blocked by Mg²⁺, 50 μ M and 100 μ M glycine had no effect upon the inward non-NMDA responses. However, at a higher glycine concentration (1000 μ M) a small increase was observed, suggesting that the Mg²⁺ block was not 100 % complete at this voltage. This incomplete Mg²⁺ block was also observed with the application of L-689-560 (10 μ M), a glycine-site NMDA receptor antagonist, which caused a small decrease in the response. On the other hand, at a holding potential of +50 mV, the NMDA responses were increased in a concentration-dependent manner. This effect was reversible and the application of L-689-560 (or 50 μ M DL-AP5) blocked the late component of the GPSC, confirming

that it is mediated by the NMDA receptor (figure 1A). The current amplitude of the NMDA component was measured 60 ms after the peak of the GPSC, at which point the non-NMDA currents have decayed completely. The I - V plot of figure 1B shows that 500 μ M glycine enhanced the current amplitudes at voltages more depolarized than -50 mV without shifting the reversal potential. The remaining conductance in the presence of L-689-560 was not completely linear, and therefore it might be due to an incomplete NMDA receptor block. Figure 1C shows the relationship between the percentage of increase in the amplitude of the current and the glycine concentration, for a holding potential of $+50$ mV. The potentiating effect of glycine was clearly concentration-dependent over the range 10 μ M to 1000 μ M. The half-maximum excitatory concentration (EC_{50}) of glycine was 130 μ M and n was 0.74, as deduced from a fitting of the Hill equation (see Methods) to the experimental points. In order to better analyse the effect of glycine we plotted the time integral of the GPSC between the onset of the response and 225 ms later (total charge transferred), against the holding potentials (-90 mV to $+50$ mV, in 10 mV steps). Figure 1D shows that 500 μ M glycine significantly potentiated ($p < 0.05$, $n = 7$) the amount of total charge transferred by the GPSC at voltages more depolarized than -50 mV. Note that in this voltage range the contribution of the NMDA component to the GPSC is the most relevant and glycine shows its most pronounced effect. On the other hand, at more hyperpolarized voltages the non-NMDA component is the major contributor to the GPSC and the glycine had no significant effect.

The effect of glycine was also observed on spontaneous excitatory postsynaptic currents (sEPSC) recorded in the presence of bicuculline (50 μM) plus strychnine (5 μM) in the bath. With Mg^{2+} -free ACSF in the bath the glutamatergic currents presented both the NMDA and non-NMDA components (figure 2C). Figures 2A and 2B show sEPSC recorded at a holding potential of -70 mV, in control and in the presence of 500 μM glycine, respectively. Glycine prolonged the decay time of the sEPSC (figure 2C) resulting in an increase (62 ± 25 %, $n = 3$) in the total charge transferred (figure 2D). This effect was reversible and addition of Mg^{2+} (1 mM) to the bath abolished the NMDA component of the sEPSC (figure 2C). Addition of DNQX (5 μM) blocked the remaining synaptic transmission (not shown). Glycine did not alter the frequency of appearance of the events, suggesting a postsynaptic mechanism of action.

The glycine potentiating effect of the NMDA response could have been caused by at least three different ways: (1) through the glycine-site in the NMDA receptor, an action that has been demonstrated to occur in other areas of the CNS (Ahmadi et al. 2003), (2) acting on the NMDA receptors containing NR3A or NR3B subunits, which are activated by glycine in the absence of glutamate (Chatterton et al. 2002) or (3) by a presynaptic action at the strychnine-sensitive glycine receptors facilitating the release of glutamate (Turecek and Trussell 2001). To test these possibilities, we used D-serine, a glycine-site NMDA receptor agonist, which is ineffective at the strychnine-sensitive glycine receptor and, contrary to glycine, blocks the NMDA receptors containing NR3A or NR3B subunits (Chatterton et al. 2002). Figure 3A shows that D-serine (50 μM) potentiated the NMDA component

and did not change the non-NMDA component of the GPSC. This effect was reversible. At a holding potential of +50 mV, D-serine significantly enhanced ($68.4 \pm 19\%$; $p < 0.05$; $n = 5$) the amplitude of the NMDA currents measured 60 ms after the peak of the response (figure 3B). It also increased the total charge transferred, measured from the onset of the response to 225 ms later ($65.6 \pm 11\%$, $p < 0.05$; $n = 5$; figure 3C). The effects of D-serine point against the possibility that glycine is activating NMDA receptors containing NR3A or NR3B subunits, or the presynaptic strychnine-sensitive glycine receptors. Moreover, in our experiments the GPSC were recorded in the presence of strychnine and the non-NMDA component was not altered by glycine. Taken together, these results strongly support the hypothesis that glycine is acting at its site on the NMDA receptor.

The mechanism of action of glycine on the NMDA receptors is not totally clear. Some studies suggest that its action is made by blocking desensitization of the receptors (Mayer et al. 1989; Vyklíček et al. 1990; Martina et al. 2003), while others find no evidence of such action (Wilcox et al. 1996). At the single-channel level it has been shown that glycine increases the frequency of channel opening (Johnson and Ascher 1987). We investigated, at a holding potential of +50 mV, the effect of 500 μ M glycine on the time course of NMDA currents evoked by ST stimulation, in the presence of DNQX (5 μ M), bicuculline and strychnine. The rise time, measured from the onset of the response to the peak, was not significantly changed and there was a tendency for the decay time constant of the NMDA currents to be slower in the presence of glycine (figures 4A and 4B), although no statistical difference was found.

It has been suggested that glycinergic interneurons can be a source of glycine, so that the neurotransmitter escapes the synaptic cleft and reaches nearby NMDA receptors, in a process called spillover (Ahmadi et al. 2003; Berger and Isaacson 1999). The synaptic release of glycine in the NTS has not been directly shown, and ST (Doyle and Andresen 2001) or vagal (Smith et al. 1998) stimulation evokes only glutamatergic and GABA_Aergic currents. However, glycinergic currents could be evoked by local application of glycine in freshly dissociated NTS neurons (Takahama et al. 1997), suggesting the presence of glycinergic inhibitory receptors. We confirm this fact in the slice preparation. In current clamp experiments (n = 4), the application of glycine (500 μ M) leads to a hyperpolarization of the membrane, ceasing the firing rate of action potentials (figure 5). This effect was reversible and blocked by strychnine (5 μ M), suggesting that the hyperpolarizing effect of the glycine was glycinergic strychnine-sensitive receptor mediated.

DISCUSSION

In this work we have shown that the glycine-site in NMDA receptors of subpostremal NTS neurons is not saturated. We also observed that glycine does not change the kinetics of the NMDA currents evoked by ST stimulation. In transverse slices, stimulation of the ST may also give rise to responses caused by current spread to local neurons and/or axons of passage that project to the recorded cell, besides monosynaptic responses. Since the type of response being measured is not crucial for the purposes of the present study, we have stimulated

the ST and have isolated excitatory postsynaptic currents (EPSC) by adding bicuculline and strychnine to the bath. The glycine-site NMDA receptor antagonist, L-689-560, blocked the late component of the EPSC, while DNQX abolished the fast component of the response (figures 1A and 4A). This pharmacological profile, and the time course of the currents, suggests that the EPSC are mediated by both NMDA and non-NMDA receptors. We have analyzed the glycine effect on the amplitude of the currents at 60 ms after the peak and on the total charge transferred by measuring the time integral of the current from the onset of the response to 225 ms later. The *I-V* relationship, with the characteristic “J” shape of the NMDA component, shows that the membrane conductance is larger in the presence of glycine (figure 1B). In addition, we have observed that glycine potentiated the spontaneous excitatory postsynaptic currents (sEPSC) measured in the presence of bicuculline and strychnine in the bath. These sEPSC, at a holding potential of -70 mV and Mg^{2+} -free ACSF as bathing solution, present both NMDA and non-NMDA glutamatergic components in the same synaptic events (figure 2C), suggesting a co-localization of the NMDA and non-NMDA receptors at the postsynaptic membrane as found in hypoglossal motoneurons (O'Brien et al. 1997).

Since Johnson and Ascher (1987) demonstrated that glycine can facilitate the NMDA neurotransmission, several works have focused on two main issues which are not yet completely resolved: (1) the mechanism of action of glycine at the NMDA receptors and (2) if the glycine-site is saturated *in vivo*.

Some *in vitro* studies (Fletcher et al. 1989; Kemp et al. 1988) suggested that the glycine-site in the NMDA receptor is saturated, while others *in vivo* (Chen et al.

2003; Salt 1989) and *in vitro* (Martina et al. 2003; Wilcox et al. 1996) argue against this hypothesis. It seems likely that this depends on regional differences in NMDA receptor subtype expression, local glycine or D-serine concentration and the expression of specific types of glycine transporters (Parsons et al. 1998). The NMDA receptor is composed by heteroligomers of NR1, NR2A-NR2D (Monyer et al. 1994) and NR3A-3B (Chatterton et al. 2002) subunits. It is believed that NR1 subunit is an obligatory component of the functional receptors, while NR2A-NR2D subunits generate receptors with distinct functional properties (Monyer et al. 1994). The NR1 subunits are ubiquitously distributed in the CNS, while the NR2A-NR2D subunits are expressed differentially in a spatiotemporal manner, suggesting the existence of a variety of native NMDA receptors (Kew et al. 1998; Monyer et al. 1994). It is known that the glycine affinity depends on the subunit composition of the NMDA receptors (Mori and Mishina 1995): those containing NR2A subunits have a ~10-fold lower affinity for glycine relative to those formed by NR2B subunits (Priestley et al. 1995), and those containing NR2D appear to have the highest affinity for glycine (Ikeda et al. 1992). Since the glycine concentrations found in the cerebrospinal fluid are in the micromolar range (Westergren et al. 1994), NMDA receptors with a low affinity for glycine are occupied by only ~20 % to ~65%, while almost every high affinity receptor would be saturated (Martina et al. 2003). Although our findings show that exogenous glycine potentiates the NMDA response (figure 1), other results obtained in our lab (not published) and by Nabekura et al. (1994) suggest that the NMDA receptors in the NTS are made up of NR2C or NR2D subunits, which present high affinity for glycine. However, the potentiating effect of glycine varied from cell-to-cell in our experiments. For

example, at 500 μM glycine (figure 1C) the potentiation was in the range of 27 to 124 %, suggesting different levels of glycine-site NMDA saturation. This can be due to a heterogeneous population of NMDA receptors in the subpostremal NTS. Indeed, Kew et al. (1998) have shown that populations of NMDA receptors with different affinity for glycine can co-exist in different rat cortical neurons. Furthermore, some works suggest that the glycine concentration at the synaptic cleft, close to the NMDA receptors, is efficiently regulated by a high-capacity glycine transporter, keeping its concentration at low levels (Chen et al. 2003; Supplisson and Bergman 1997). There are at least two types of glycine transporters, the GLYT1 and GLYT2 (Kim et al. 1994; Liu et al. 1993). The GLYT2 mRNAs are present in presynaptic terminals of glycinergic neurons and regulate strychnine-sensitive glycinergic neurotransmission in brainstem and spinal cord, while GLYT1 mRNAs are present in forebrain, lower brainstem and spinal cord (Zafra et al. 1997; Smith et al. 1992). It was suggested that GLYT1 can be co-localized with NMDA receptors and could be regulating the glycine concentration in the synaptic cleft near NMDA receptors (Bergeron et al. 1998; Fedele et al. 1993; Smith et al. 1992; Supplisson and Bergman 1997). Immunohistochemical studies show a high immunoreactivity for GLYT1 and moderate to low immunoreactivity for GLYT2 in the NTS (Zafra et al. 1995). This suggests that these transporters would keep the glycine concentration at the synaptic cleft at low levels, and that the glycine-site in the NMDA receptor would be unsaturated in the subpostremal NTS. It has been suggest that a potential source of glycine for the NMDA receptors is that synaptically released (Ahmadi et al. 2003; Berger and Isaacson 1999).

Although terminals coming from the ST apparently do not release glycine, there are demonstrations of the presence of both glycinergic receptors and terminals in the NTS (Cassell and Talman 2000; Saha et al. 1999; Takahama et al. 1997). Immunohistochemical studies have demonstrated that fibers and terminals with high levels of glycine immunoreactivity are concentrated in the subpostremal NTS and in areas closely surrounding the ST (Saha et al. 1999; Sweazey 1996). In this work we have electrophysiologically demonstrated the presence of strychnine-sensitive glycinergic receptors in the subpostremal NTS (figure 5). Although the origin of glycine terminals in the NTS remains unknown, studies of Pickel et al. (1996) suggest that projections from the amygdala to the NTS may be glycinergic. The role of glycine in the NTS neurotransmission is not well explained. While in anesthetized rats the microinjection of glycine into the NTS can elicit both increase (Kubo and Kihara 1987) and decrease (Talman and Robertson 1989) in the arterial pressure and heart rate, in conscious rats it does not change the mean arterial pressure or the heart rate (Mauad et al. 1995). Talman and Robertson (1989) suggested that the bradycardic and hypotensive responses could be due to the action of glycine at its site in the NMDA receptor, potentiating the glutamatergic transmission.

Although glycine has been traditionally considered the co-agonist of the glycine-site at NMDA receptors, D-serine has been suggested as a possible endogenous ligand for this site. The astrocytes, located in close proximity to glutamatergic synapses, could release D-serine in response to glutamatergic stimulation (Schell et al. 1997). It has been suggested that D-serine can be the predominant endogenous ligand of the glycine-site at NMDA receptors (Schell et al. 1997).

Therefore, the glycinergic terminals or D-serine-containing astrocytes could be the source of endogenous ligand for the glycine-site at NMDA receptors in the subpostremal NTS neurons.

In summary, we have demonstrated, *in vitro*, that the glycine-site at NMDA receptors is not saturated in subpostremal NTS neurons. As a consequence the regulation of the local glycine concentration at the synapse can play an important modulator role in the excitatory neurotransmission in this nucleus.

ACKNOWLEDGEMENTS: We thank Dr. Wataro N. Ogawa for helpful discussions and criticisms of the manuscript, José Fernando Aguiar for excellent technical assistance, and FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) for financial support.

REFERENCES

Ahmadi S, Muth-Selbach U, Lauterbach A, Lipfert P, Neuhuber WL and Zeilhofer HU. Facilitation of spinal NMDA receptor currents by spillover of synaptically released glycine. *Science* 300:2094-2097, 2003.

Aylwin ML, Horowitz JM and Bonham AC. NMDA receptors contribute to primary visceral afferent transmission in the nucleus of the solitary tract. *J Neurophysiol.* 77: 2539-2548, 1997.

Barraco R, El-Ridi, Ergene E, Parizon M and Bradley D. An atlas of the rat subpostremal nucleus tractus solitarius. *Brain Res Bull.* 29:703-765, 1992.

Barraco RA and El-Ridi MR. Cardiorespiratory responses following electrical stimulation of caudal sites in the rat medulla. *Brain Res Bull.* 23:299-310, 1989.

Berger AJ and Isaacson JS. Modulation of motoneuron *N*-methyl-D-aspartate receptors by the inhibitory neurotransmitter glycine. *J Physiol.* 93:23-27, 1999.

Bergeron T, Meyer TM, Coyle JT and Greene RW. Modulation of *N*-methyl-D-aspartate receptor function by glycine transport. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:15730-15734, 1998.

Bonham AC and Chen CY. Glutamatergic neural transmission in the nucleus tractus solitarius: *N*-methyl-D-aspartate receptors. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 29:497-502, 2002.

Cassell MD and Talman WT. Glycine receptor (gephyrin) immunoreactivity is present on cholinergic neurons in the dorsal vagal complex. *Neurosci.* 95(2):489-497, 2000.

Chatterton JE, Awobuluyi M, Premkumar LS, Takahashi H, Talantova M, Shin Y, Cui J, Tu S, Sevarino KA, Nakanishi N, Tong G, Lipton SA and Zhang D. Excitatory glycine receptors containing the NR3 family of NMDA receptor subunits. *Nature* 415:793-798, 2002.

Chen L, Muhlhauser M and Yang CR. Glycine transporter-1 blockade potentiates NMDA-mediated responses in rat prefrontal cortical neurons in vitro and in vivo. *J Neurophysiol.* 89:691-703, 2003.

Danysz W and Parsons CG. Glycine and *N*-methyl-D-aspartate: physiological significance and possible therapeutic applications. *Pharmacol Rev.* 50:598-664, 1998.

Doyle MW and Andresen MC. Reliability of monosynaptic sensory transmission in brain stem neurons in vitro. *J Neurophysiol.* 85:2213-2223, 2001.

Dunbar JC, Ergene E and Barraco RA. Neuropeptide-Y stimulation of insulin secretion is mediated via the nucleus tractus solitarius. *Horm Metab Res.* 24:103-105, 1992.

Fedele E, Smith D and Foster AC. Autoradiographical evaluation of [³H]glycine uptake in rat forebrain: cellular localization in the hippocampus. *Neurosci Lett.* 161:4-8, 1993.

Fletcher EJ, Millar JD, Zeman S and Lodge D. Non-competitive antagonism of N-methyl-D-aspartate by displacement of an endogenous glycine-like substance. *Eur J Neurosci.* 1:196-203, 1989.

Grabauskas G, and Bradley RM. Frequency-dependent properties of inhibitory synapses in the rostral nucleus of the solitary tract. *J Neurophysiol.* 89:199-211, 2003.

Ikeda K, Nagasawa M, Mori H, Araki K, Sakimura K, Watanabe M, Inoue Y and Mishina M. Cloning and expression of the $\epsilon 4$ subunit of the NMDA receptor channel. *FEBS Lett.* 313:34-38, 1992.

Johnson JW and Ascher P. Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons. *Nature* 325:529-531, 1987.

Kemp JA, Foster, AC, Leeson PD, Priestley T, Tridgett R, Iversen LL and Woodruff GN. 7-Clorokyknurenic acid is a selective antagonist at the glycine modulatory site of the N-methyl-D-aspartate receptor complex. *Proc Natl Acad Sci USA.* 85:6547-6550, 1988.

- Kew JNC, Richards JG, Mutel V and Kemp JA.** Development changes in NMDA receptor glycine affinity and ifenprodil sensitivity reveal three distinct populations of NMDA receptors in individual rat cortical neurons. *J Neurosci.* 18:1935-1943, 1998.
- Kim, KM, Kingsmore SF, Han H, Yang-Feng TL, Godinot N, Seldin MF, Caron MG and Giros B.** Cloning of the human glycine transporter type 1: molecular and pharmacological characterization of novel isoform variants and chromosomal localization of the gene in the human and mouse genomes. *Mol Pharmacol.* 45:608-617, 1994.
- Kleckner NW and Dingledine R.** Requirement for glycine in activation of NMDA receptor expressed in *Xenopus* oocytes. *Science* 241:835-837, 1988.
- Kubo T and Kihara M.** Evidence for the presence of GABAergic and glycine-like systems responsible for cardiovascular control in the nucleus tractus solitarii of the rat. *Neurosci Lett.* 74:331-336, 1987.
- Liu QR, Lopez-Corcuera B, Mandiyan S, Nelson H and Nelson N.** Cloning and expression of a spinal cord- and brain-specific glycine transporter with novel structure features. *J Biol Chem.* 268:22802-22808, 1993.
- Martina M, Krasteniakov NV and Bergeron R.** D-Serine differently modulates NMDA receptor function in rat CA1 hippocampal pyramidal cells and interneurons. *J Physiol.* 548.2:411-423, 2003.
- Maud H, Colombari D, Bonagamba CGH and Machado BH.** Glycine blocks the pressor response to L-glutamate microinjected into the nucleus tractus solitarii of conscious rats. *Braz J Med Biol Res.* 28:699-704, 1995.

Mayer ML, Vyklicky L and Clements J. Regulation of NMDA receptor desensitization in mouse hippocampal neurons by glycine. *Nature* 338:425-427, 1989.

Mifflin SW and Felder RB. Synaptic mechanisms regulating cardiovascular afferent inputs to solitary tract nucleus. *Am J Physiol.* 259 (Heart Circ. Physiol. 28):H653-H661, 1990.

Monyer H, Burnashev N, Laurie DJ, Sakmann B and Seeburg PH. Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron* 12:529-540, 1994.

Mori H and Mishina M. Structure and function of the NMDA receptor channel. *Neuropharmacol.* 34:1219-1237, 1995.

Nabekura J, Kawamoto I and Akaike N. Developmental change in voltage dependency of NMDA receptor-mediated response in nucleus tractus solitarii neurons. *Brain Res.* 648:152-156, 1994.

Nelson DO, Cohen HL, Feldman JL and McCrimmon DR. Cardiovascular function is altered by picomole injections of glutamate into rat medulla. *J Neurosci.* 8(5):1684-1693, 1988.

Obrenovitch TP, Hardy AM and Urenjak J. High extracellular glycine does not potentiate *N*-methyl-D-aspartate-evoked depolarization *in vitro*. *Brain Res.* 746:190-194, 1997.

O'Brien J, Isaacson JS and Berger AJ. NMDA and non-NMDA receptors are colocalized at excitatory synapses of rat hypoglossal motoneurons. *Neurosci Lett.* 227:5-8, 1997.

Parsons CG, Danysz W, Hesselink M, Hartmann S, Lorenz B, Wollwburg C and Quarck G. Modulation of NMDA receptors by glycine – introduction to some basic aspects and recent developments. *Amino Acids* 14(1-3):207-216, 1998.

Pickel VM, Van Bockstaele EJ, Chan J and Cestari DM. GABAergic neurons in rat nuclei of solitary tract receive inhibitory-type synapses from amygdaloid efferents lacking detectable GABA-immunoreactivity. *J Neurosci Res.* 44:446-458, 1996.

Priestley T, Laughton P, Myers J, Le Bourdelles B, Kerby J and Whiting PJ. Pharmacological properties of recombinant human *N*-methyl-D-aspartate receptors comprising NR1a/NR2A and NR1a/NR2B subunit assemblies expressed in permanently transfected mouse fibroblast cells. *Mol Pharmacol.* 48:841-848, 1995.

Saha S, Batten TF and McWilliam PN. Glycine-immunoreactive synaptic terminals in the nucleus tractus solitarii of the cat: ultrastructure and relationship to GABA-immunoreactive terminals. *Synapse* 33(3):192-206, 1999.

Salt TE. Modulation of NMDA receptor-mediated responses by glycine and D-serine in the rat thalamus in vivo. *Brain Res.* 481:403-406, 1989.

Schell MJ, Brady RO Jr, Molliver ME and Snyder SH. D-serine as a neuromodulator: regional and developmental localization in rat brain glia resemble NMDA receptors. *J Neurosci.* 17:1604-1615, 1997.

Smith BN, Dou P, Barber WD, and Dudek FE. Vagally evoked synaptic currents in the immature rat nucleus *tractus solitarii* in an intact *in vitro* preparation. *J Physiol* 512: 149-162, 1998.

Smith KE, Borden LA, Harting PR, Branchek T and Weinshank RL. Cloning and expression of a glycine transporter reveal co-localization with NMDA receptors. *Neuron* 8:927-935, 1992.

Spencer SE and Talman WT. Central modulation of gastric pressure by substance P: a comparison with glutamate and acetylcholine. *Brain Res.* 385:371-374, 1986.

Supplisson S and Bergman C. Control of NMDA receptor activation by a glycine transporter co-expressed in *Xenopus* oocytes. *J Neurosci.* 17:4580-4590, 1997.

Sweazey RD. Distribution of GABA and glycine in the lamb nucleus of the solitary tract. *Brain Res.* 737:275-286, 1996.

Takahama K, Fukushima H, Isohama Y, Kai H and Miyata T. Inhibition of glycine currents by dextromethorphan in neurones dissociated from the guinea-pig nucleus tractus solitarii. *Br J Pharmacol.* 120:690-694, 1997.

Talman WT and Robertson SC. Glycine, like glutamate, microinjected into the nucleus tractus solitarii of rat decreases arterial pressure and heart rate. *Brain Res.* 477:7-13, 1989.

Turecek R and Trussell LO. Presynaptic glycine receptors enhance transmitter release at a mammalian central synapse. *Nature* 411:587-590, 2001.

Vyklicky L, Benveniste MJr and Mayer ML. Modulation of *N*-methyl-D-aspartic acid receptor desensitization by glycine in mouse cultured hippocampal neurones. *J Physiol Lond.* 428:313-331, 1990.

Westergren I, Nystrom B, Hambergen A, Nordborg C and Johansson BP. Concentrations of amino acids in extracellular fluid after opening of the blood-brain

barrier by intracarotid infusion of protamine sulfate. *J Neurochem.* 62:159-165, 1994.

Wilcox KS, Fitzsimonds RM, Johnson B and Dichter MA. Glycine regulation of synaptic NMDA receptors in hippocampal neurons. *J Neurophysiol.* 76:3415-3424, 1996.

Zafra F, Aragon C and Gimenez C. Molecular biology of glycinergic neurotransmission. *Mol Neurobiol.* 14:117-142, 1997.

Zafra F, Aragon C, Olivares L, Danbolt NC, Gimenez C and Storm-Mathisen J. Glycine transporters are differentially expressed among CNS cell. *J Neurosci.* 15:3952-3969, 1995.

LEGEND TO FIGURES

FIGURE 1. Exogenous application of glycine increases the NMDA component of the glutamatergic postsynaptic currents (GPSC) evoked by ST stimulation. *A.* Superimposed GPSC at a holding potential of -90 mV (inward currents) and at $+50$ mV (outward currents) in control condition, in the presence of three different glycine concentrations, after washout and in the presence of L-689-560. *B.* *I-V* relationship ($n = 7$) of the NMDA component of the GPSC, measured 60 ms after the peak, in control condition (filled squares), in the presence of glycine ($500 \mu\text{M}$; filled circles) and L-689-560 ($10 \mu\text{M}$; filled triangles). *C.* Glycine concentration-response curve at a holding potential of $+50$ mV. The numbers in parenthesis indicate the number of cells. *D.* Relationship between the charge transferred by the GPSC, measured from the onset of the response to 225 ms, and voltage ($n = 7$) in

the control and in the presence of 500 μM glycine. Statistical differences are indicated by asteristics (Students t -Test, $p < 0.05$).

FIGURE 2. Exogenous application of glycine potentiates the NMDA component of the spontaneous excitatory postsynaptic currents (sEPSC). *A.* and *B.* Representative traces in control and in the presence of glycine (500 μM), respectively. sEPSC were recorded with Mg^{2+} -free ACSF at a holding potential of -70 mV. *C.* Average sEPSC derived from 138, 222, 101 and 48 events in control, in the presence of glycine, after washout and after addition of Mg^{2+} (1 mM), respectively. Average sEPSC are from the same neuron shown in *A* and *B*. *D.* Charge transferred by the sEPSC ($n = 3$) at a holding potential of -70 mV, measured from the peak to 150 ms, in control and in the presence of glycine (500 μM).

FIGURE 3. Exogenous application of D-serine increases the NMDA component of the glutamatergic postsynaptic current (GPSC) evoked by ST stimulation. *A.* GPSC superimposed at holding potentials of -90 mV (inward currents) and at $+50$ mV (outward currents) in control condition, in the presence of D-serine and after washout. *B.* Amplitude of the NMDA component ($n = 5$) at a holding potential of $+50$ mV, measured 60 ms after the peak, in control and in the presence of D-serine (50 μM). *D.* Total charge transferred ($n = 5$) by the GPSC at a holding potential of $+50$ mV, measured from the onset of the response to 225 ms later, in control and

in the presence of D-serine (50 μM). Statistical differences are indicated by asteristics (Students *t*-Test, $p < 0.05$).

FIGURE 4. Glycine does not alter the time course of the NMDA currents evoked by stimulation of the solitary tract. *A.* NMDA currents normalized to unitary amplitude at a holding potential of +50 mV in the control and in the presence of glycine. The broken lines over the decay phase of the currents are monoexponential function fittings with decay time constants of 378 ms and 394 ms for control and glycine conditions, respectively. The currents were recorded in the presence of DNQX (5 μM), bicuculline (50 μM) and strychnine (5 μM). *B.* Rise time ($n = 6$) of the NMDA currents at a holding potential of +50 mV, measured from the onset of the response to the peak, in control and glycine (500 μM). *C.* Decay time constants ($n = 6$) of the NMDA currents at a holding potential of +50 mV in control and in the presence of glycine (500 μM).

FIGURE 5. Strychnine-sensitive glycinergic receptors. Perfusing the preparation with glycine (500 μM) leads to a hyperpolarization of the membrane potential and ceasing of the action potential firing. The washout of the drug reverts to the control situation. Strychnine (5 μM) blocks the effect of glycine. The numbers 1-4 indicate the injection of depolarizing current of 35 pA, 45 pA, 50 pA and 55 pA, respectively, in order to lead the membrane potential to threshold.

FIGURES

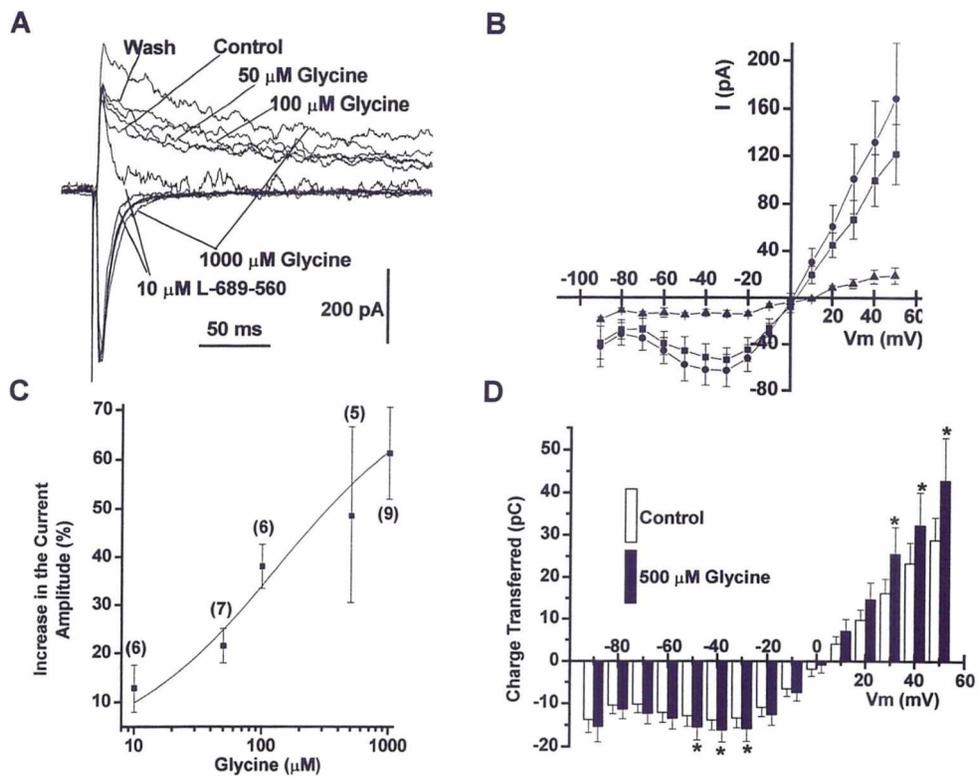


Figure 1.

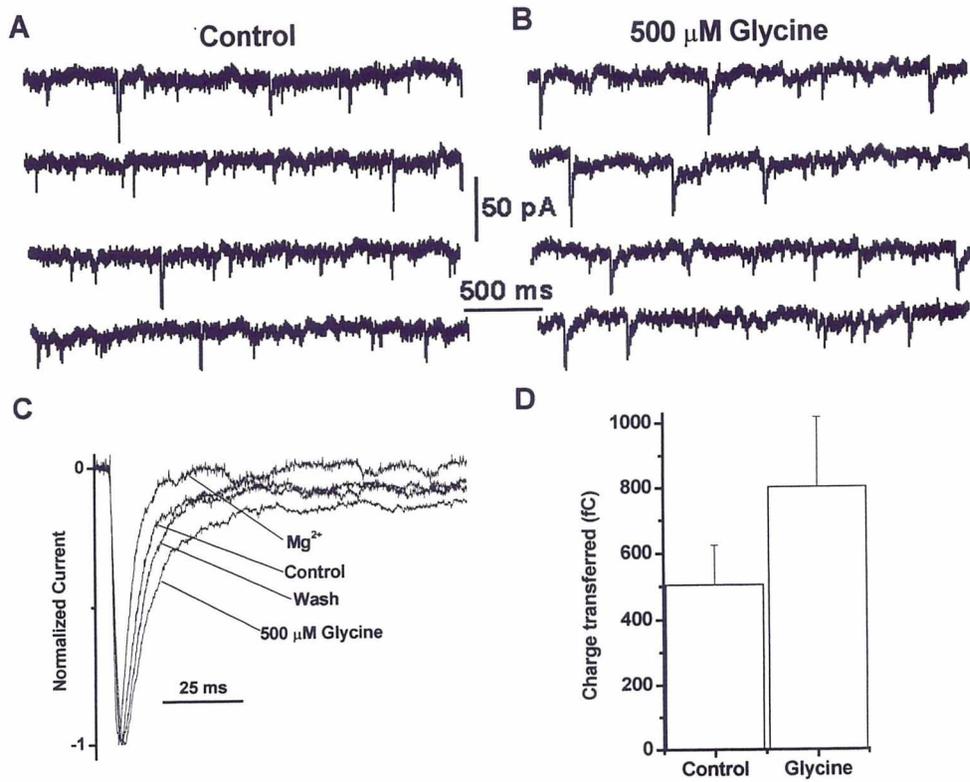


Figure 2.

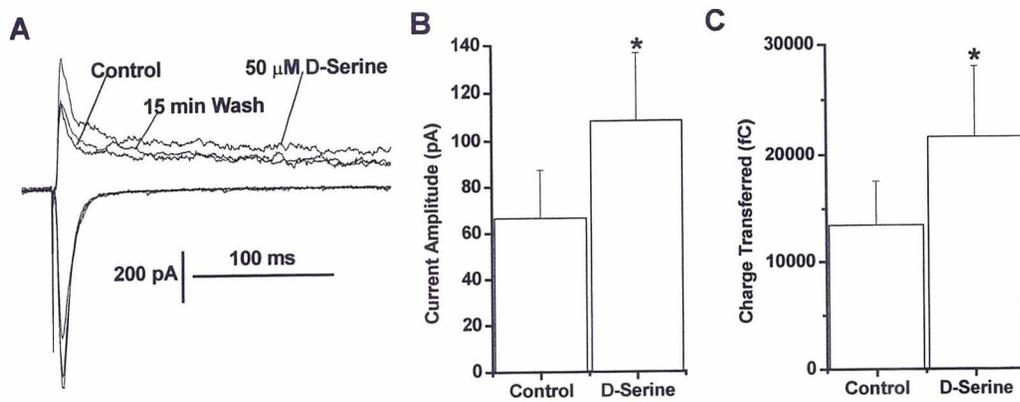


Figure 3.

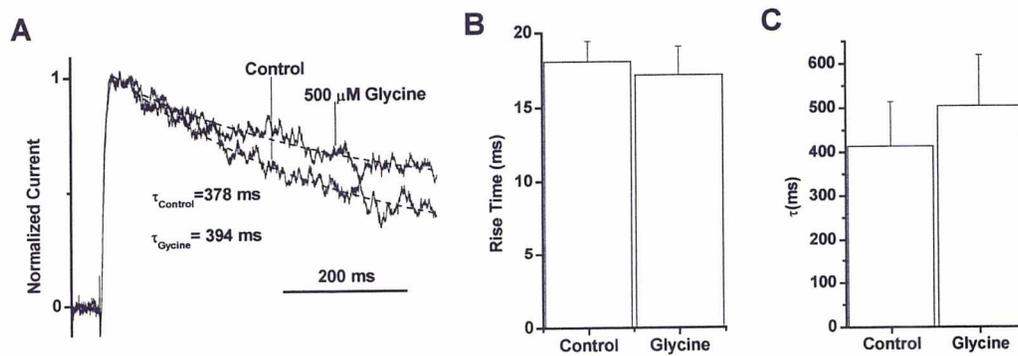


Figure 4.

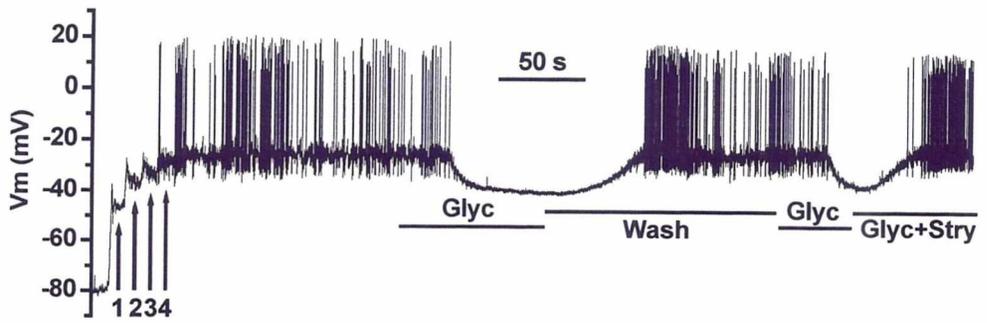


Figure 5.

Electrophysiological Evidences for the Expression of NR2C/NR2D NMDA
Receptors in NTS Neurons

Vander Baptista, José Fernando Aguiar and Wamberto Antonio Varanda
Department of Physiology – Faculty of Medicine of Ribeirão Preto/USP. Av.
Bandeirantes, 3900 14049-900 Ribeirão Preto Brazil.

Address Correspondence to:

Dr. Wamberto Antonio Varanda – Department of Physiology, Faculty of Medicine of
Ribeirão Preto/USP – Av. Bandeirantes, 3900 – 14049-900 – Ribeirão Preto/SP,
Brazil. Phone: 55 16 602 3024 Fax: 55 16 633 0017. e-mail:
wvaranda@fmrp.usp.br

Running Head: NMDA Postsynaptic Currents in the Nucleus of the Solitary Tract.

ABSTRACT

The *nucleus tractus solitarius* (NTS) plays an important role in the autonomic reflex functions. Glutamate, acting on NMDA and non-NMDA ionotropic receptors, is the major neurotransmitter in the NTS. The NMDA excitatory postsynaptic currents (EPSC), evoked by stimulation of the solitary tract, were examined over a wide range of membrane potentials using the whole cell patch clamp technique on a transverse brainstem slice preparation. The NMDA EPSC were isolated pharmacologically and were completely blocked by DL-AP5. Although there is a tendency for the rise time to be faster, the decay time becomes slower with depolarization, increasing e -fold per 145 mV. The I - V relationship of the NMDA response shows that close to the resting membrane potential, the Mg^{2+} block is not complete and that the maximal inward current was obtained at -38 mV. These results indicate that the NMDA receptor should be composed by subunits of types NR2C or NR2D. Taken together, the data suggest that the NMDA receptor may play an expressive role in the synaptic signal integration in the subpostremal NTS.

The *nucleus tractus solitarius* (NTS) is the primary nucleus for a host of peripheral sensory inputs including cardiovascular, respiratory, gustatory and gastrointestinal endings (Beckstead and Norgren, 1979). Most of the afferent fibers controlling cardiovascular and respiratory functions terminate around the obex and caudal to it (Loewy, 1990), a region denominated subpostremal NTS (Barraco et al., 1992). Although there is a large variety of neurotransmitters and neuromodulators within the NTS, glutamate and GABA have been considered the principal neurotransmitters (Grabauskas and Bradley 2003; Bonham and Chen 2002; Doyle and Andresen 2001). It is accepted that glutamate is the neurotransmitter released by the first-order visceral afferent fibers (Talman et al, 1980; Doyle e Andresen, 2001) and that it acts on NMDA and non-NMDA ionotropic receptors in second-order neurons within the NTS (Aylwin et al., 1997; Bonham and Chen, 2002). The relative role of NMDA and non-NMDA receptors in synaptic transmission in the NTS is not well understood. It has been suggested that non-NMDA receptor plays the predominant role in the synaptic transmission in the NTS (Gordon and Leone, 1991; Yen et al., 1999). While the NMDA receptor may not be required for signal transmission when the second-order neurons are at resting membrane potential, their activation may help to modulate autonomic signal transmission in the NTS under conditions in which the membrane is depolarized by high frequency or convergent inputs (Bonham and Chen, 2002). On the other hand, the specific type of NMDA receptor determines the extent of its involvement in the synaptic transmission process. The NMDA receptor is made up by hetero-oligomers of NR1, NR2A-NR2D and NR3A, NR3B subunits (Nishi *et al.*, 2001; Dingledine et al., 1999). NR1 subunit, expressed ubiquitously in the CNS, confers the essential

functions of the NMDA receptors. In contrast, other subunits show more limited expression and confer a functional diversity (Nishi, 2001). The NMDA receptors show a dual dependence of function on agonist binding and membrane potential, consisting in a unique feature among the ligand gated ion channels. The voltage dependence of NMDA receptors is dependent on submillimolar concentration of extracellular Mg^{2+} , rather than from the voltage dependence of conformational changes (Nowak et al., 1984, Mayer et al, 1984) and this property dominates the physiological role of them (Dingledine, et al, 1999). The extent of Mg^{2+} block depends on the subtypes of NMDA receptor.

To gain insight into the glutamatergic transmission in the subpostremal NTS, we have analyzed the NMDA postsynaptic currents evoked by solitary tract stimulation. Was used a transverse slice preparation of the medulla oblongata containing the subpostremal NTS from 30-35 days-old Wistar rats of either sex. The animals were anesthetized with Nembutal (50 mg/Kg, *i.p.*). Following decapitation and craniotomy, the brain and upper cervical spinal cord were removed and submerged in ice-cold (2-3 °C) artificial cerebrospinal fluid (ACSF), pH 7.35-7.4, equilibrated with carbogen (95 % O_2 , 5 % CO_2). The ACSF contained (mM): 122 NaCl; 2.5 KCl; 1.0 $MgCl_2$; 2.0 $CaCl_2$; 25 $NaHCO_3$; 1.25 NaH_2PO_4 ; 25 Glucose and the osmolality was 305-310 mOsm/Kg. H_2O . After the brain stem was dissected, it was glued with cyanoacrylate glue to an L-shaped agar block (4 % agar in ACSF) and taken to the stage of a Vibratome (MA756-Campdem Instruments, England). Two transversal slices (300 μm thick) containing the area postrema were obtained from each animal. After cutting, the slices were incubated for 60 minutes at 32 °C in ACSF

constantly gassed with carbogen. A single slice was transferred to the recording chamber on the stage of an upright microscope (E600 Nikon Inc., Tokyo Japan), held in place with a nylon net mounted on a platinum wire. The chamber was continuously superfused with ACSF (saturated with carbogen) at a rate of 2-3 ml/min, driven by gravity. All drugs were applied at known concentrations by changing the perfusion line. Experiments were performed at room temperature (23-25 °C). Strychnine was purchased from Sigma Chemical Co (Saint Louis, MO, USA), DL-AP5 (DL-2-Amino-5-phosphonopentanoic acid), DNQX (6,7-Dinitroquinolixaline-2,3 Dione), L-689-560 (*trans*-2-Carboxy-5,7-dichloro-4-phenylaminocarbonyl amino-1,2,3,4-tetrahydroquinoline) and bicuculline methochloride were from TOCRIS Cookson Inc. (Ellisville, MO, USA). All other salts are purchased from Sigma. Efforts were made to minimize the number of animals used and their suffering in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the Faculty of Medicine of Ribeirão Preto/USP.

Patch pipettes were pulled from borosilicate glass tubing (Sutter Instrument Co. Novato, CA, USA) on a P-97 puller (Sutter Instrument Co., Novato, CA, USA) and had the tip fire polished on a microforge (Narishige MF-83, Tokyo, Japan). The internal solution was (mM): 130 CsF; 10 NaCl; 1 MgCl₂; 3 K-ATP; 10 EGTA; 10 HEPES; pH adjusted to 7.3 with CsOH and osmolality of 295-305 mOsm/Kg.H₂O. The indifferent electrode was a Ag/AgCl wire connected to the extracellular solution via an agar bridge (2.5 % in the internal solutions). When filled with the above solutions the pipettes had resistance between 4-8 MΩ. Junction potentials were calculated using the Axoscope 1.0 program and the results corrected accordingly.

Cells were approached by the 'blind patch' method and seal resistances in excess of 2-5 G Ω were obtained prior to entering the whole-cell configuration. Access resistances were corrected between 70-80 %. Recordings were made with an EPC-7 (List Medical - Darmstadt, Germany) patch clamp amplifier. Whole-cell currents and voltages were low-pass filtered at 3 KHz (8 pole Bessel filter - LPF8 - Warner Instruments Corp, Hamden CT, USA) digitized at 10 KHz by a computer driven A/D converter (Digidata 1200B - Axon Instruments – Foster City, USA), and stored on hard disk using the pClamp6 software (Axon Instruments). Data were analyzed off-line using the MiniAnalysis program (Synaptosoft, New Jersey, USA), Clampfit or Axoscope (Axon Instruments). Synaptic responses of the NTS neurons were evoked by electrical stimulation (15 V, 50-100 μ s, 0.2-0.5 Hz, stimulus isolation unit-DS2A-Digitimer Ltd., Garden City, England) delivered by a twisted pair (bipolar) platinum electrode (100 μ m diameter) positioned on the ipsilateral solitary tract over visual control. The I - V relationship of NMDA-EPSCs was fitted by

the following equation (1):
$$I = \frac{[ag_{max}(V - V_R)]}{\left(a + [Mg^{2+}]_o e^{-V\delta F/RT}\right)}$$
, where V is the holding potential,

V_R is the reversal potential, g_{max} the maximal conductance measured at a holding potential of +40 mV, a represents the dissociation constant in the absence of transmembrane voltage, δ indicates the fraction of the membrane voltage at the blocking site and gives the voltage dependence of Mg^{2+} binding, and R , T , z and F have their usual meaning. The semilogarithmic plot of the decay time constants or of the rise time of NMDA, non-NMDA and GABA currents as a function of

membrane potential was fitted by equation (2):
$$\tau_{(V)} = \frac{1}{Be^{AV}}$$
, where A and B are

constants. The pooled data are expressed as the mean \pm SE and statistical significance between values ($p < 0.05$) were determined by the Student's t test.

The NMDA evoked EPSC were isolated by perfusing the preparation with 5 μ M DNQX, 5 μ M strychnine and 50 μ M bicuculline to block non-NMDA, glycine and GABA_A receptors, respectively (Figure 1A). This response was completely blocked by 50 μ M DL-AP5 (figure 1A, inset). The NMDA EPSC rise times showed a remarkable variability, ranging from 14.8 to over 40 ms at the different voltages. There is a non statistically significant tendency for the rise time to be faster at more depolarized voltages. On the other hand, the decay time of the NMDA EPSCs is clearly dependent on the membrane voltage, being prolonged by depolarization in an exponential manner. The decay time constants (τ_{nmda}) at -70 and +50 mV were statistically different ($p < 0.05$). This voltage-dependence of the τ_{NMDA} has also been observed in other CNS regions (O'Brien *et al.*, 1997). Considering the reaction between neurotransmitter and the closed receptor and subsequent opening of the channel as a simple first-order chemical reaction, the relationship between the decay time constant and membrane potential could be fitted with the equation 2. Thus, the values of the τ_{nmda} plotted against voltage, on a semi logarithmic plot, fall close to a straight line (figure 1D). Therefore, the $\tau_{\text{nmda}}(V)$ apparently obeys the theoretical exponential relation expected from equation 2, and increases e -fold by 145 mV.

The I - V relationship of NMDA response has a characteristic "J" shape with a region of negative conductance for voltages more negative than -40 mV, where Mg^{2+} block of the NMDA receptor channel is evident (figure 1B, $n = 5$). In order to

estimate the sensitivity of the NMDA receptor to Mg^{2+} block, the I - V curves obtained from 5 subpostremal NTS neurons were fitted by equation 1 (figure 1B). This equation assumes a model where Mg^{2+} ions block the open channel at a site within the membrane electrical field (Woodhull, 1973; Neher and Steinbach, 1978; Ascher & Nowak, 1988). The reversal potential obtained from the fit was -2.1 ± 7.3 mV. The maximal slope conductance $\left(g_{max} = \frac{dI}{dV}\right)$, derived from the linear range of the I - V relationships (from +10 to +50 mV), was 3.4 ± 0.6 nS ($n = 5$). The parameter δ in equation 1 gives the fraction of membrane potential acting at the binding site or, in others words, the voltage dependence of Mg^{2+} block. We found a value of δ equal to 0.67 ± 0.17 ($n = 5$), suggesting that the Mg^{2+} blocking site is about 67 % of the way across the membrane electrical field from the outside [but not necessary 67% of the distance across the membrane, if the electrical field is not constant (Woodhull, 1973)]. Kuner and Schoepfer have shown that NMDA receptors containing NR2A or NR2B subunits have a high voltage dependence ($\delta \sim 1$) and pass maximal inward current at voltages close to -25 mV. On the other hand, receptors containing NR2C or NR2D subunits show a smaller voltage dependence ($\delta \sim 0.7$) and pass maximal inward current at about -35 mV. The maximal inward current measured in the I - V curve occurred at -38.7 ± 4.2 mV. Thus, these two values, δ and the amplitude of the maximal inward current, suggest that the subpostremal NTS neurons contain subunits of type NR2C or NR2D. Because the intensity of NMDA receptor Mg^{2+} block is relatively weak, this receptor can be activated at voltages close to the resting membrane potential (-57

± 6.2 mV; $n = 65$), allowing depolarizing current to pass with significant amplitude. Since the NMDA EPSC have a slower decay phase than non-NMDA EPSCs, Anchisi et al. (2001) have shown that the charge transferred across the membrane by NMDA receptor is even larger than by non-NMDA receptor. Taken together, these data indicate that in subpostremal NTS neurons, at the resting membrane potential, there is a significant contribution of NMDA receptors to synaptic signals. Furthermore, NMDA receptors containing NR2C/NR2D subunits deactivate more slowly than that containing NR2A/NR2B subunits (Kuner and Schoepfer, 1996; Monyer et al., 1994; Vicini et al 1998). The slow kinetics could determine to a greater extent the temporal summation of synaptic signals. This may suggest that the NMDA receptors in subpostremal NTS neurons operate as not only a coincidence detector but as an integrator of synaptic input signal.

REFERENCES

- ACHER, P.; NOWAK, L. 1988. The role of divalent cations in the N-methyl-D-aspartate responses of mouse central neurones in culture. *J. Physiol.* 399 : 247 – 266.
- ANCHISI, D.; SCELFO, B.; TEMPIA, F. 2001. Postsynaptic currents in deep cerebellar nuclei. *J. Neurophysiol.* 85 : 323 – 331.
- AYLWIN, M. L.; HOROWITZ, J. M.; BONHAM, A. C. 1997. NMDA receptors contribute to primary visceral afferent transmission in the nucleus of the solitary tract. *J. Neurophysiol.* 77 : 2539 – 2548.
- BARRACO, R.; EL-RIDI, M.; ERGENE, E.; PARIZON, M.; BRADLEY, D. An atlas of the rat subpostremal nucleus tractus solitarius. *Brain Res. Boll.* 29 : 703-765, 1992.
- BECKSTEAD, R. M.; NORGREN, R. An autoradiographic examination of the central distribution of the trigeminal, facial, glossopharyngeal and vagal nerves in the monkey. *J. Comp. Neurol.* 184 : 455-472, 1979.
- BONHAM, A. C.; CHEN, C. 2002. Glutamatergic neural transmission in the nucleus tractus solitarius: N – methyl – D – aspartate receptors. *Clin. Exper. Pharmacol. Physiol.* 29 : 497 – 502.
- DOYLE MW, AND ANDRESEN MC 2001. Reliability of monosynaptic sensory transmission in brain stem neurons *in vitro*. *J Neurophysiol* 85: 2213-2223
- GORDON, F. J.; LEONE, C. Non-NMDA receptors in the nucleus of the tractus solitarius play the predominant role in mediating aortic baroreceptor reflexes. *Brain Res.* 568 : 319-322, 1991.

GRABAUSKAS, G.; BRADLEY, R. M. 2003. Frequency-dependent properties of inhibitory synapses in the rostral nucleus of the solitary tract. *J. Neurophysiol.* 89 : 199 – 211.

KUNER, T.; SCHOEPFER, S. 1996. Multiple structural elements determine subunit specificity of Mg²⁺ block in NMDA receptor channels. *J Neurosci.* Jun 1; 16(11): 3549-58.

LOEWY, A. D. 1990. Central autonomic pathway. *In* Central Regulation of Autonomic Functions. A. D. Loewy & K. M. Spyer, Ed. : pp 88 – 103. Oxford. New York.

MAYER, M. L.; WESTBROOK, G. L.; GUTHRIE, P. B. 1984. Voltage-dependent block by Mg²⁺ of NMDA responses in spinal cord neurones. *Nature* 309 : 261 – 263.

MONYER H, BURNASHEV N, LAURIE DJ, SAKMANN B AND SEEBURG PH. Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron* 12:529-540, 1994.

NEHER, E.; STEINBACH, J. H. 1978. Local anaesthetics transiently block currents through single acetylcholine-receptor channels. *J. Physiol.* 277 : 153 – 176.

NISHI, M.; HINDS, H.; LU, H.; KAWATA, M.; HAYASHI, Y. Motoneuron specific expression of NR3B, a novel NMDA-type glutamate receptor subunit that works in a dominant-negative manner. *J. Neurosc.* 21 : RC185 : 1-6, 2001.

NOWAK, L.; BREGESTOVSKI, P.; ASCHER, P.; HERBERT, A.; PROCHIANTZ, A. 1984. Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. *Nature* 307 : 462 – 465.

O'BRIEN, J. A.; ISAACSON, J. S.; BERGER, A. J. 1997. NMDA and non-NMDA receptors are co-localized at excitatory synapses of rat hypoglossal motoneurons. *Neurosci. Letters* 227 : 5 – 8.

TALMAN, W. T.; PERRENE, M. H.; REIS, D. J. Evidence for L-glutamate as the neurotransmitter of baroreceptor afferent nerve fibers. *Science*. 209 : 813-815, 1980.

Woodhull, A. M. 1973. Ionic blockage of sodium channels in nerve. *J. Gen. Physiol.* 61 : 687 – 708.

YEN, J. W.; CHAN, J. Y. H. AND CHAN, S. H. H. 1999 Differential roles of NMDA and non-NMDA receptors in synaptic responses of neurons in nucleus tractus solitarius of the rat. *J. Neurophysiol.* 81 : 3034 - 3043

LEGEND TO FIGURE

Figure 1. NMDA EPSCs. *A*) Pharmacological isolation of the NMDA EPSCs by perfusion of bicuculline (50 μM), strychnine (5 μM) and DNQX (5 μM). Holding potentials varied from -90 to $+50$ mV in 10 mV steps. Addition of DL-AP5 (50 μM) to the bath abolished the synaptic currents completely (inset). *B*) *I-V* relationship of the NMDA responses showing the characteristic "J" shape with a region of negative slope conductance. The reversal potential estimated from the fit was -2.1 ± 7.3 mV. *C*) Plots of the rise time against the membrane potentials. Note that there is a tendency of the rise time to be faster with depolarization. *D*) Plot of the decay time constant against the membrane potentials. The decay time constant is dependent on membrane voltage, being prolonged by depolarization in an exponential manner (increasing *e*-fold per 145 mV).

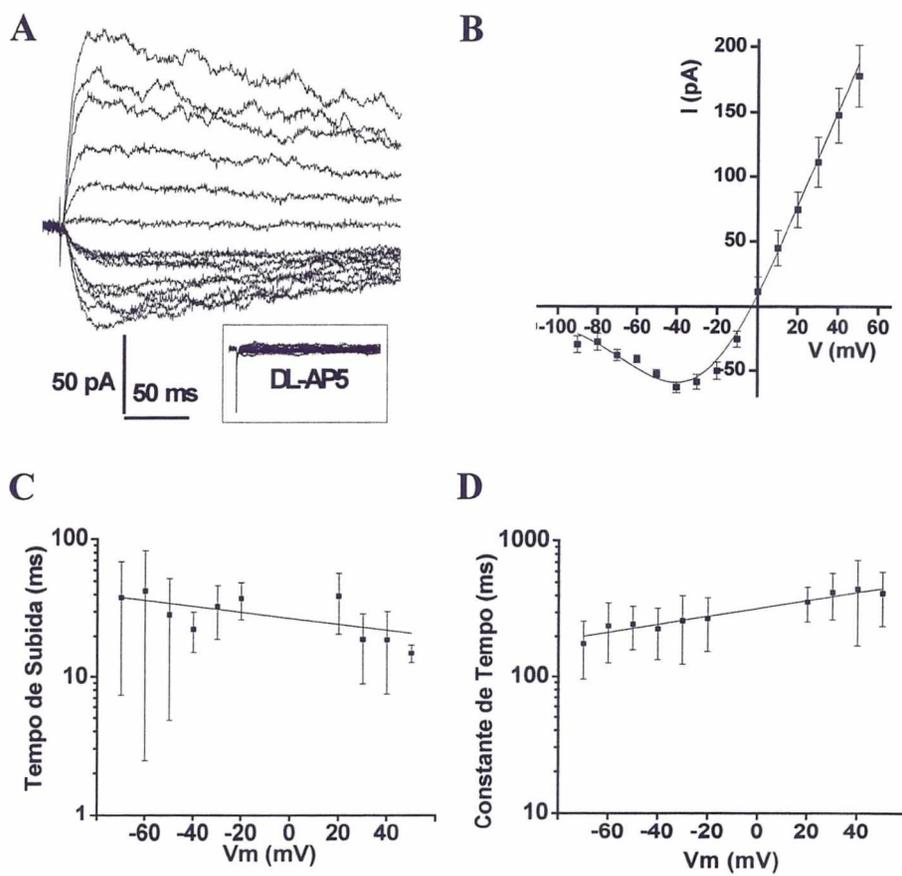


Figure 1.