Sergio Marinho da Silva

**Modulação do sistema catecolaminérgico
pelos receptores glutamatérgicos e de
angiotensina II no bulbo de ratos.**

Modulation of the catecholaminergic system by
glutamatergic and angiotensin II receptors in
the rat medulla oblongata.

São Paulo

2014

Sergio Marinho da Silva

**Modulação do sistema catecolaminérgico
pelos receptores glutamatérgicos e de
angiotensina II no bulbo de ratos.**

Modulation of the catecholaminergic system by
glutamatergic and angiotensin II receptors in
the rat medulla oblongata.

Tese apresentada ao Instituto de
Biociências da Universidade de São
Paulo, para a obtenção de Título de
Doutor em Ciências, na Área de
Fisiologia Geral.

Orientadora: Profa. Dra. Débora
Rejane Fior-Chadi

São Paulo

2014

Ficha Catalográfica

Marinho da Silva, Sergio.

Modulação do sistema catecolaminérgico pelos receptores glutamatérgicos e de angiotensina II no bulbo de ratos. 94 páginas.

Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Fisiologia.

1. $\alpha 2$ adrenoceptor 2. Glutamato 3. Angiotensina II I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Fisiologia.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Orientador(a)

Dedicatória

Dedico este trabalho à minha família,

meus amigos,

E a Heloise.

Muito obrigado por me apoiarem,

E por nunca duvidarem de mim.

Epígrafe

“I’ve got blisters on my fingers!”

The Beatles - Helter Skelter

Agradecimentos

Agradeço à minha orientadora, Débora Rejane Fior-Chadi, e meu orientador no exterior, Mohan K. Raizada, pela chance de poder desenvolver meu projeto.

Agradeço ao apoio dos doutores Daniel Carrettiero, Merari Ferrari, João Matsumoto, Maísa Costa, Andreas Betz, Lisete Michelini, Thiago Santos Almeida.

Agradeço aos doutores da Universidade da Flórida, Aline Mourão, Vinayak Shenoy, Seungbum Kim, Anandharajan Rathinasabapathy, Jasenka Zubcevic, Colin Sumners, Song Chunjuan, e Michael Katovich.

Agradeço também ao apoio dos colegas de laboratório Paulinho Maciel, Daniela Debone, Marina Almeida, Karina Marra e Thaís Martins.

Agradeço aos meus colegas no exterior, Michael Zingler, Jessica Marulanda, Monica Santisteban, Wei Yuan, Niousha Ahmari, Yangfei Qi, Joy Zhang, Colleen Jeffrey, Meng, Jele'cia Milton, Andrew Espejo e Sara Croft.

Agradeço também à Bárbara Falquetto, Cláudia Carvalho e ao Marco Antônio Lapa, por terem me ajudado a realizar este projeto.

Este estudo foi financiado pelas seguintes agências de fomento: CAPES, CNPq e FAPESP: processos nº 2007/08752-0, 2009/18564-2 2010/19849-8 e 2013/11542-9.

Muito obrigado a todos vocês.

Índice

Introdução.....	1
Importância do controle da pressão arterial	1
Controle da pressão arterial pelo sistema nervoso autônomo	3
Sistema catecolaminérgico.....	8
Sistema glutamatérgico	12
Sistema renina-angiotensina	17
Modulação do sistema catecolaminérgico pelo glutamato e angiotensina II	20
Objetivos	23
Materiais e Métodos	24
Cultura de células.....	24
Tratamentos.....	25
Western Blotting	26
Verificação da toxicidade do glutamato	27
Avaliação de citotoxicidade pelo método de redução do MTT	28
Implante do transmissor de telemetria na cavidade abdominal	29
Estrutura dos vetores AAV contendo AT1R-shRNA	30
Injeção <i>in vivo</i> do AT1R-shRNA no NTS	30
Microinjeções de clonidina no NTS	31
Medida dos níveis de mRNA do AT1R, receptores α 2 adrenérgicos e tirosina-hidroxilase por RT-PCR de tempo real	31
Análise dos dados.....	33
Resultados	34

Influência do glutamato sobre o α 2R em cultura de células	34
Análise da viabilidade celular	34
Influência de receptores NMDA sobre o α 2R	39
Influência de receptores AMPA/cainato sobre o α 2R	42
Influência de receptores NMDA sobre a enzima tirosina hidroxilase	45
Caracterização dos ratos antes e após o knockdown do receptor AT1 no NTS	47
Injeção de clonidina no NTS dos ratos knockdown	52
Expressão gênica após o knockdown crônico do AT1R no NTS	52
Discussão	59
Influência dos receptores ionotrópicos glutamatérgicos sobre o α 2R	60
Toxicidade dos agonistas e antagonistas glutamatérgicos	60
Receptores glutamatérgicos modulam o α 2R	62
Relevância da interação entre receptores glutamatérgicos e adrenérgicos	63
Possível influência do glutamato sobre a tirosina hidroxilase ..	64
Influência do knockdown do receptor AT1R de angiotensina no NTS sobre o sistema catecolaminérgico	64
Comparação dos estudos <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	66
Considerações finais	68
Conclusão	69
Resumo	70

Abstract	72
Referências Bibliográficas	74

Introdução

Importância do controle da pressão arterial

O controle da pressão arterial é essencial para a manutenção da homeostase do organismo. Ele é responsável pela circulação de nutrientes para as células do corpo, assim como a remoção de excretas. Para que todas as células do corpo sejam perfundidas pelo sangue, é necessário que os capilares que as irrigam recebam o sangue com a pressão apropriada. Caso a pressão seja muito baixa, o sangue deixa de irrigar a região e as células deixam de receber nutrientes e de ter as excretas removidas. No caso oposto, a pressão alta é capaz de romper os vasos sanguíneos e causar lesões aos tecidos.

Para garantir este controle, assim como a distinção de quais partes devem receber uma quantidade maior ou menor de sangue, existem diversos mecanismos que regulam a força de contração do coração, a frequência cardíaca e quais vasos devem estar mais ou menos contraídos. Estes controles são realizados, de modo geral, pelo sistema endócrino e pelo sistema nervoso. Estes sistemas são responsáveis pela manutenção do nível basal da pressão arterial, assim como por ajustes momento-a-momento e ajustes em longo prazo (Guyton & Hall, 2006).

O principal problema de saúde decorrente do controle irregular da pressão arterial é a hipertensão, que consiste na manutenção constante da pressão em níveis acima do necessário para a manutenção da homeostase do sistema. Nestes casos, o impacto gerado sobre os capilares lesiona, aos poucos, os tecidos irrigados e termina por gerar danos sérios, como no caso do derrame ou do ataque cardíaco (Guyton & Hall, 2006).

Doenças cardiovasculares representam as principais causas de morte no mundo. Contudo, com o uso de medicamentos e a prática de hábitos saudáveis, o índice de fatalidades relacionadas com a hipertensão pode ser

bastante reduzido. Por este motivo, encontramos mais hipertensos e vítimas fatais entre as pessoas de baixa renda e com menor acesso a medicamentos e educação. Esta tendência é observada globalmente, pois 80% das mortes por doenças cardiovasculares ocorrem em países de terceiro mundo. Mais de 90% das fatalidades por doenças cardiovasculares são por derrames e ataques cardíacos (Organization, 2013).

A hipertensão é, muitas vezes, desencadeada por problemas de saúde. No caso da obesidade, a pressão arterial é mais elevada para poder superar a pressão exercida pelo grande volume do indivíduo. Outro problema de saúde bastante relacionado com a hipertensão é a diabetes, onde existe a inabilidade do organismo em lidar com a glicose circulante, promovendo um aumento na concentração de aminoácidos, lipídios e carboidratos circulantes. Hábitos não saudáveis também podem desencadear a hipertensão, como o sedentarismo, dieta rica em sais e carboidratos, o fumo e a ingestão de álcool em excesso. Em todos estes casos, diz-se que a hipertensão é secundária, por estar relacionada com agentes desencadeadores de problemas cardiovasculares (Guyton & Hall, 2006).

Na maior parte dos casos, todavia, a hipertensão é desencadeada por agentes desconhecidos. Nestes casos, diz-se que a hipertensão é essencial ou primária e possui origem idiopática. A comunidade médica reconhece cerca de 95% dos casos de hipertensão como essencial. Acredita-se que a hipertensão essencial possua diversas causas, ou seja, pode ser desencadeada por diversos fatores diferentes. Nos Estados Unidos, há maior prevalência de hipertensos entre homens do que entre mulheres. Idade e raça também estão relacionadas, sendo que negros e idosos são mais propensos à hipertensão. Até pouco tempo atrás, acreditava-se que o principal responsável pela hipertensão essencial era o sistema renina-angiotensina circulante, contudo existe um consenso cada vez maior de que

o sistema nervoso simpático possa ser o responsável não apenas pela hipertensão, mas também pela produção de renina circulante e de agentes inflamatórios (Arnold *et al.*, 2013).

Controle da pressão arterial pelo sistema nervoso autonômico

Como o sistema nervoso autonômico recebe estímulos de diversos receptores espalhados pelo organismo, ele é considerado como um dos principais reguladores da pressão arterial de curto e longo prazo. Este controle é realizado pelos braços simpático e parassimpático, localizados no tronco encefálico, medula espinal e sistema nervoso periférico. Ambos os sistemas recebem aferências de barorreceptores, quimiorreceptores e termo receptores. Destes, os barorreceptores são dados como os principais reguladores da pressão de curto e longo prazo, devido à sua atuação contínua, assim como a tradução de seus estímulos em respostas cardiovasculares em um intervalo de segundos (Guyenet, 2006).

O sistema nervoso é capaz de induzir rapidamente mudanças significativas na pressão arterial. Estas mudanças, que podem ser desencadeadas pelo início de uma atividade física, ou uma resposta emocional, podem elevar significativamente o estímulo simpático ou parassimpático, provocando aumento da frequência cardíaca, dilatação da vasculatura que irriga a musculatura esquelética e vasoconstrição da musculatura visceral. Estas respostas, apesar de intensas, elevam a pressão apenas por alguns momentos e, fora no caso do estresse, não estão relacionadas com problemas de saúde. Os principais centros encefálicos responsáveis por estas respostas se encontram no córtex, nos núcleos da base, no sistema límbico e no mesencéfalo (Guyenet, 2006).

As principais regiões controladoras da pressão arterial no sistema nervoso central são o núcleo do trato solitário (NTS), o bulbo ventrolateral rostral (do inglês, rostral ventrolateral medula, ou RVLm) e o hipotálamo

(Dampney *et al.*, 2002). O NTS merece destaque por ser o primeiro núcleo encefálico a receber estímulos da periferia, além de ser capaz de modular a pressão arterial através de dezenas de transmissores e receptores diferentes (Van Giersbergen *et al.*, 1992). Já o RVLM é o núcleo responsável pelo controle direto de inúmeras eferências simpáticas controladoras do barorreflexo. O controle simpático pelo RVLM é regulado por diversos núcleos, principalmente o NTS e o PVN, e este controle permite uma regulação diferenciada do RVLM para os diferentes órgãos que recebem os estímulos simpáticos (Coote, 2005). O hipotálamo regula a pressão arterial principalmente pelos núcleos dorsomedial e paraventricular. Enquanto o núcleo dorsomedial contribui para o controle a partir de estímulos estressores oriundos do ambiente externo, o núcleo paraventricular (PVN) recebe e modula diversos estímulos do organismo relacionados com a manutenção da homeostase, como termorregulação, respostas imunológicas e regulação de fluídos. As porções cardiovasculares do PVN enviam conexões sinápticas para o NTS, RVLM e para a própria medula espinal, regulando indiretamente e diretamente o sistema cardiovascular (Figura 1). Contudo, a via mais bem compreendida do controle da pressão arterial é através do barorreflexo, regulado pelo NTS, RVLM e o bulbo ventrolateral caudal (Guyenet, 2006).

O barorreflexo é considerado a principal forma de controle da pressão arterial pelo sistema nervoso. Eles são iniciados pela estimulação de receptores sensíveis a estiramento, localizados no arco aórtico e no seio carotídeo. Uma alteração de fluxo sanguíneo nestes vasos pode estirar estes receptores, os quais enviam estímulos excitatórios, via fibras aferentes de primeira ordem, para a região medial do NTS, principalmente através do neurotransmissor glutamato. Neurônios de segunda ordem do NTS, por sua vez, enviam estímulos excitatórios, também glutamatérgicos, para o bulbo ventrolateral caudal, o qual envia estímulos inibitórios, através do

neurotransmissor GABA, para o RVLM. Por se tratar do principal regulador do sistema nervoso simpático, a inibição do RVLM faz com que a atividade simpática seja reduzida. O RVLM, inibido, estimula menos os neurônios da coluna espinal intermediolateral, levando a uma menor produção de catecolaminas pela adrenal, dilatação dos vasos sanguíneos e bradicardia (Talman *et al.*, 1980; Gordon, 1987; Blessing, 1988; Jeske *et al.*, 1995) (Figura 1). Em paralelo, a estimulação dos barorreceptores faz com que os neurônios de segunda ordem do NTS estimulem, através do glutamato, células do núcleo ambíguo, os quais induzem bradicardia através da estimulação do nervo vago (Machado & Brody, 1988). Desta forma, os barorreceptores mantêm um controle momento-a-momento de ambas as inervações simpática e vagal para o sistema cardiovascular (Spyer & Loewy, 1990; Chalmers *et al.*, 1992; Cowley, 1992; Aicher *et al.*, 2000).

Existem diversos outros mecanismos de controle da pressão arterial, ocorrendo também através de núcleos bulbares. O controle através do quimiorreflexo, por exemplo, ocorre através da estimulação de quimiorreceptores localizados nos mesmos locais que os barorreceptores. Estes receptores controlam a frequência cardíaca e respiratória através da estimulação do NTS, o qual modula a atividade simpática através de estimulação do RVLM e do núcleo pontino Kolliker-Fuse (Dampney *et al.*, 2002; Pantaleo *et al.*, 2002; Zec & Kinney, 2003). Assim como ocorre com o barorreflexo, o glutamato é essencial para o controle desta via (Benarroch, 2007).

Conforme visto, o controle da pressão arterial é realizado por diversos núcleos encefálicos, sendo que grande parte destes se encontram no bulbo (Figura 1). Dentre os principais núcleos bulbares, merecem destaque o NTS, por ser o primeiro núcleo a receber aferências viscerais, e o RVLM, por ser um dos principais núcleos controladores da atividade

simpática e o principal regulador das eferências do barorreflexo (Dampney *et al.*, 2002).

Ambos o NTS e o RVLM interagem entre si, e com o PVN, na regulação da pressão arterial. Esta interação ocorre através de diversos transmissores e receptores, além do glutamato e do GABA citados anteriormente. Sabe-se, por exemplo, que o PVN recebe projeções noradrenérgicas do NTS e do CVLM (Bienkowski & Rinaman, 2008), e projeções adrenérgicas do RVLM, ao passo que o PVN envia ocitocina e vasopressina para o NTS e RVLM (Guyenet, 2006). O NTS, PVN e RVLM também expressam transmissores e receptores angiotensinérgicos, e sabe-se que o sistema renina-angiotensina nestes três núcleos é capaz de regular o barorreflexo (Guyenet, 2006).

Dentre os sistemas de neurotransmissão envolvidos no controle da pressão arterial, o sistema catecolaminérgico se destaca devido a sua presença em todos os núcleos bulbares reguladores da pressão arterial. Sabe-se que este sistema está presente em neurônios e astrócitos bulbares, e que ele interage com diversos sistemas de neurotransmissão em todo o sistema nervoso, como, por exemplo, o sistema glutamatérgico (Bhuiyan *et al.*, 2009; Jimenez-Rivera *et al.*, 2012) e o angiotensinérgico (Fior *et al.*, 1994).

Figura 1 – A) Esquematização dos principais núcleos reguladores do tônus simpático basal. Destaque para a grande interação entre todos os núcleos envolvidos, para os centros catecolaminérgicos A1 e C2, e para os centros sensíveis à angiotensina II, (núcleos em cinza). B) Estímulos excitatórios glutamatérgicos são enviados dos barorreceptores (1) para o centro vasomotor do bulbo (2). O NTS recebe aferências dos barorreceptores, e regula, através da estimulação do bulbo ventrolateral caudal, a inibição do bulbo ventrolateral rostral. Quanto maior a estimulação dos barorreceptores, menor o estímulo glutamatérgico enviado para o gânglio pré-simpático (3). AP = área postrema; NTS = NTS; CVLM = bulbo ventrolateral caudal; RVLM = bulbo ventrolateral rostral; GPS = gânglio pré-simpático; SFO = órgão subfornical; A2, C1 = centros noradrenérgicos e adrenérgicos, respectivamente. Adaptado de Guyenet, 2006.

Sistema catecolaminérgico

Conforme dito anteriormente, diversas células bulbares do NTS e do RVLM sintetizam noradrenalina ou adrenalina. Não somente isto, a produção de adrenalina pelo encéfalo é exclusivamente realizada por células da região caudal do bulbo, enquanto a produção de noradrenalina ocorre em células bulbares e no núcleo pontino *locus coeruleus*. Sabe-se que tanto a noradrenalina quanto a adrenalina atuam ativamente no barorreflexo, e que receptores adrenérgicos no NTS, RVLM, e no PVN modulam a pressão arterial (Van Giersbergen *et al.*, 1992).

Todos os receptores catecolaminérgicos são associados à proteína G. Estes são ativados pelas catecolaminas, transmissores derivados do aminoácido tirosina, sendo estes a dopamina, noradrenalina e adrenalina. Existem 19 centros catecolaminérgicos no sistema nervoso central: 10 centros dopaminérgicos, seis centros noradrenérgicos e três adrenérgicos. Em geral, estes centros são encontrados abaixo da região cortical. Os centros dopaminérgicos se localizam entre a região da retina e o bulbo olfatório até a região do mesencéfalo. Os seis centros noradrenérgicos são encontrados ao longo do tronco encefálico, enquanto os centros adrenérgicos se localizam principalmente na região do bulbo (Cooper *et al.*, 1977; Niewenhuys, 1985; Paxinos, 1995; Siegel *et al.*, 2006).

Os neurônios catecolaminérgicos têm em comum as primeiras etapas da síntese de catecolaminas: a conversão da tirosina em l-dopa através da enzima tirosina hidroxilase e a conversão de l-dopa em dopamina pela enzima aminoácido descarboxilase. Em neurônios adrenérgicos, a adrenalina é obtida a partir da conversão da noradrenalina, pela enzima dopamina- β -hidroxilase. Em neurônios adrenérgicos a noradrenalina é convertida em adrenalina pela enzima fenil-etanolamina N-metil transferase (Cooper *et al.*, 1977; Bjöklund & Hökfelt, 1984). Após serem liberadas, estas são recaptadas da fenda sináptica por neurônios e células

gliais através de diversos transportadores. Dentre estes, encontramos o VMAT-2, sensível às monoaminas em geral, e os transportadores de noradrenalina (NET), específico para a noradrenalina (Figura 2) (Bonisch *et al.*, 1991; Hein, 2006).

Os efeitos da noradrenalina e da adrenalina são mediados através de nove receptores acoplados a proteína G, agrupados em três famílias: $\alpha 1$, $\alpha 2$ e β . Os adrenoreceptores $\alpha 1$ estão ligados a vias mediadas pelas proteínas G_q , que aumentam a síntese de inositol trifosfato e de diacil glicerol, resultando em um aumento de atividade da proteína quinase C e aumento de cálcio intracelular. Os receptores $\alpha 2$ medeiam os seus efeitos intracelulares via proteínas G_i , inibindo a atividade da enzima adenilil ciclase. Receptores $\alpha 2$ adrenérgicos ($\alpha 2Rs$) também podem ser acoplados a canais de cálcio, inibindo sua função (Boehm & Huck, 1996; Cussac *et al.*, 2002). Os receptores β adrenérgicos estão ligados à proteína G_s , que quando ativados levam a um aumento da atividade da adenilil ciclase (Siegel *et al.*, 2006). Comparada com a noradrenalina, a adrenalina é menos específica a $\alpha 2$ -adrenoreceptores e estimula β -adrenoreceptores e $\alpha 1$ adrenoreceptores de modo similar (Berthelsen & Pettinger, 1977; Bylund & U'prichard, 1983).

A noradrenalina e a adrenalina possuem papel inibitório na regulação da pressão sanguínea e nos batimentos cardíacos no NTS (Bhargava *et al.*, 1972; Baum & Shropshire, 1973). Apesar de ainda não ser claro o papel de cada receptor, evidências indicam que a ação adrenérgica é decorrente principalmente da ativação de $\alpha 2Rs$, sendo este controle fundamental para a manutenção da regulação do barorreflexo pelo NTS (Tung *et al.*, 1988; Sved *et al.*, 1992). Os receptores $\alpha 2$ estão presentes em maior quantidade no NTS do que os receptores $\alpha 1$ e β adrenérgicos (Young & Kuhar, 1979), sendo que até o momento o envolvimento desses dois últimos subtipos no controle central da pressão arterial não está bem caracterizado (Aoki & Pickel, 1992; Dampney, 1994; Tsukamoto *et al.*, 2002). Ao contrário do

observado no NTS, a ativação de $\alpha 2R$ no RVLM leva à inibição dos gânglios pré-simpáticos, reduzindo a atividade simpática. Ao contrário dos receptores glutamatérgicos, os $\alpha 2R$ não são responsáveis pela resposta rápida na queda da pressão arterial, mas possuem uma grande influência no grau de excitabilidade dos neurônios excitados, logo sendo de grande influência no controle da pressão arterial (Madden & Sved, 2003; Stornetta, 2009).

Acredita-se que alterações do sistema catecolaminérgico no sistema nervoso, principalmente nos núcleos relacionados ao controle da pressão arterial, estejam relacionadas com o desenvolvimento da hipertensão essencial. Existe uma menor quantidade de $\alpha 2Rs$ em todo o NTS de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) em relação aos animais normotensos (WKY)(Carrettiero *et al.*, 2012), e estes são mais sensíveis à noradrenalina (Hayward *et al.*, 2002). Em animais hipertensos, as células adrenérgicas do agrupamento C1, onde encontramos o CVLM e o RVLM, se mostram menos sensíveis à estimulação por angiotensina II, importante neurotransmissor relacionado com a regulação da pressão arterial (Teschemacher *et al.*, 2008).

O $\alpha 2R$ interage com diversos outros receptores no sistema nervoso. Em diversas partes do sistema nervoso, os $\alpha 2Rs$ regulam diretamente a liberação de glutamato, o principal transmissor excitatório do barorreflexo e quimiorreflexo (Kamisaki *et al.*, 1993). Sabe-se que grande parte das células catecolaminérgicas bulbares também são glutamatérgicas (Stornetta *et al.*, 2002). Desta forma, levando-se em consideração que o glutamato pode induzir a síntese de catecolaminas, é provável que haja uma interação entre o sistema glutamatérgico e catecolaminérgico em células bulbares.

Figura 2 – Esquematização da síntese de noradrenalina e adrenalina e dos principais receptores noradrenérgicos e adrenérgicos. Ambas a noradrenalina e a adrenalina se ligam aos mesmos receptores. Todas as catecolaminas compartilham as etapas iniciais até a síntese de dopamina. A noradrenalina é formada a partir da dopamina, via enzima dopamina beta-hidroxilase e a adrenalina a partir da noradrenalina, via enzima PNMT. Adaptado de Hein, 2006.

Sistema glutamatérgico

Dentre os diversos transmissores, o glutamato merece destaque por ser o principal neurotransmissor excitatório do barorreflexo (Gordon & Sved, 2002). Encontramos células que utilizam este transmissor, assim como seus receptores, em todos os núcleos envolvidos no barorreflexo e no quimiorreflexo, e a estimulação de seus receptores ionotrópicos é responsável pela resposta rápida a variações da pressão arterial e do pH sanguíneo (Machado & Bonagamba, 2005; Baude *et al.*, 2009).

O glutamato é considerado o mais importante mediador de sinais excitatórios no sistema nervoso, e está envolvido na maior parte das funções encefálicas (Danbolt, 2001) e no desenvolvimento do sistema nervoso central, atuando na indução de sinapses e diferenciação celular (Sarichelou *et al.*, 2008). Por ser um aminoácido, ele também participa em diferentes vias metabólicas (Attwell, 2000; Petroff, 2002; Tapiero *et al.*, 2002).

A sua síntese em neurônios se dá pela conversão do aminoácido glutamina em glutamato, através da enzima glutaminase, para então ser transportado para as vesículas sinápticas. Após ser liberado na fenda sináptica, o glutamato é removido através da recaptação por neurônios e astrócitos (Van Den Berg & Garfinkel, 1971; Daikhin & Yudkoff, 2000). Em astrócitos, o glutamato, após ser recaptado, é convertido em glutamina pela enzima glutamina sintetase. A glutamina é então liberada no meio extracelular e reconvertida em glutamato nos neurônios (Figura 3) (Martinez-Hernandez *et al.*, 1977; Ottersen *et al.*, 1992; Laake *et al.*, 1995).

Os receptores glutamatérgicos podem ser dos tipos ionotrópicos ou metabotrópicos associados à proteína G (Monaghan *et al.*, 1989; Watkins *et al.*, 1990; Young & Fagg, 1990). Os receptores ionotrópicos são divididos em 3 subgrupos: N-metil-D-aspartato (NMDA), cainato e alfa-amino-3-

hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionato (AMPA) (Monaghan *et al.*, 1989). Estes dois últimos são comumente referidos como receptores não-NMDA.

Os receptores de NMDA são caracterizados pelo bloqueio voltagem-dependente com Mg^{++} (Mayer *et al.*, 1989) e pela alta permeabilidade ao Ca^{++} . Para a abertura de seus canais, é necessário que a membrana plasmática seja despolarizada previamente (Mayer & Westbrook, 1987). Os receptores AMPA e cainato são permeáveis principalmente ao Na^+ e K^+ e seus canais iônicos abrem rapidamente (Pralong *et al.*, 2002). Receptores não-NMDA geram um rápido início e rápido decaimento da despolarização, enquanto os receptores NMDA medeiam um aumento lento e um decaimento de centenas de milissegundos (Collingridge *et al.*, 1983; Mayer & Westbrook, 1987; Forsythe & Westbrook, 1988; Bekkers & Stevens, 1989; Sansom & Usherwood, 1990).

Os receptores ionotrópicos glutamatérgicos estão envolvidos com dois processos relacionados com a eficácia da conexão sináptica, chamados de potenciação de longo-prazo (LTP) e depressão de longo prazo (LTD). Quando receptores glutamatérgicos são estimulados em alta frequência (acima de 100Hz) pode ocorrer a LTP, onde a transmissão de impulsos ocorre de modo mais eficiente por horas, meses ou mais. Contudo, em estimulações de baixa frequência (1Hz), pode-se observar a LTD, que leva a uma menor eficácia na transmissão do impulso (Siegel *et al.*, 2006). Ambos os processos estão relacionados com a abertura de canais NMDA após a despolarização da membrana plasmática pelos receptores não-NMDA. Diversos outros receptores, dentre eles receptores glutamatérgicos metabotrópicos, estão envolvidos com o processo (Massey & Bashir, 2007).

Já quanto aos receptores metabotrópicos glutamatérgicos, são conhecidos até o momento 8 tipos, classificados de mGluR1 a mGluR8. Estes 8 receptores são subdivididos em três grupos. O grupo I, formado

pelos receptores mGluR1 e mGluR5, está associado à proteína G_q , estimulando a atividade da fosfolipase C e a liberação de Ca^{++} de reservas citoplasmáticas. A ativação da fosfolipase C também leva a formação de diacilglicerol, que por sua vez ativa a proteína quinase C. Já a ativação dos grupos II (mGluR2-3) e III (mGluR4 e mGluR6-8), associados com a proteína G_i , resulta na inibição da adenilil ciclase (Schoepp *et al.*, 1990).

A ativação de receptores ionotrópicos glutamatérgicos está relacionada com a formação de sinapses em todo o sistema nervoso (Ozawa *et al.*, 1998). Enquanto a sinaptogênese é realizada pela ativação de receptores não-NMDA e NMDA em encéfalos desenvolvidos (Malenka & Nicoll, 1999), em neurônios imaturos de embriões e neonatos a formação de sinapses depende apenas de receptores NMDA (Ben-Ari *et al.*, 1997). Este processo, que ocorre porque os neurônios não-NMDA são inativos, leva as células a precisarem destes receptores para a sobrevivência e formação de sinapses (Lim *et al.*, 2012). Contudo, muitos dos neurônios do tronco encefálico de neonatos já se encontram desenvolvidos poucos dias após o nascimento, devido às suas funções essenciais para a sobrevivência (Kivell *et al.*, 2001; Liu & Wong-Riley, 2005).

O glutamato é liberado no NTS em resposta a ativação dos barorreceptores e de receptores cardiopulmonares (Talman *et al.*, 1980). Encontramos neste núcleo todos os subtipos de receptores AMPA, havendo predomínio da subunidade GluR2, subunidade que, quando presente, impede influxo de cálcio por este canal (Sato *et al.*, 1993; Cull-Candy *et al.*, 2006). Dentre os receptores NMDA, todos expressam a subunidade NR1 e todas as subunidades NR2, com predomínio da subunidade NR2D (Guthmann & Herbert, 1999). Os receptores NMDA do NTS se encontram predominantemente fora da região sináptica tanto na membrana pré- quanto pós-sináptica (Aicher *et al.*, 1999; Glass *et al.*, 2004). Encontramos todos os receptores metabotrópicos glutamatérgicos no NTS. Dos receptores do

grupo I, a distribuição do mGluR5 é mais restrita, enquanto dos receptores do grupo II, encontramos maior distribuição do receptor mGluR8 (Hoang & Hay, 2001).

Ao contrário do que é observado no NTS, a ativação dos receptores glutamatérgicos no RVLM ativa o sistema nervoso simpático, elevando a pressão arterial e a frequência cardíaca. Existem na região as três categorias de receptores ionotrópicos glutamatérgicos, e estes são de fundamental importância no controle da pressão arterial do animal em movimento. Contudo, quando em repouso ou sob anestesia, a influência dos receptores ionotrópicos glutamatérgicos sobre o RVLM é pouco significativa (Mayorov & Head, 2003; Wang, L.-G. *et al.*, 2007).

Os receptores glutamatérgicos podem ser regulados por fosforilação através da proteína quinase A, proteína quinase C e quinases dependentes de Ca^{++} /calmodulina (Chen & Huang, 1992; Raymond *et al.*, 1993). Os receptores do tipo cainato podem ser modulados por PKA, enquanto que ativação da proteína quinase C pode potenciar receptores NMDA (Kutsuwada *et al.*, 1992). Desta forma, quando há alterações nos níveis destes mensageiros secundários dentro dos neurônios, temos uma modificação na atividade destes receptores, o que resulta em padrões de estímulos diferentes.

Até o momento, não se sabe bem como a ativação de receptores glutamatérgicos poderia alterar o controle da pressão arterial por receptores catecolaminérgicos. Todavia, sabe-se que há a interação, em especial do $\alpha 2\text{R}$, com diversos outros receptores. Em especial, sabe-se que a ativação de receptores de angiotensina II no NTS reduz a afinidade de $\alpha 2\text{Rs}$ por seus ligantes reduzindo também a resposta hipotensora (Fior *et al.*, 1994; Díaz-Cabiale *et al.*, 2007).

Figura 3 – Esquematização do principal mecanismo de síntese do glutamato como neurotransmissor, e os principais receptores glutamatérgicos. Todos os receptores glutamatérgicos podem ser encontrados tanto na membrana pré-sináptica quanto na membrana pós-sináptica.

Sistema renina-angiotensina

Não somente os receptores de angiotensina II, mas todo o sistema renina-angiotensina-aldosterona está envolvido no controle central da pressão arterial (Baltatu *et al.*, 2011). Além da presença deste sistema no sistema nervoso, a angiotensina II circulante modula o controle central através dos órgãos circunventriculares (Davern & Head, 2007). Contudo, a atuação central da angiotensina II sobre a pressão arterial não é sempre clara e varia de acordo com a região estimulada (Matsumura *et al.*, 1998; Katsunuma *et al.*, 2003; Tsuda, 2012).

O sistema renina-angiotensina é um dos mais antigos sistemas de controle da pressão arterial descobertos pelo homem. Sabe-se hoje que este sistema existe não somente como sistema ‘circulante’, mas também ‘tecidual’ em diversos órgãos e tecidos, incluindo o encéfalo (Phillips & Sumners, 1998). Em todos os casos, as mesmas enzimas, precursores e receptores são utilizados, havendo diferenças apenas em casos específicos (Fyhrquist & Saijonmaa, 2008).

Apesar do sistema renina-angiotensina ser a muito tempo conhecido, ainda estão sendo descobertos novos elementos deste sistema. Contudo, a via ‘clássica’ é bem conhecida e grande parte dos medicamentos anti-hipertensivos se baseia nela. De acordo com a via ‘clássica’, a síntese de angiotensina I ocorre pela atuação da enzima renina sobre o precursor angiotensinogênio. A angiotensina I, por sua vez, é convertida em angiotensina II através da enzima conversora de angiotensina, ECA. No sistema circulante, a renina é produzida pelos rins e liberada na circulação após redução da pressão arterial ou do volume sanguíneo. O angiotensinogênio é produzido nos pulmões e a síntese da angiotensina II ocorre no plasma sanguíneo. Nos sistemas ‘teciduais’, as próprias células pertencentes ao órgão ou tecido produzem as enzimas e precursores do sistema, sendo que no sistema nervoso tanto os neurônios quanto as células

gliais estão envolvidos nesta produção (Figura 4) (Mckinley *et al.*, 2003; Baltatu *et al.*, 2011).

O principal receptor de angiotensina II é o AT1, e este se encontra em diversos órgãos. A ativação deste receptor induz principalmente o aumento da pressão arterial e a redução de eliminação de sais e água, através da vasoconstrição de vasos sanguíneos, estimulação do sistema nervoso simpático, produção de aldosterona pelas adrenais e liberação de hormônio antidiurético. Já o receptor AT2 medeia funções opostas às do AT1, sendo um importante regulador de fluídos e balanço de sódio, mediando vasodilatação e liberação de óxido nítrico. Contudo, grande parte das ações mais bem compreendidas desencadeadas pela angiotensina II, como vasoconstrição, facilitação de transmissão simpática e promoção de crescimento celular, é mediada pela subunidade AT1 (Dinh *et al.*, 2001).

Ambos os receptores da angiotensina II são acoplados à proteína G. O receptor AT1 pode se encontrar acoplado tanto à proteína Gi quanto a Gq, e atua principalmente elevando níveis intracelulares de Ca^{2+} e ativando as fosfolipases C₂, A e D (Dinh *et al.*, 2001). Já o receptor AT2 é acoplado à proteína Gi e promove redução dos níveis intracelulares de Ca^{2+} e aumento dos níveis de K^+ (Gyurko *et al.*, 1992; Dinh *et al.*, 2001).

A angiotensina II regula diversas atividades no sistema nervoso, alterando comportamento, níveis de hormônios reprodutivos e o controle cardiovascular. A densidade de receptores angiotensinérgicos no encéfalo é maior nos órgãos circunventriculares. Receptores AT1 se encontram em diversas regiões encefálicas, mas aparecem em maior densidade nos núcleos supraótico e paraventricular do hipotálamo e em núcleos bulbares. Já os receptores AT2 se encontram no tálamo, cerebelo, *locus coeruleus* e particularmente no núcleo olivar inferior (Song *et al.*, 1992).

Interações entre os receptores AT1 e $\alpha 2R$ ocorrem em diversas partes do organismo, como no encéfalo (Yang *et al.*, 1996), rins (Talaia *et al.*,

2006) e em vasos sanguíneos (Raasch *et al.*, 2004). Sabe-se que, no sistema nervoso, a ativação de receptores AT1 reduz a afinidade dos $\alpha 2$ Rs a seus ligantes tanto no NTS (Almeida *et al.*, 2000) quanto no núcleo reticular gigantocelular (Yang *et al.*, 1996), e que, em células do ducto deferente, há interação entre os receptores AT1 e $\alpha 2$ R provavelmente através da proteína quinase C (Trachte *et al.*, 1987). Contudo, o conhecimento da interação entre estes receptores no sistema nervoso, especialmente no NTS, ainda é muito limitado.

Figura 4 – Esquematização simplificada do sistema renina-angiotensina encefálico, representando apenas até a formação da angiotensina II e os principais receptores angiotensinérgicos. Adaptado de McKinley, 2003.

Modulação do sistema catecolaminérgico pelo glutamato e angiotensina II

Conforme descrito, são diversos os núcleos encefálicos responsáveis pelo controle da pressão arterial. Contudo, o controle do barorreflexo é realizado essencialmente pelo NTS, CVLM, RVLM e pelos transmissores glutamato e GABA. Todavia, todos estes núcleos estão sobrepostos com centros noradrenérgicos e adrenérgicos, e a ativação dos barorreceptores estimula não somente estas células catecolaminérgicas, mas também a liberação de noradrenalina e adrenalina por elas.

Não obstante, é crescente o número de trabalhos na literatura enfatizando a importância do sistema renina-angiotensina no controle central da pressão arterial, através de sua atuação em diversos núcleos, como área postrema, NTS e RVLM. Apesar de não ser claro o modo como os receptores de angiotensina AT1R atuam, sabe-se que estes regulam o nível basal da pressão arterial e a sensibilidade do NTS à estimulação do barorreflexo.

Sabe-se que os receptores AT1R e α 2R interagem de diversas formas, em terminais simpáticos e diferentes núcleos encefálicos. Também é conhecida a interação entre receptores glutamatérgicos e α 2R em diversas regiões encefálicas. Levando-se em consideração que encontramos os receptores AT1R, α 2R, NMDA e não-NMDA no NTS e RVLM, é alta a probabilidade destes receptores serem capazes de modular uns aos outros. Em especial, acreditamos que o receptor α 2R possa ser modulado tanto pelo sistema glutamatérgico quanto angiotensinérgico.

É conhecido que a ativação do AT1R no NTS reduz a influência dos α 2R sobre o barorreflexo (Fior *et al.*, 1994). Desta forma, é possível que haja uma interação α 2R-AT1R. Caso esta hipótese esteja correta, uma redução na quantidade de AT1R possivelmente influenciaria não apenas a resposta do α 2R sobre a pressão arterial e frequência cardíaca, mas também

influenciaria a produção de catecolaminas e receptores no NTS e nos núcleos que recebem aferências noradrenérgicas do NTS.

Por outro lado, pouco se sabe sobre a influência do glutamato sobre o $\alpha 2R$, quanto mais sobre o controle da pressão arterial. Grande parte dos trabalhos tem como foco a influência do $\alpha 2R$ sobre o sistema glutamatérgico, principalmente os receptores ionotrópicos e a liberação de glutamato (Bickler & Hansen, 1996; Dong *et al.*, 2008; Roh *et al.*, 2010), mas pouco é estudado sobre a influência do sistema glutamatérgico sobre o sistema catecolaminérgico.

Parte da complexidade do estudo do glutamato sobre outros sistemas de neurotransmissão se deve ao fato do glutamato exercer seu estímulo através de diversos tipos de receptores, e também por ser o transmissor excitatório principal de diversas vias reflexas (Guyenet, 2006). Desta forma, a fim de se minimizar a influência de agentes externos sobre a interação entre o glutamato e o sistema catecolaminérgico, acreditamos que a melhor abordagem seria estudar apenas a influência dos receptores glutamatérgicos sobre o bulbo, sem a influência de centros superiores ou de aferências viscerais. Para alcançar este objetivo, acreditamos que o melhor modelo experimental é o tratamento de culturas de células do bulbo com agonistas e antagonistas glutamatérgicos.

Desta forma, levando-se em consideração a importância do sistema catecolaminérgico bulbar no controle da pressão arterial e do papel modulatório que o sistema glutamatérgico e angiotensinérgico possuem sobre o sistema catecolaminérgico, nós propomos neste trabalho estudar como o sistema catecolaminérgico é modulado pelos sistemas glutamatérgico e angiotensinérgico.

Este estudo foi dividido em duas partes. Na primeira parte, verificamos, em cultura de células do bulbo de ratos neonatos, a influência dos receptores ionotrópicos glutamatérgicos sobre o sistema

catecolaminérgico. Na segunda parte, analisamos a influência do knockdown do AT1R sobre o sistema catecolaminérgico, assim como sobre o sistema catecolaminérgico de ratos adultos.

Objetivos

Os objetivos principais deste trabalho são:

- 1- Em culturas de células do bulbo de ratos neonatos:
 - Verificar o efeito modulatório dos receptores NMDAérgicos sobre o $\alpha 2R$ e a enzima tirosina hidroxilase,
 - Verificar o efeito modulatório dos receptores ionotrópicos glutamatérgicos não-NMDA sobre o $\alpha 2R$ e a tirosina hidroxilase.

- 2 – Em animais adultos, após o knockdown do AT1R no NTS:
 - Verificar os efeitos cardiovasculares da injeção de clonidina no NTS,
 - Verificar a expressão dos genes do $\alpha 2R$, AT1R e da tirosina hidroxilase, no NTS, PVN e RVLM.

Materiais e Métodos

Foram utilizados ratos albinos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*), do Biotério do Departamento de Fisiologia do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, Brasil e do Biotério do Instituto do Cérebro McKnight, da Universidade da Flórida, EUA. Os animais foram mantidos em ciclo claro: escuro 12:12 horas, com acesso à água e comida *ad libitum*. Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética em Uso de Animais do IB (CEUA, Protocolo 162/2012) e pelo Comitê Institucional de Uso e Cuidado de Animais da Universidade da Flórida, de acordo com as instruções do National Institute of Health (estudo IACUC # 201203535).

Nos casos de cirurgias em animais adultos, exceto quando em realizando cirurgias terminais, foram administrados buprenorfina (0,5 mg/kg subcutâneo), Baytril (0,5 mg/kg subcutâneo) e a pomada antibiótica Budbak, para assegurar analgesia dos animais e para minimizar inflamações.

Cultura de células

Para todas as etapas descritas abaixo, exceto quando citado, o tecido obtido foi mantido em solução-tampão gelada (120mM NaCl, 5mM KCl, 1,2mM KH₂SO₄, 1,2mM MgSO₄, 25mM NaHCO₃ e 13mM glicose, a pH 7.4).

Os bulbos dos ratos, obtidos por decapitação, são reduzidos a fragmentos de 1 mm², e submetidos à dissociação química por 2,5 % de tripsina (Gibco, EUA). A dissociação química é realizada em banho-maria à 37°C, 100 rotações por minuto, por 40 minutos. A ação da tripsina é interrompida por 6 mg de inibidor da tripsina (Gibco). O tecido é dissociado mecanicamente, através de diversas pipetagens até que as células fiquem dissociadas e livres na solução. As células foram

concentradas em um pellet após centrifugação por cinco minutos a 300g. Em seguida, remove-se a solução-tampão do tubo e adiciona-se às células meio de cultura Neurobasal (Gibco) aquecido à 37°C, suplementado com 2% B27 (Gibco), 0,25mM glutamax (Gibco) e 0,25mM L-glutamina (Sigma-Aldrich, EUA) e antibiótico Gentamicin (Gibco). Para verificar a concentração de células, aplica-se uma amostra do meio com células em uma câmara para contagem Neubauer (Optik Labor, Alemanha). As células mortas ou lesadas foram diferenciadas das saudáveis através de tratamento com 0,02% Trypan blue (Sigma-Aldrich).

Cultiva-se 1800 células/mm² em placas de petri com células de 24 poços (TPP, Suíça) tratadas com Poly-D-Lisina (Sigma) e soro fetal bovino (Sigma). As culturas de células utilizadas foram mantidas em estufa à 37°C em atmosfera com concentração de CO₂ em 5%. O meio de cultura foi trocado após 3 horas, três e seis dias após a realização da cultura.

Tratamentos

As culturas de células foram tratadas após seis dias do plaqueamento com os seguintes agonistas e antagonistas dos principais tipos de receptores ionotrópicos glutamatérgicos: glutamato (L-glutamic acid, Sigma, EUA); NMDA (Sigma); cainato (kainic acid, Santa Cruz, EUA); MK801 (Sigma), antagonista de receptores do tipo NMDA e DNQX (Sigma), antagonista de receptores AMPA e cainato.

Para a análise da influência dos principais tipos de receptores ionotrópicos glutamatérgicos, foram utilizadas as seguintes combinações de drogas, concentrações e tempo de tratamentos: cainato a 1 µM, 10 µM e 100 µM por 24 horas; 10 µM glutamato, 10 µM NMDA, 100 µM MK801, 100 µM MK801 + 10 µM glutamato, 100 µM MK801 + 10 µM NMDA por 24 horas; 10 µM glutamato, 10 µM NMDA, 100 µM MK801, 100 µM MK801 + 10 µM NMDA por 12 horas; 10 µM glutamato, 1 µM cainato, 10

μM DNQX, 10 μM DNQX+ 10 μM glutamato, 10 μM DNQX+ 1 μM cainato por 24 horas.

Western Blotting

As culturas tiveram suas proteínas extraídas através de esfregaços do assoalho das placas com 200 μL de RIPA (1% NP40; 0,5% Deoxicolato de sódio; 1% SDS; 1 mM EDTA; 1 mM EGTA; 1% Coquetel inibidor de protease (Sigma); PBS). O lisado ficou em repouso por 30 minutos e então vortexado e centrifugado (14000 rpm, 20 min) a 4°C e mantido em freezer - 80°C.

A concentração de proteínas dos lisados foi quantificada através do método de Bradford, utilizando-se para a quantificação um espectrofotômetro. Para a realização da eletroforese, alíquotas foram preparadas através da fervura de entre 10 μg e 20 μg de proteínas do extrato de proteínas (dependendo do anticorpo utilizado), Sample Buffer (Sigma) e RIPA e aplicadas em poços do gel de SDS-poliacrilamida (FisherBiotech, EUA) 12%. Utilizamos o marcador de peso molecular Kaleidoscope (Bio-Rad). Este gel então foi exposto à eletroforese sob corrente de 100V em solução de corrida (25mM Trizma base, 96mM Glicina, 10% SDS, água). Em seguida, o gel foi mergulhado em tampão de transferência (25mM Tris, 190 mM Glicina, 10% Metanol, água), junto à membrana de nitrocelulose e papel absorvente (Bio-Rad, EUA) e flanelas brancas grossas. Este conjunto foi submetido à corrente de 100V mergulhado em tampão de transferência, em gelo, por 1h.

As membranas de poliacrilamida foram retiradas deste conjunto, lavadas em TBS-T (150mM NaCl, 10mM Tris, 0,05% Tween 20, água) e bloqueadas com 5% leite em TBS-T por 1hora. As membranas bloqueadas foram incubadas com anticorpos anti-tirosina hidroxilase (Chemicon), α tubulina (Chemicon) e anti $\alpha 2\text{R}$ (Santa Cruz) por 18h a 4°C. Após várias

lavagens em TBS-T, a membrana foi incubada com anticorpos secundários ECL anti-mouse e anti cabra (Amersham) por 1 hora.

A detecção do complexo anticorpo primário-secundário foi feita através da solução HPR (Millipore). As membranas foram expostas a filmes fotográficos quimioluminescentes de alta performance Amersham Hyperfilm ECL (GE, EUA) pelo tempo necessário, em câmara escura. Os filmes foram mergulhados no revelador Devalex Air (Champion, GB) por 5 minutos, lavados rapidamente em água destilada e mergulhados no fixador GBX (Kodak, BR) por 10 minutos.

Verificação da toxicidade do glutamato

A viabilidade das células após os tratamentos foi verificada por marcação de células com Trypan-Blue e verificação da integridade do DNA das células. Para a marcação com Trypan-Blue, as células foram tratadas com concentrações de glutamato de 10 μ M, 100 μ M, 200 μ M, 1mM e 5,6mM, além de NMDA a 10 μ M e 100 μ M, e então incubadas com PBS (11,4g/l Na₂HPO₄.H₂O; 2,6g/l NaH₂PO₄.H₂O; 0,2g/l NaCl; 8g/l NaCl; água) contendo 5% de Trypan-Blue por cinco minutos e então fotografadas em microscópio invertido.

Para verificar a integridade do DNA das células, as culturas foram tratadas com glutamato a 10 μ M, 100 μ M e 300 μ M. Após 6 horas, extraímos o DNA através de esfregaço das placas com PBS (8g NaCl, 0,2g KCl, 1,44g Na₂HPO₄, 0,24g KH₂PO₄, pH 7,4). O esfregaço foi feito vagarosamente para evitar danos ao DNA. A solução de PBS com o esfregaço foi centrifugada por 5 min a 12000 rpm e o pellet foi ressuspenso em 200 μ L de PBS. Foi adicionado depois 20 μ L de SDS e 2 μ L de proteinase K (Promega, EUA), e a solução foi deixada em repouso por 2 h a 42°C.

Em seguida, foi adicionado 1 volume de fenol tamponado (Sigma), e a solução foi em seguida emulsionada. O fenol da solução foi removido e foi adicionado 1 volume de solução fenol com clorofórmio e álcool isoamílico 24:1. A solução foi emulsionada e centrifugada por 5 min a 12000 RPM, e então a solução de fenol com clorofórmio foi descartada. Foi adicionado 1 volume da solução clorofórmio álcool isoamílico 24:1, solução foi emulsionada e centrifugada a 12000 RPM. O clorofórmio com álcool isoamílico foi descartado, e foi adicionado 1/10 do volume de acetato de sódio 3M e 2 volumes de etanol absoluto. A solução repousou no freezer por 1 hora e foi centrifugada a 12000 RPM por 10 min. Em seguida, a solução foi descartada e o pellet foi mantido. O tubo foi lavado com etanol 70% e centrifugado por 5 min a 12000 RPM. Foi removido o álcool, ressuspensionado o pellet em 10µL de água e este foi então armazenado em freezer.

A concentração de DNA por amostra foi obtida por um espectrofotômetro ND-1000. A integridade do DNA foi verificada aplicando-o em gel de agarose 1% contendo brometo de etídio (0,1µg/ml) e submetendo-o à corrida a 100 V durante 30 minutos com tampão de corrida constituído de TBE (324 g Tris base, 165g ácido bórico, 120mls 0.5M EDTA, pH 8.0).

Avaliação de citotoxicidade pelo método de redução do MTT

O princípio deste método consiste na conversão do sal MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]) (Sigma), pelas mitocôndrias, ao produto formazana. A formação deste produto, acumulado dentro da célula, é detectada através da adição de um solvente apropriado, no qual a formazana se dissolve e adquire coloração específica. Esta coloração, quantificada em espectrofotômetro, representa a atividade metabólica das células (Mosmann, 1983).

Os tratamentos realizados neste teste foram escolhidos de acordo com resultados da marcação com Trypan-Blue e de acordo com a literatura (Chen *et al.*, 2000; Aras *et al.*, 2008).

Para a realização deste método, culturas de células foram plaqueadas em placas de 96 poços, com 100 µL de meio de cultura por poço, e incubadas nas condições citadas anteriormente. Seis dias após o plaqueamento das células, as culturas receberam tratamentos com diferentes concentrações de glutamato (100 µM; 1 mM; 10 mM), NMDA (100 µM; 1 mM; 10 mM) e cainato (100 µM; 1 mM; 2 mM). Cada tratamento foi realizado, por placa, em triplicata, e mantido por 48 h. Após o período de incubação, o meio com tratamento foi trocado por meio de cultura com 10 µL do corante MTT (5 mg/ml, Sigma) e as células foram novamente incubadas por mais 3 h. Em seguida, o meio foi retirado cuidadosamente e adicionaram-se 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma) para solubilização dos cristais de formazana. As placas foram agitadas no escuro durante 30 minutos e a absorbância correspondente a cada amostra foi medida no leitor de ELISA a 560 nm. A absorbância obtida das células controle positivo, não tratadas, foi considerada como 100% de viabilidade celular, enquanto no controle negativo a absorbância das células tratadas com Triton-X, potente detergente que lisa a membrana plasmática, foi considerada como 0% de viabilidade.

Implante do transmissor de telemetria na cavidade abdominal

Ratos de 8 semanas foram anestesiados com isoflurano (5% para indução da anestesia e 2-3% durante a cirurgia, em oxigênio puro). Foi realizada uma incisão sagital no abdômen do rato, entre a altura do limite inferior do fígado e a bexiga. A musculatura abdominal foi cortada e as vísceras afastadas para a exposição da aorta abdominal. Através de uma incisão na aorta abdominal, foi inserido rostralmente o cateter do

dispositivo de telemetria (Data Sciences International, St Paul, MN). Cola adesiva (Vetbond, 3M Animal Care Products, St Paul, MN) foi usada para segurar o cateter no lugar. O dispositivo de telemetria foi inserido na cavidade abdominal e preso na musculatura abdominal através de sutura. A musculatura abdominal e a pele foram suturadas individualmente. Os ratos foram mantidos em tapetes térmicos (38°) até se recuperarem completamente da anestesia.

Estrutura dos vetores AAV contendo AT1R-shRNA

O vírus utilizado para o knockdown do receptor AT1Ra consiste em um DNA complementar sintético codificando shRNA direcionado ao AT1Ra, clonado em um vetor AAV, PTR-UF11, sob o controle do promotor humano U6. O AAV-AT1-shRNA construído foi 'empacotado' em um serotipo AAV2. Um gene repórter GFP, sob o controle do promotor CBA, foi clonado acima do cassete de expressão do shRNA para que se pudesse visualizar a expressão do vetor após injeção.

O vírus usado como controle é similar ao descrito previamente, mas com DNA embaralhado (Sc), contendo os mesmos nucleotídeos que o molde de DNA AT1R-shRNA, mas em uma ordem completamente diferente e não complementar a nenhum gene do rato, formando assim o AAV-Sc-shRNA.

Injeção *in vivo* do AT1R-shRNA no NTS

Após um período de 80 dias da introdução do transmissor, o rato foi anestesiado com 70 mg/kg de ketamina, 10 mg/kg de xilasina e 2,5 mg/kg de acepromazina, e posicionado em aparelho estereotático com a cabeça flexionada ventralmente em um ângulo de aproximadamente 40° para permitir exposição cirúrgica da superfície dorsal do bulbo. Injeções bilaterais foram realizadas com uma micropipeta de vidro (1,5 mm

OD/0,84 mm) (World Precision Instrument, Sarasota, FL), com a ponta puxada para ter um diâmetro de 30-50 μm . Os ratos receberam quatro injeções bilaterais no NTS, distanciadas 500 μm rostrocaudal ao *calamus scriptorius*, $\pm$ 500 μm da linha medial, e 500 μm ventral à superfície dorsal; e 300 μm rostrocaudal do *calamus scriptorius*, 500 μm ventral a superfície dorsal, e 500 μm ventral da superfície dorsal, com 0,2 μl /injeção de AAV2/AT1R-shRNA, ou AAV2-Sc-shRNA (2×10^8 partículas contendo genoma). Pressão arterial média e frequência cardíaca foram monitoradas via telemetria antes e após os procedimentos.

Microinjeções de clonidina no NTS

Quatro semanas após o knockdown do AT1R, os ratos foram anestesiados com 1,2-1,3 g/kg de uretano, posicionados em aparelho estereotáxico, e tiveram seu encéfalo dorsal exposto, como descrito anteriormente. Os ratos receberam injeções unilaterais de clonidina e de fluido cerebrospinal artificial (aCSF) no NTS, com 1 h de intervalo entre cada injeção, 500 μm rostrocaudal do *calamus scriptorius*, 500 μm a direita da linha medial e 500 μm ventral da superfície dorsal. As injeções foram de 50 nl de 4 mM de clonidina em aCSF e 50 nl de aCSF. Valores basais da pressão arterial e frequência cardíaca foram medidos continuamente 5 min antes da injeção e durante 1 h seguinte a injeção.

Medida dos níveis de mRNA do AT1R, receptores $\alpha 2$ adrenérgicos e tirosina-hidroxilase por RT-PCR de tempo real

Imediatamente após injeção do aCSF, os ratos foram decapitados e seus encéfalos foram rapidamente coletados. As regiões do NTS, PVN e RVLM foram dissecadas e submetidas ao isolamento do mRNA, usando TRIzol kit. Os níveis de mRNA do AT1R, $\alpha 2\text{R}$ e tirosina hidroxilase foram

analisados por PCR quantitativo de tempo real usando primers específicos e sonda (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Após confirmação da integridade do RNA, foi realizado a transformação do mesmo em cDNA dupla fita, através de transcrição reversa, a fim de amplificar e tornar a molécula mais estável. Para isso, 1µg de RNA total foi adicionado a reagentes para reação de transcrição reversa seguindo o protocolo do fabricante (TaqMan – Applied Biosystems, EUA). Primeiramente, foi preparada uma solução de transcriptase reversa contendo: 5µL tampão RT (10X), 11 µL MgCl₂(25mM), 10µL nucleotídeos dNTPs (10mM), 2,5µL de hexâmeros randômicos (2,5µmol/L), 1µL inibidor de RNase (0,4U/µL) e 1,25µL da enzima transcriptase reversa (1,25U/µL, MultiScribe Reverse Transcriptase), assim como o RNA de cada amostra em um tubo de polipropileno próprio para PCR atingindo o volume final de 50µL. Além dos tubos experimentais, outros 2 tubos controles foram inseridos no ensaio: um sem a enzima transcriptase reversa e outro sem o RNA. Os tubos foram colocados no termociclador com o seguinte protocolo: 10 minutos de incubação a 25°C seguidos de 30 minutos de transcrição a 48°C e 5 minutos a 95°C para inativação da enzima. Ao final do procedimento o cDNA foi estocado em freezer a -80°C até sua utilização para quantificação gênica através de PCR em tempo real.

As probes e primers para o mRNA da Tirosina Hidroxilase (Rn00562500_m1 - Tyrosine Hydroxylase), do receptor de angiotensina II AT1R (Rn02758772_s1) e do α 2R (Rn00562488_s1 - Adrenergic receptor α 2 a) contêm FAM™ como repórter fluorescente e são comercialmente disponíveis através da empresa Applied Biosystems. Foram avaliados os mRNA citados na cultura de células após tratamento com glutamato e noradrenalina. Foram utilizados primers e probe para o RNA ribossômico

(18S) como controle da reação, o qual contém o repórter VIC™ e também é comercialmente disponível (Applied Biosystems, EUA).

As soluções foram colocadas em placa de 96 poços com qualidade óptica (ABI Prism, Applied Biosystems, EUA) que foi lacrada com adesivo também com qualidade óptica (ABI Prism, Applied Biosystems, EUA) e submetida à amplificação e detecção através de PCR em tempo real (modelo 7300, ABI Prism, Applied Biosystems, EUA) por 40 ciclos. Todas as amostras de cDNA foram analisadas em quadruplicata ou quintuplicata. Os dados foram normalizados com o gene GADPH.

Análise dos dados

Os dados quantitativos obtidos foram analisados através de teste T de Student não pareado, ou através de análise de variância (ANOVA) de uma via ou de duas vias, e seguido por pós-teste apropriado. A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa GraphPad Prism, versão 4.00 de 3 de abril de 2003, para Windows (GraphPad Software, San Diego, Califórnia EUA).

Resultados

Influência do glutamato sobre o $\alpha 2R$ em cultura de células

Para estudar a modulação do sistema catecolaminérgico, tratamos as culturas de células com diferentes agonistas e antagonistas de receptores glutamatérgicos e observamos a influência destes sobre os níveis de proteína do $\alpha 2R$ e da enzima tirosina hidroxilase.

Contudo, devido ao caráter citotóxico do glutamato, iniciamos o estudo analisando a toxicidade destes agonistas. A fim de nos assegurarmos de que as doses de glutamato e seus agonistas não estariam prejudicando as células, verificamos por diferentes técnicas que os tratamentos não estariam afetando a integridade celular, seu metabolismo ou seu material genético.

Análise da viabilidade celular

As análises do teste MTT mostraram que as culturas tratadas por 48 horas com 10 mM de glutamato, 10 mM de NMDA e 2 mM de cainato tiveram a viabilidade celular reduzida em 17%, 16% e 16%, respectivamente. Estes mesmos agonistas, nas concentrações de 100 μM e 1 mM, não induziram redução de viabilidade celular (Figura 5).

Também foi verificado que o glutamato não induziu a degradação do DNA celular nas concentrações de 10 μM , 100 μM e 300 μM , tampouco redução da permeabilidade da membrana plasmática (Figura 6). Apenas na concentração de 5,6 mM de glutamato observou-se aumento na concentração de células marcadas com Trypan-Blue (Figura 7).

Estes dados, logo, indicam que os tratamentos com glutamato, NMDA e cainato induzem redução de viabilidade celular em concentrações acima de 1 mM.

Figura 5 - Análise da viabilidade celular pelo teste com MTT. Células do bulbo foram plaqueadas em placas de 96 poços e tratadas com glutamato, NMDA e cainato por 48 horas. A) O glutamato reduz significativamente a taxa de sobrevivência celular apenas na concentração de 10 mM. B) O agonista NMDA reduz a taxa de sobrevivência celular na concentração de 10 mM. C) O agonista cainato reduz a sobrevivência celular a 2 mM. Valores mostrados como média $\pm$ erro padrão ($n = 4$ para glutamato e 3 para os demais). * $p < 0,05$ quando comparado com controle. Teste ANOVA de uma via seguido por post hoc teste de Bonferroni.

Figura 6 – Gel de DNA de cultura de células tratadas com glutamato nas concentrações de 10 μ M, 100 μ M e 300 μ M. Fotos obtidas a partir da iluminação do gel com luz ultravioleta.

Figura 7 - Fotografia da cultura de células do bulbo de ratos neonatos tratadas com glutamato e Trypan-blue. A – aspecto de cultura não tratada com glutamato. B – cultura de célula tratada com 100 μ M glutamato por 3 horas e corada com Trypan Blue. Não se observa células marcadas em azul. C – cultura de célula tratada com 5,4 mM glutamato por 3 horas. O número de células coradas com Trypan-blue, em azul (seta), variou após o tratamento. Aumento: 200x.

Influência de receptores NMDA sobre o α 2R

Para verificar se a modulação do sistema catecolaminérgico pelo glutamato nas culturas está relacionada com a ativação de receptores NMDA, tratamos as culturas de células do bulbo com glutamato, agonista e antagonista do receptor NMDA por 12 e 24 horas. Os tratamentos foram realizados na seguinte ordem: 10 μ M de glutamato, 10 μ M de NMDA, 100 μ M do antagonista de receptores NMDA MK801, 10 μ M de glutamato em conjunto com 100 μ M de MK801 e 10 μ M de NMDA em conjunto com 100 μ M de MK801.

As culturas tratadas com 10 μ M de glutamato mostraram aumento significativo dos níveis de proteína dos α 2Rs. Culturas tratadas com 10 μ M de NMDA também mostraram maior concentração de α 2Rs (Figura 8).

Quando administrado com 100 μ M do antagonista de receptor NMDA MK801, o glutamato não induziu alterações significantes nos níveis proteicos do α 2R. Similarmente, quando administrado com MK801, o NMDA também não induziu mudanças significantes. A administração apenas de MK801 não induziu alterações significativas (Figura 8).

Nos tratamentos de 12 horas, todavia, os tratamentos não influenciaram de modo significativo os níveis do α 2R. Desta forma, os dados sugerem que o efeito modulatório do glutamato e do NMDA provavelmente ocorre entre 12 e 24 horas após o tratamento das culturas (Figura 9).

Figura 8 - Efeito do NMDA, agonista de receptores de glutamato tipo NMDA, sobre níveis de proteína de receptores α 2 adrenérgicos (α 2Rs), após tratamento por 24 horas, em culturas de células do bulbo de ratos neonatos. A) 10 μ M NMDA induziu aumento significativo nos níveis proteicos do α 2R quando comparado com o controle. O antagonista do receptor NMDA, o MK801, foi capaz de bloquear o aumento nos níveis proteicos promovido pelo NMDA (10 μ M NMDA + 100 μ M MK801). B) O MK801 foi capaz de bloquear o aumento promovido pelo glutamato sobre o α 2R (10 μ M glutamato + 100 μ M MK801). C) Filmes de Western Blotting com a marcação das proteínas pelos anticorpos específicos para α 2R e α -tubulina, este último utilizado para normalização dos resultados. Valores mostrados como média $\pm$ erro padrão (n = 5). $p < 0,05$ comparado com o controle. Teste ANOVA de uma via seguido por teste post hoc de Dunnett aplicado para análise estatística.

Figura 9 – Efeito do NMDA, agonista de receptores de glutamato tipo NMDA, sobre níveis de proteína de receptores α 2 adrenérgicos (α 2Rs), após tratamento por 12 horas, em culturas de células do bulbo de ratos neonatos. A) Os tratamentos com glutamato, NMDA, antagonista de receptores NMDAérgicos MK801 e a combinação de NMDA com MK801 não modularam significativamente o nível de proteínas do receptor α 2 adrenérgico B) Filmes de Western Blotting com a marcação das proteínas pelos anticorpos específicos para α 2R e α -tubulina, este último utilizado para normalização dos resultados. Valores mostrados como média $\pm$ erro padrão (n = 4). p = 0,39 comparado com o controle. Teste ANOVA de uma via aplicado para análise estatística.

Influência de receptores AMPA/cainato sobre o $\alpha 2R$

Analizamos a influência do cainato tratando as culturas com concentrações de 1 μ M, 10 μ M e 100 μ M por 24 horas e verificando por Western Blotting a variação dos níveis do $\alpha 2R$. A análise destes dados não mostrou diferença significativa entre os grupos, estando os valores de erro padrão elevados (Figura 10).

Para verificar se a influência do glutamato sobre as culturas está relacionada com a ativação de receptores AMPA e cainato, tratamos as culturas de células do bulbo com glutamato, cainato e o antagonista de receptores AMPA e cainato, DNQX, por 24 horas. O cainato também ativa os receptores AMPA, porém em menor intensidade. Os tratamentos foram realizados na seguinte ordem: 10 μ M de glutamato, 1 μ M de cainato, 10 μ M do antagonista DNQX, 10 μ M de glutamato em conjunto com 10 μ M de DNQX e 1 μ M de cainato em conjunto com 10 μ M de DNQX. Observamos que o glutamato não modula significativamente os níveis proteicos quando administrado em conjunto com o antagonista de receptores AMPA e cainato, DNQX. O tratamento apenas com o antagonista também falhou em alterar os níveis do $\alpha 2R$ (Figura 11).

Figura 10 – Efeito do cainato, agonista de receptores ionotrópicos glutamatérgicos não-NMDA, sobre os níveis do receptor α 2 adrenérgico horas, após tratamento por 24 horas em cultura de células do bulbo de ratos neonatos. A) Nenhuma das concentrações selecionadas de cainato induziu modulação dos níveis de proteína do receptor α 2 adrenérgico. B) Filmes de Western Blotting com a marcação das proteínas pelos anticorpos específicos para α 2R e α -tubulina, este último utilizado para normalização dos resultados. Valores mostrados como média $\pm$ erro padrão ($n = 4$). $p = 0,39$ comparado com o controle. Teste ANOVA de uma via aplicado para análise estatística.

Figura 11 - efeito do cainato, agonista de receptores ionotrópicos glutamatérgicos não-NMDA, sobre os níveis proteicos de receptores α 2 adrenérgicos (α 2R) em cultura de células do bulbo de neonatos. A) O antagonista de receptores não-NMDA DNQX foi capaz de bloquear a tendência de aumento promovido pelo glutamato nos níveis proteicos de α 2 adrenoceptores. B) O cainato (1 μ M), o DNQX (10 μ M) e a combinação de ambos (1 μ M e 10 μ M, respectivamente), não alteraram os níveis de α 2R. C) Filmes de Western Blotting com a marcação das proteínas pelos anticorpos específicos para α 2 adrenoceptores e α -tubulina, este último utilizado para normalização dos resultados. Valores mostrados como média $\pm$ erro padrão (n = 3). ^τ p = 0,0957 quando comparados com o controle. Teste ANOVA de uma via aplicado como análise estatística.

Influência de receptores NMDA sobre a enzima tirosina hidroxilase

Levando-se em consideração que a ativação do gene regulador da enzima tirosina hidroxilase está associada com a despolarização celular, e que os receptores glutamatérgicos são majoritariamente excitatórios, buscamos analisar a influência dos diferentes receptores glutamatérgicos sobre a modulação dos níveis proteicos desta enzima. Para isso, a mesma sequência de tratamentos utilizada para o estudo do $\alpha 2R$ foi utilizada.

Os dados obtidos indicam que os tratamentos realizados não alteram de modo significativo os níveis proteicos da enzima tirosina hidroxilase. Contudo, observamos tendência de redução dos níveis proteicos da enzima após tratamento com NMDA ($p = 0,069$), enquanto os demais tratamentos não alteraram em relação ao controle da produção da enzima (Figura 12).

Figura 12 - Efeito do NMDA, agonista de receptores de glutamato NMDAérgicos, sobre níveis da enzima tirosina hidroxilase, em culturas de células do bulbo de ratos neonatos. A) Existe tendência em redução dos níveis da enzima após tratamento com NMDA, o qual é revertido quando o tratamento NMDA é combinado com o seu antagonista MK801. B) Não se observa modulação dos níveis da enzima tirosina hidroxilase após tratamento com MK801. C) Filmes de Western Blotting com a marcação das proteínas pelos anticorpos específicos para tirosina hidroxilase e α -tubulina, este último utilizado para normalização dos resultados. Valores mostrados como média $\pm$ erro padrão ($n = 4$). ^t $p = 0,069$. Teste ANOVA de uma via aplicado para análise estatística.

Caracterização dos ratos antes e após o knockdown do receptor AT1 no NTS

Todos os animais receberam os transdutores de telemetria aos 2 meses de idade e, para o knockdown do AT1R, foram inoculados com o AAV2-AT1R-shRNA ou AAV2-Sc-shRNA no NTS aos 4 meses. A fim de verificar se o knockdown interferiu nos efeitos cardiovasculares dos α 2R no NTS medial, os ratos receberam injeções de clonidina no NTS, e tiveram os parâmetros cardiovasculares registrados. Imediatamente após a injeção de clonidina, 5 ratos de cada um dos grupos tiveram seus encéfalos removidos para a coleta do mRNA, enquanto 2 tiveram seus encéfalos removidos para análises histológicas.

A pressão arterial e frequência cardíaca dos ratos foram registradas por dois dias consecutivos em dois períodos distintos, um mês antes e um mês após a injeção do vírus. Apenas utilizamos os dados dos animais com peso entre 500 e 700 g no momento da injeção de clonidina.

Após a administração de clonidina no NTS, os animais foram eutanasiados e secções coronais do tronco encefálico e hipotálamo foram coletados. Observamos a expressão da proteína verde fluorescente GFP, induzida por gene repórter presente nos vírus injetados, primariamente no núcleo grácil e no NTS (Figura 13). A análise do qPCR indicou que os níveis do AT1R foram reduzidos em aproximadamente 30% no NTS dos animais AAV2-AT1R-shRNA quando comparado com os ratos controle. Nenhuma mudança foi observada no PVN ou no RVLM (Figura 14).

A inoculação dos vírus AAV2-AT1R-shRNA não alterou a pressão arterial ou a frequência cardíaca em relação aos ratos inoculados com AAV2-Sc-shRNA. Contudo, a frequência cardíaca caiu em ambos os grupos AAV2-Sc-shRNA e AA2-AT1R-shRNA após a administração do vírus, enquanto a pressão arterial permaneceu constante (Figura 15).

Figura 13 – Transdução do AAV2-AT1R-shRNA no NTS (A), e em ramificações neuronais, estendendo-se até o bulbo ventrolateral (B). Coloração verde-clara mostra maior expressão da proteína fluorescente verde GFP na região do NTS, indicando sucesso na transdução do vetor AAV2-AT1R-shRNA no NTS. Projeções fluorescentes indicam proteínas GFP em projeções neuronais partindo do NTS para porções ventrais e rostrais do bulbo. Setas: local da injeção do vírus. AP = Área Postrema. 4V – 4º ventrículo. VLM = medula ventrolateral. Zoom: 2x.

Figura 14 - Expressão dos genes do receptor de angiotensina AT1 (AT1R) no núcleo do trato solitário (NTS), núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) e no bulbo ventrolateral rostral (RVLM), em ratos controle (AAV2-Sc-shRNA) e com o AT1R knockdown no NTS (AAV2-AT1R-shRNA). Apesar da redução de 30% na expressão do AT1R no NTS após o knockdown do mesmo, nenhuma mudança foi observada na expressão deste gene nas demais áreas analisadas. $p < 0,05$. Teste T de Student não pareado; AAV2-AT1R-shRNA: $n=4$; $^{\circ}$ = outlier (1.64).

Figura 15 – Efeito do knockdown do receptor AT1 (AT1R) no NTS sobre a pressão arterial (PA) e frequência cardíaca (FC). **A)** Não há alterações significativas na PA entre os ratos injetados com AAV2-AT1-shRNA e AAV2-Sc-shRNA. **B)** A FC é significativamente reduzida em ambos os grupos controle e knockdown do AT1R após a microinjeção do vírus no NTS, mas não há diferença na redução da FC entre grupos. Gráficos representam médias $\pm$ desvio padrão. AAV2-Sc-shRNA: n = 7; AAV2-AT1R-shRNA: n = 6. $p < 0,001$ comparado com o controle. * = diferença estatística significativa pelo teste ANOVA de 2 vias.

Injeção de clonidina no NTS dos ratos knockdown

Valores basais da PA e FC foram coletados por cinco minutos imediatamente antes das injeções de clonidina. Injeções de clonidina gradativamente reduziram a PA e FC, chegando aos níveis mais baixos entre 15 e 22 minutos após administração (Figura 16).

A administração de clonidina no NTS em ambos os grupos AAV2-Sc-shRNA e AAV2-AT1R-shRNA não resultou em mudanças significantes da PA. Contudo, as injeções de clonidina no NTS dos ratos knockdown para AT1R reduziram significativamente a FC, enquanto nenhum efeito bradicárdico foi observado nos animais controles (Tabela 1, Figura 17). Além do mais, a FC dos ratos knockdown para o receptor AT1R estava significativamente mais alta do que nos ratos controles durante o registro da pressão arterial basal, logo antes da injeção de clonidina. Contudo, a PA e FC dos ratos de ambos os grupos, após a injeção de clonidina, não retornaram aos níveis basais, mesmo após esperar 1 h e 20 min (Figura 16).

Expressão gênica após o knockdown crônico do AT1R no NTS

Para determinar se o knockdown crônico do receptor AT1R no NTS poderia modular a expressão do gene $\alpha 2R$ e da enzima tirosina hidroxilase, em diferentes centros modulatórios cardiovasculares do encéfalo, foi realizada uma reação quantitativa de polimerase em cadeia para estes genes no NTS, PVN e RVLM. Contudo, nossos dados mostram que o knockdown do AT1R não modulou nenhum destes genes nas regiões selecionadas (Figura 18).

Figura 16 – Gráficos representativos da influência da microinjeção de 4 mM de clonidina no NTS de ratos anestesiados com uretano. Os parâmetros avaliados são similares entre os ratos knockdown para o receptor AT1 de angiotensina II e ratos que receberam injeção de vírus controle. A) Valores da pressão arterial média. B) Valores da frequência cardíaca. Valores representam períodos anteriores à injeção de clonidina (valores basais), logo após a injeção de clonidina e 1 hora após a injeção (recuperação).

Tabela 1 - Pressão arterial média (PA), em mmHg, e frequência cardíaca (FC), em BPM, dos ratos controle (AAV2-Sc-shRNA) e dos ratos knockdown para o gene AT1Ra no NTS (AAV2-AT1R-shRNA). Valores em média $\pm$ erro padrão.

	AAV2-Sc-shRNA		AAV2-AT1R-shRNA	
	PA	FC	PA	FC
Basal	82.8 $\pm$ 12	411.4 $\pm$ 9.6	87 $\pm$ 7	440 $\pm$ 3.5
Clonidina	82.5 $\pm$ 9	407 $\pm$ 11.2	78.4 $\pm$ 7.5	423 $\pm$ 6.5

Figura 17 – Efeito da injeção de clonidina no NTS de ratos, sobre a pressão arterial média (PA) e frequência cardíaca (FC), após knockdown crônico do receptor AT1R no NTS. A) Não há mudanças significativas na PA após a microinjeção de 4 mM de clonidina em ambos os grupos. B) A FC está significativamente maior no grupo knockdown, tanto na medida basal quanto após injeção de clonidina, em relação ao grupo controle. No grupo AAV2-AT1R-shRNA, há redução significativa da FC após tratamento com clonidina. # = diferença estatística pelo teste t de Student, $p < 0,05$; * = diferença estatística para o teste ANOVA de 2 vias, $p < 0,05$. $N = 3$ para ambos os grupos.

Figura 18 – Expressão dos genes do receptor $\alpha 2$ -adrenérgico ($\alpha 2R$) e da enzima tirosina hidroxilase, no núcleo do trato solitário (NTS), núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) e no bulbo ventrolateral rostral (RVLM), em ratos controle (AAV2-Sc-shRNA) e com o AT1R knockdown no NTS (AAV2-AT1R-shRNA). Nenhuma mudança foi observada na expressão dos genes analisados. Teste T de Student não pareado; AAV2-AT1R-shRNA: n=4; o = outlier (1.64).

Discussão

Diversos estudos mostraram a interação entre linhas de neurotransmissão no bulbo de ratos, ambos *in vivo* e *in vitro*. Estudos de nosso laboratório sugerem a existência de uma interação receptor-receptor envolvendo $\alpha 2$ Rs, receptor angiotensinérgico e de neuropeptídeo Y (Fior-Chadi & Fuxe, 1998), bem como de receptores A1 de adenosina (Carrettiero *et al.*, 2008). Outros estudos de nosso grupo também mostraram que a adenosina também interage com o $\alpha 2$ R em cultura de células do bulbo (Carrettiero *et al.*, 2009).

Sabe-se desde 1975 que as células catecolaminérgicas bulbares influenciam o controle do barorreflexo (Haeusler, 1975), e há ativação gênica das mesmas após estímulos excitatórios oriundos do barorreflexo como a hipóxia (Dampney *et al.*, 2003). Apesar disso, poucos estudos analisaram como o sistema catecolaminérgico bulbar interage com os diversos sistemas de neurotransmissão envolvidos no controle cardiovascular bulbar.

Conforme citado, nosso grupo comprovou a redução da atividade dos $\alpha 2$ Rs mediante ativação dos AT1Rs no NTS, tanto em afinidade do receptor por seu ligante quanto em resposta cardiovascular (Fior *et al.*, 1994). Contudo, esta interação foi observada após estimulação aguda e pouco se sabe sobre como o $\alpha 2$ R, assim como a produção de catecolaminas pelo NTS, se comportariam mediante alterações crônicas da atividade do AT1R do NTS. Caso haja interações diretas entre estes receptores, o knockdown do AT1R poderia interferir tanto na expressão do gene do $\alpha 2$ R quanto na sensibilidade destes mediante estimulação, assim como na produção de catecolaminas por estas células.

Já a interação entre o glutamato e o sistema catecolaminérgico é menos compreendida nos núcleos bulbares. Não somente isto, a grande

quantidade de receptores ionotrópicos, de ambos os grupos, NMDA e não-NMDA presentes e ativos na região (Baude *et al.*, 2009; Stornetta, 2009) dificulta a compreensão do papel de cada um destes sobre o sistema catecolaminérgico. Desta forma, uma maneira de se estudar o possível papel destes receptores sem interferências das diversas vias reflexas glutamatérgicas, oriundas de centros superiores ou da periferia (Van Giersbergen *et al.*, 1992), é através do isolamento do próprio bulbo, através da realização de culturas de células da região.

Considerando estes dados, no presente estudo foi avaliada alterações no sistema catecolaminérgico, mais especificamente no $\alpha 2R$ e na enzima tirosina hidroxilase, mediante o knockdown do AT1R no NTS, assim como o possível papel da ativação dos receptores glutamatérgicos na modulação de seus níveis proteicos no bulbo.

Influência dos receptores ionotrópicos glutamatérgicos sobre o $\alpha 2R$

Para o estudo de como o glutamato modula o sistema catecolaminérgico bulbar, foi utilizado o neurotransmissor glutamato e os agonistas NMDA e cainato, assim como os antagonistas de NMDA e cainato, MK801 e DNQX, respectivamente. Assim, foi possível estimar a influência dos receptores ionotrópicos glutamatérgicos dos tipos NMDA e não-NMDA sobre a modulação do $\alpha 2R$. É conhecido que o tratamento com cainato e seu antagonista também tenha levado à ativação e bloqueio, respectivamente, dos receptores AMPA em menor intensidade, já que ambos os agonistas AMPA e cainato são capazes de se ligar a ambos os receptores (Boulter *et al.*, 1990).

Toxicidade dos agonistas e antagonistas glutamatérgicos

A primeira coisa a se considerar, todavia, ao se tratar células do sistema nervoso com agonistas e antagonistas glutamatérgicos, é se a

concentração selecionada dos tratamentos é ou não tóxica. Como não existe na literatura trabalhos descrevendo a toxicidade dos agonistas glutamatérgicos em cultura de células do bulbo, e como a concentração dada como tóxica no sistema nervoso pode variar desde nM até mM (Velasco *et al.*, 2003; Bender *et al.*, 2010; Meade *et al.*, 2010), a primeira série de experimentos deste estudo foi verificar a influência do glutamato sobre o metabolismo celular, permeabilidade da membrana plasmática e degradação do DNA. Conforme descrito anteriormente, apenas observamos redução na permeabilidade celular e redução de metabolismo em concentrações de glutamato acima de 5 mM, e não observamos degradação de DNA em concentrações de glutamato até 300 μ M (Figura 5 a 7).

Os antagonistas glutamatérgicos, na maior parte dos casos, não são tóxicos para as células do sistema nervoso. Contudo, o bloqueio de receptores NMDA em neonatos pode levar à neurodegeneração (Ben-Ari *et al.*, 1997; Lim *et al.*, 2012). A toxicidade de antagonistas como o MK801 ocorre porque os receptores NMDA são necessários em neurônios imaturos, devido à liberação de fatores neurotróficos, induzida nestes por estes receptores (Ben-Ari *et al.*, 1997).

Todavia, no tronco encefálico, grande parte dos núcleos já se encontram diferenciados e ativos poucos dias após o nascimento dos ratos (Liu & Wong-Riley, 2005). Não obstante, os receptores AMPA e cainato presentes nas células das culturas aqui estudadas se encontram ativos, sugerindo a presença de neurônios maduros nas culturas. Desta forma, a presença de receptores não-NMDA responsivos em nossas culturas e a importância do controle realizado pelos núcleos bulbares em neonatos sugere que as células em cultura utilizadas nos experimentos já estejam diferenciadas.

Receptores glutamatérgicos modulam o $\alpha 2R$

Nossos estudos mostram que a administração de glutamato elevou os níveis proteicos de $\alpha 2R$ e os receptores ionotrópicos glutamatérgicos estão provavelmente envolvidos nesta regulação. A administração de NMDA nas culturas de células também elevou os níveis de $\alpha 2R$, enquanto que nenhuma concentração de cainato induziu resposta semelhante. Contudo culturas de células tratadas com glutamato e com o antagonista de receptores não-NMDA, DNQX não mostraram um aumento no nível de proteínas do $\alpha 2R$, sugerindo que estes receptores não estão envolvidos na modulação mencionada. Nós podemos assumir a partir destes dados que, apesar dos tratamentos com cainato serem incapazes de modular o nível proteico do $\alpha 2R$, o neurotransmissor glutamato precisa estimular receptores caínicos para induzir esta modulação ou, pelo menos, que os receptores caínicos devem estar ativados para que esta modulação ocorra.

Já que os receptores NMDA requerem uma despolarização prévia da membrana plasmática (Danbolt, 2001), e sabendo que os receptores AMPA e cainato estão entre os principais receptores excitatórios no sistema nervoso central, o bloqueio deste último com DNQX poderia levar a uma ativação reduzida do receptor NMDA. Logo, é possível que os tratamentos realizados aqui com glutamato, simultâneos ao tratamento com DNQX, tenham falhado em gerar uma resposta modulatória sobre o $\alpha 2R$ devido a uma redução parcial na ativação do receptor NMDA. Nossos achados sugerem, assim, um papel importante dos receptores NMDA na modulação dos níveis proteicos do $\alpha 2R$ em cultura de células. Estes achados estão de acordo com trabalhos que indicam que receptores não-NMDA precisam ser estimulados antes que os canais associados aos receptores NMDA possam ser abertos no NTS (Bonham & Chen, 2002; Sartor & Verberne, 2007).

Os mecanismos por detrás da regulação da expressão do mRNA e proteína do $\alpha 2R$ ainda não são bem compreendidos. Estudos mostram que a

ativação excessiva destes receptores induz a sua dessensibilização e a redução de seus níveis (Collins *et al.*, 1991; Heck & Bylund, 1998). Estudos envolvendo estresse e danos aos nervos mostram que estes estímulos estão relacionados ao aumento da expressão do $\alpha 2R$ no SNC e no sistema nervoso periférico (Birder & Perl, 1999; Flugge *et al.*, 2003), mas os fatores que levam a esta modulação são desconhecidos.

Relevância da interação entre receptores glutamatérgicos e adrenérgicos

Na realização de cultura de células do bulbo, este é isolado não somente dos estímulos oriundos das vísceras, como também dos estímulos dos centros superiores. Não somente isso, as células, por perderem suas ramificações no processo de dissociação nas culturas, devem criar novos contatos com outras células. Neste processo, o papel do sistema glutamatérgico é de suma importância, uma vez que estimulações excitatórias de baixa frequência são necessárias para a geração de novas sinapses (Blankenship & Feller, 2010).

Uma das primeiras interações entre o sistema glutamatérgico e catecolaminérgico pode ser observada logo no início da formação das primeiras interações sinápticas. Levando-se em consideração que receptores glutamatérgicos estão envolvidos na formação e fortalecimento de sinapses, o sistema de regulação do sinal (signal-to-noise) através da ativação de receptores adrenérgicos (Pralong *et al.*, 2002) provavelmente atua de forma significativa no controle de formação de comunicações entre neurônios na cultura. $\alpha 2Rs$ poderiam, então, aumentar, em quantidade, em resposta ao aumento na frequência de estimulação dos receptores glutamatérgicos, como nos tratamentos realizados.

Possível influência do glutamato sobre a tirosina hidroxilase

O aumento observado dos níveis de $\alpha 2R$ pode estar relacionado com a falta de resposta observada sobre os níveis de proteína da tirosina hidroxilase, uma vez que era esperado um aumento dos níveis desta enzima após os tratamentos com glutamato (Siegel *et al.*, 2006). Todavia, a observação aqui obtida, da tendência de redução dos níveis de tirosina hidroxilase após tratamento com NMDA pode estar relacionada com a observação de que, em cultura de células corticais, a ativação de receptores NMDA antagoniza a transcrição do gene da tirosina hidroxilase, levando possivelmente às reduções de níveis proteicos (Fukuchi *et al.*, 2010). O desaparecimento da tendência após o tratamento combinado de NMDA com seu antagonista fortalece este ponto.

Influência do knockdown do receptor AT1R de angiotensina no NTS sobre o sistema catecolaminérgico

Neste estudo, nós examinamos os efeitos fisiológicos da estimulação do $\alpha 2R$ no NTS após o knockdown do AT1R neste núcleo. Nós encontramos que, em ratos previamente knockdown para o gene AT1R no NTS, a administração de clonidina reduz a frequência cardíaca quando comparada com os ratos controle.

Levando-se em consideração que, após a administração de uretano, os ratos knockdown para o receptor AT1 apresentaram frequência cardíaca mais elevada do que o grupo controle, e que a uretana pode gerar taquicardia na concentração utilizada neste trabalho (Wang, W. Z. *et al.*, 2007), é possível que o knockdown do receptor AT1R no NTS tenha elevado a sensibilidade a estímulos taquicárdicos, como os produzidos pela uretana, e a estímulos bradicárdicos, como o da injeção de clonidina no NTS. Os níveis reduzidos de AT1R poderiam ter aumentado a sensibilidade do barorreflexo (Kohn, 1997), levando a respostas taquicárdicas mais

intensas após administração da uretana, e respostas bradicárdicas acentuadas após estimulação do $\alpha 2R$ pela clonidina no NTS.

No NTS, ativação aguda do AT1R reduz a afinidade do $\alpha 2R$ para seus ligantes e também reduz a resposta vasodepressora dos $\alpha 2R$ (Fior *et al.*, 1994). Existe também evidência de que o AT1R estimule a liberação de noradrenalina (Trendelenburg *et al.*, 2003), a qual inibe a expressão do gene da tirosina hidroxilase e, por consequência, a síntese de catecolaminas (Lewis-Tuffin *et al.*, 2004). Isso faz com que a interação AT1R- $\alpha 2R$ esteja provavelmente relacionada com a regulação do barorreflexo e a síntese de catecolaminas no NTS. Levando-se isso em consideração, nós hipotetizamos que possa haver uma interação entre estes dois receptores, e que uma alteração nos níveis do AT1R poderia levar a um mecanismo compensatório sobre o sistema catecolaminérgico, tanto na população de $\alpha 2R$, quanto na sua resposta após estimulação. Nós também esperaríamos que houvesse uma redução na expressão do gene da tirosina hidroxilase, induzida pela atividade aumentada do $\alpha 2R$, dado que a indução do gene da tirosina hidroxilase ocorre por despolarização da membrana plasmática e por aumento dos níveis de adenosina monofosfato cíclico (Lewis-Tuffin *et al.*, 2004), efeitos opostos dos gerados pelo $\alpha 2R$.

Contudo, nenhuma mudança foi observada na expressão dos genes do $\alpha 2R$ ou da tirosina hidroxilase no NTS. Nós também buscamos alterações na expressão do gene codificando $\alpha 2R$, tirosina hidroxilase e AT1R no RVLM e no PVN. Apesar do knockdown do AT1R ter sido localizado no NTS, projeções diretas para o RVLM e para o PVN poderiam ter modulado a expressão desses genes e, consequentemente, o barorreflexo. Contudo, nenhuma alteração significativa foi observada. De acordo com nossos dados, ou o knockdown do AT1R no NTS não modula o $\alpha 2R$ e a enzima tirosina hidroxilase no NTS, ou mesmo o AT1R no

RVLM e no PVN, ou os efeitos modulatórios ocorrem de outra forma, como em respostas pós-translacionais.

Deve-se ressaltar também que, na região medial do NTS, há diversos astrócitos expressando o $\alpha 2R$, e estes também modulam ativamente a pressão arterial (Bhuiyan *et al.*, 2009). Como os AT1Rs se encontram predominantemente em neurônios (Shan *et al.*, 2013), é bastante provável que a ausência de modulação dos níveis de tirosina hidroxilase e do $\alpha 2r$ se deva, em parte, porque as células que possuem estes receptores não sejam as mesmas, e o *n* amostral não tenha sido suficiente para evidenciar a modulação ocorrida nos neurônios que expressam o AT1R e o $\alpha 2R$.

Ao contrário de trabalhos prévios, nós não observamos efeitos vasodepressores após injeção da clonidina no NTS, ou mesmo resposta bradicárdica em ratos normais. É possível que, devido às várias exposições do calamus scriptorius e às injeções no NTS, o bulbo dorsal poderia apresentar algum grau de inflamação. Levando-se em consideração que a inflamação no NTS induz hipertensão, independentemente da estimulação adrenérgica (Doba & Reis, 1973; Zandberg *et al.*, 1978), é possível que a falta de resposta vasodepressora, e em dois casos leve resposta vasopressora, possa ter sido causada por lesões produzidas pela micropipeta e pela própria injeção.

Comparação dos estudos *in vivo* e *in vitro*

Neste trabalho, o AT1R foi knockdown da região do NTS, reduzindo em cerca de 30% a expressão deste receptor. Esta porcentagem, apesar de inferior a observada anteriormente (Shan *et al.*, 2013), foi suficiente para que a resposta bradicárdica à clonidina fosse acentuada em relação aos ratos controle.

Após o knockdown, diferentes áreas do sistema nervoso tiveram que se adaptar à nova situação. Como o AT1R está relacionado com o controle

simpático (Arnold *et al.*, 2013), este receptor também regula a ativação de diversos outros ramos simpáticos, dentre estes o do sistema imunológico (Shan *et al.*, 2013). Apesar de o knockdown ter sido local, observa-se que os interneurônios do NTS expressaram a proteína GFP ao longo de seus neuritos até a região dorsal do bulbo, incluindo o bulbo ventrolateral (Figura 13B). Não somente isto, diversos trabalhos sugerem que a redução da atividade do sistema renina-angiotensina encefálica reduz a eficácia do barorreflexo, enquanto que o aumento de sua atividade melhora esta função (Yamazato *et al.*, 2011; Shan *et al.*, 2013).

Desta forma, os efeitos analisados são principalmente sobre o NTS knockdown para o AT1R sobre o sistema catecolaminérgico, mas em um organismo que se adaptou a uma nova realidade, na qual a sua sensibilidade ao barorreflexo foi alterada (Shan *et al.*, 2013). Estes resultados se traduzem em um modelo mais similar ao modelo real de animais que possam vir a ter menor concentração de AT1R no NTS. Contudo, neste modelo, predomina a influência do AT1R sobre o sistema catecolaminérgico do NTS, mas também há a modulação das células catecolaminérgicas pelos estímulos oriundos de centros superiores e das vísceras, assim como do ambiente.

Nos experimentos com glutamato, esta análise não poderia ser realizada devido ao grande número de receptores glutamatérgicos ativos no controle da pressão arterial. A fim de se entender como o glutamato poderia regular o $\alpha 2R$ e a tirosina hidroxilase, o primeiro passo deveria ser isolar o sistema dos estímulos superiores e viscerais. Logo após, verificar como a ativação e bloqueio de cada um dos subtipos de receptores poderia modular o sistema, conforme realizado. Contudo, este modelo perde a disposição original das células, assim como suas conexões, e a substitui por um modelo bi-dimensional, bastante diferente do que se encontra no organismo. Desta forma, este modelo, apesar de permitir um estudo livre de

influências externas, sejam estas do organismo ou do meio, é mais distante da realidade de um organismo vivo.

Considerações finais

Os achados do presente estudo sugerem a existência de uma influência modulatória glutamatérgica sobre os $\alpha 2$ R_s através de seus receptores ionotrópicos, assim como aprofunda nosso conhecimento sobre como o sistema angiotensinérgico atua sobre o catecolaminérgico no controle cardiovascular. Estes três sistemas de neurotransmissão estão envolvidos no mecanismo do controle da pressão arterial e esta inervação pode ter um papel na integração de todos estes transmissores envolvidos no controle da pressão arterial. Estes resultados podem representar uma forma de controle da pressão arterial ‘signal-to-noise’, onde um maior número de adrenoreceptores pode reduzir o sinal glutamatérgico, em uma forma de controle de longo prazo da pressão arterial. De forma similar, uma quantidade menor de AT1R pode significar em uma resposta acentuada do $\alpha 2$ R, sugerindo que uma redução do AT1R no NTS pode auxiliar no controle da pressão arterial.

Contudo, diversas questões importantes ainda precisam ser respondidas em relação à influência específica dos receptores angiotensinérgicos e glutamatérgicos e o mecanismo pelo qual o $\alpha 2$ R é modulado. Mas, como estes 3 sistemas de neurotransmissão são capazes de modular fortemente o sistema cardiovascular, e como existe a ponte entre o sistema angiotensinérgico e glutamatérgico via sistema catecolaminérgico, é possível que exista ainda mais possibilidades de interações entre receptores, inclusive glutamatérgico-angiotensinérgico, que poderiam ocorrer em níveis tanto pré- como pós-sinápticos.

Conclusão

Com base nos dados obtidos neste estudo, podemos concluir que:

1 - Em culturas de células do bulbo de ratos neonatos:

A- O glutamato é capaz de elevar os níveis proteicos dos receptores $\alpha 2$ adrenérgicos após 24 horas de tratamento.

B - A modulação dos receptores $\alpha 2$ adrenérgicos pelo glutamato é dependente dos receptores do tipo NMDA.

2 - Em animais adultos, após o knockdown do receptor AT1 de angiotensina no NTS:

A - A administração de clonidina no NTS induz bradicardia em animais com o receptor AT1 knockdown em 30%.

B - A bradicardia induzida pela clonidina no NTS de ratos knockdown não está relacionada com modulações da expressão dos genes da tirosina hidroxilase e do receptor $\alpha 2$ adrenérgico no NTS

C – A redução em 30% dos receptores de angiotensina AT1 não promoveu alterações nos níveis de expressão dos genes do receptor $\alpha 2$ adrenérgico, do receptor AT1, e da enzima tirosina hidroxilase nos núcleos estudados: núcleo do trato solitário, bulbo ventrolateral rostral e no núcleo paraventricular do hipotálamo.

A compreensão destes dados pode ser importante para a compreensão do papel do sistema catecolaminérgico no controle da pressão arterial pelo bulbo, e como os diferentes sistemas de neurotransmissão podem atuar em conjunto.

Resumo

O controle neural da pressão arterial é essencial para a manutenção da homeostase do organismo. Este controle é realizado principalmente por núcleos bulbares e hipotalâmicos. Um dos principais sistemas de neurotransmissão envolvidos no controle da pressão arterial é o catecolaminérgico. Células noradrenérgicas e adrenérgicas estão presentes em todos os centros bulbares reguladores da pressão arterial, enquanto seus receptores, principalmente o receptor α_2 adrenérgico (α_2r), estão presentes nas mesmas regiões além de estarem presentes também nos núcleos hipotalâmicos. Estes receptores, quando ativados nestes núcleos, geram respostas cardiovasculares e atuam em conjunto com outros sistemas de neurotransmissão neste controle. Dentre estes sistemas de neurotransmissão, merecem destaque os sistemas angiotensinérgico e glutamatérgico, não apenas por estarem presentes nestes núcleos, mas também por atuarem no controle da pressão arterial. Contudo, pouco se sabe sobre como o sistema catecolaminérgico interage com estes sistemas. Desta forma, estudamos neste projeto a influência do sistema glutamatérgico e angiotensinérgico sobre o sistema catecolaminérgico no bulbo de ratos. Através de culturas de células bulbares, demonstramos que a ativação de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA é capaz de elevar os níveis proteicos do α_2R e que os receptores ionotrópicos do tipo não-NMDA precisam estar desbloqueados para tal. Em ratos adultos, microinjeções repetidas inibem a resposta bradicárdica induzida pela ativação dos α_2rR no NTS. Contudo, o knockdown dos receptores AT1 de angiotensina restaura a resposta bradicárdica. A partir destes resultados, foi demonstrado que o sistema glutamatérgico é capaz de modular o sistema catecolaminérgico, enquanto o knockdown do receptor AT1 de angiotensina no NTS acentua a resposta bradicárdica dos α_2R do NTS.

Estes resultados sugerem que os sistemas de neurotransmissão bulbares interagem de diferentes formas e a compreensão deste controle pode vir a ser de grande valia para a compreensão de como se dá o controle da pressão arterial pelo sistema nervoso.

Abstract

The neural control of blood pressure is essential for the maintenance of the homeostasis of the organism. This control is performed mainly by nuclei in the medulla oblongata and in the hypothalamus. One of the main neurotransmitter system involved in this control is the catecholaminergic. Noradrenergic and adrenergic cells are present in all medullary nuclei involved in the arterial pressure regulation, while its receptors, especially the α_2 adrenoceptor, are present in the same region plus hypothalamic nuclei. These receptors, upon activation in these nuclei, generate cardiovascular response, and act with other neurotransmission systems in this control. Among these systems, the glutamatergic and angiotensinergic deserve attention not only for also being present in the same nuclei, but for also acting in the control of the arterial pressure. Both angiotensinergic and glutamatergic systems interact with the catecholaminergic system throughout the nervous system. However, little is known about how the catecholaminergic system interacts with these systems in the modulation of blood pressure. Therefore, we studied in this project the influence of the glutamatergic and angiotensinergic systems over the catecholaminergic system in the medulla oblongata of rats. Through cell cultures of the medulla oblongata, we demonstrated that the activation of glutamatergic NMDA receptors is capable of elevating the proteic levels of α_2 -adrenoceptors, and that non-NMDA receptors need to be unblocked for such. In adult rats, repeated microinjections inhibit the bradycardic response elicited by the α_2 adrenoceptors in the NTS. However, the angiotensin AT1 receptors knockdown restored the bradycardic response. Through the chronic knockout of angiotensinergic AT1 receptors in the NTS, we observed bradycardic response elicited by the activation of α_2 adrenoceptors in the NTS of the knock-down rats. These results suggest

that the medullary neurotransmission systems interact in different ways, and the comprehension of this control may be of great value for the comprehension of how the neural control of the blood pressure works.

Referências Bibliográficas

- AICHER, S. A.; MILNER, T. A.; PICKEL, V. M.; REIS, D. J. Anatomical substrates for baroreflex sympathoinhibition in the rat. **Brain Res Bull**, v. 51, n. 2, p. 107-110, 2000.
- AICHER, S. A.; SHARMA, S.; PICKEL, V. M. N-methyl-D-aspartate receptors are present in vagal afferents and their dendritic targets in the nucleus tractus solitarius. **Neuroscience**, v. 91, n. 1, p. 119-132, 1999.
- ALMEIDA, R. S.; FERRARI, M. F.; FIOR-CHADI, D. R. Quantitative autoradiography of adrenergic, neuropeptide Y and angiotensin II receptors in the nucleus tractus solitarii and hypothalamus of rats with experimental hypertension. **Gen Pharmacol**, v. 34, n. 5, p. 343-348, 2000.
- AOKI, C.; PICKEL, V. M. C-terminal tail of beta-adrenergic receptors: immunocytochemical localization within astrocytes and their relation to catecholaminergic neurons in N. tractus solitarii and area postrema. **Brain Res**, v. 571, n. 1, p. 35-49, Jan 31 1992.
- ARAS, M. A.; HARTNETT, K. A.; AIZENMAN, E. Assessment of cell viability in primary neuronal cultures. **Curr Protoc Neurosci**, v. Chapter 7, p. Unit 7 18, Jul 2008.
- ARNOLD, A. C.; GALLAGHER, P. E.; DIZ, D. I. Brain renin-angiotensin system in the nexus of hypertension and aging. **Hypertens Res**, v. 36, n. 1, p. 5-13, Jan 2013.
- ATTWELL, D. Brain uptake of glutamate: food for thought. **J Nutr**, v. 130, n. 4S Suppl, p. 1023S-5S, Apr 2000.
- BALTATU, O. C.; CAMPOS, L. A.; BADER, M. Local renin-angiotensin system and the brain--a continuous quest for knowledge. **Peptides**, v. 32, n. 5, p. 1083-6, May 2011.
- BAUDE, A.; STRUBE, C.; TELL, F.; KESSLER, J.-P. Glutamatergic neurotransmission in the nucleus tractus solitarii: Structural and functional characteristics. **J Chem Neuroanat**, v. 38, n. 3, p. 145-153, 2009.
- BAUM, T.; SHROPSHIRE, A. T. Reduction of sympathetic outflow by central administration of L-DOPA, dopamine and norepinephrine. **Neuropharmacology**, v. 12, n. 1, p. 49-56, 1973.
- BEKKERS, J. M.; STEVENS, C. F. NMDA and non-NMDA receptors are co-localized at individual excitatory synapses in cultured rat hippocampus. **Nature**, v. 341, n. 6239, p. 230-233, 1989.
- BEN-ARI, Y.; KHAZIPOV, R.; LEINEKUGEL, X.; CAILLARD, O.; GAIARSA, J. L. GABAA, NMDA and AMPA receptors: a developmentally regulated 'menage a trois'. **Trends Neurosci**, v. 20, n. 11, p. 523-9, Nov 1997.

BENARROCH, E. E. Brainstem respiratory control: substrates of respiratory failure of multiple system atrophy. **Mov Disord**, v. 22, n. 2, p. 155-61, Jan 15 2007.

BENDER, C.; RASSETTO, M.; DE OLMOS, J. S.; DE OLMOS, S.; LORENZO, A. Involvement of AMPA/kainate-excitotoxicity in MK801-induced neuronal death in the retrosplenial cortex. **Neuroscience**, v. 169, n. 2, p. 720-32, 2010.

BERTHELSEN, S.; PETTINGER, W. A. A functional basis for classification of alpha-adrenergic receptors. **Life Sci**, v. 21, n. 5, p. 595-606, Sep 1 1977.

BHARGAVA, K. P.; MISHRA, N.; TANGRI, K. K. An analysis of central adrenoceptors for control of cardiovascular function. **Br J Pharmacol**, v. 45, n. 4, p. 596-602, Aug 1972.

BHUIYAN, M. E. R.; WAKI, H.; GOURAUD, S. S.; TAKAGISHI, M.; CUI, H.; YAMAZAKI, T.; KOHSAKA, A.; MAEDA, M. Complex cardiovascular actions of alpha-adrenergic receptors expressed in the nucleus tractus solitarii of rats. **Experimental physiology**, v. 94, n. 7, p. 773-84, 2009.

BICKLER, P. E.; HANSEN, B. M. Alpha 2-adrenergic agonists reduce glutamate release and glutamate receptor-mediated calcium changes in hippocampal slices during hypoxia. **Neuropharmacology**, v. 35, n. 6, p. 679-687, 1996.

BIENKOWSKI, M. S.; RINAMAN, L. Noradrenergic inputs to the paraventricular hypothalamus contribute to hypothalamic-pituitary-adrenal axis and central Fos activation in rats after acute systemic endotoxin exposure. **Neuroscience**, v. 156, n. 4, p. 1093-102, Oct 28 2008.

BIRDER, L. A.; PERL, E. R. Expression of alpha2-adrenergic receptors in rat primary afferent neurones after peripheral nerve injury or inflammation. **J Physiol**, v. 515 (Pt 2), p. 533-42, Mar 1 1999.

BJÖKLUND, A.; HÖKFELT, T. **Handbook of Chemical Neuroanatomy**. Amsterdam: Elsevier, 1984.

BLANKENSHIP, A. G.; FELLER, M. B. Mechanisms underlying spontaneous patterned activity in developing neural circuits. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 11, n. 1, p. 18-29, Jan 2010.

BLESSING, W. W. Depressor neurons in rabbit caudal medulla act via GABA receptors in rostral medulla. **Am J Physiol**, v. 254, n. 4 Pt 2, p. H686-92, Apr 1988.

BOEHM, S.; HUCK, S. Inhibition of N-type calcium channels: the only mechanism by which presynaptic alpha 2-autoreceptors control sympathetic transmitter release. **Eur J Neurosci**, v. 8, n. 9, p. 1924-31, Sep 1996.

BONHAM, A. C.; CHEN, C.-Y. Glutamatergic neural transmission in the nucleus tractus solitarius: N-methyl-D-aspartate receptors. **Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology**, v. 29, n. 5-6, p. 497-502, 2002.

BONISCH, H.; PAULUS, G.; MARTINY-BARON, G.; LINGEN, B.; COPPENEUR, D. Molecular aspects of the neuronal noradrenaline transporter. **J Neural Transm Suppl**, v. 34, p. 11-7, 1991.

BOULTER, J.; HOLLMANN, M.; O'SHEA-GREENFIELD, A.; HARTLEY, M.; DENERIS, E.; MARON, C.; HEINEMANN, S. Molecular cloning and functional expression of glutamate receptor subunit genes. **Science**, v. 249, n. 4972, p. 1033-7, Aug 31 1990.

BYLUND, D. B.; U'PRICHARD, D. C. Characterization of alpha 1- and alpha 2-adrenergic receptors. **Int Rev Neurobiol**, v. 24, p. 343-431, 1983.

CARRETTIERO, D. C.; ALMEIDA, R. S.; FIOR-CHADI, D. R. Adenosine modulates alpha2-adrenergic receptors within specific subnuclei of the nucleus tractus solitarius in normotensive and spontaneously hypertensive rats. **Hypertension research : official journal of the Japanese Society of Hypertension**, v. 31, n. 12, p. 2177-86, 2008.

CARRETTIERO, D. C.; DA SILVA, S. M.; FIOR-CHADI, D. R. Adenosine modulates alpha2-adrenergic receptors through a phospholipase C pathway in brainstem cell culture of rats. **Auton Neurosci**, 2009.

CARRETTIERO, D. C.; FERRARI, M. F.; FIOR-CHADI, D. R. alpha2-Adrenergic receptor distribution and density within the nucleus tractus solitarii of normotensive and hypertensive rats during development. **Auton Neurosci**, v. 166, n. 1-2, p. 39-46, Jan 26 2012.

CHALMERS, J.; KAPOOR, V.; LLEWELLYN-SMITH, I.; MINSON, J.; PILOWSKY, P. Central control of blood pressure. **European heart journal**, v. 13, p. 2, 1992.

CHEN, C. J.; LIAO, S. L.; KUO, J. S. Gliotoxic action of glutamate on cultured astrocytes. **J Neurochem**, v. 75, n. 4, p. 1557-65, Oct 2000.

CHEN, L.; HUANG, L. Y. Protein kinase C reduces Mg²⁺ block of NMDA-receptor channels as a mechanism of modulation. **Nature**, v. 356, n. 6369, p. 521-3, Apr 9 1992.

COLLINGRIDGE, G. L.; KEHL, S. J.; MCLENNAN, H. Excitatory amino acids in synaptic transmission in the Schaffer collateral-commissural pathway of the rat hippocampus. **J Physiol**, v. 334, p. 33-46, Jan 1983.

COLLINS, S.; CARON, M. G.; LEFKOWITZ, R. J. Regulation of adrenergic receptor responsiveness through modulation of receptor gene expression. **Annu Rev Physiol**, v. 53, p. 497-508, 1991.

COOPER, J. R.; BLOOM, F. E.; ROTH, R. H. **The Biochemical Basis of Neuropharmacology**. Nova Iorque: Oxford Univ. Press, 1977.

COOTE, J. H. A role for the paraventricular nucleus of the hypothalamus in the autonomic control of heart and kidney. **Exp Physiol**, v. 90, n. 2, p. 169-73, Mar 2005.

COWLEY, A. W., JR. Long-term control of arterial blood pressure. **Physiol Rev**, v. 72, n. 1, p. 231-300, Jan 1992.

CULL-CANDY, S.; KELLY, L.; FARRANT, M. Regulation of Ca²⁺-permeable AMPA receptors: synaptic plasticity and beyond. **Curr Opin Neurobiol**, v. 16, n. 3, p. 288-297, 2006.

CUSSAC, D.; SCHAAK, S.; GALES, C.; FLORDELLIS, C.; DENIS, C.; PARIS, H. alpha(2B)-Adrenergic receptors activate MAPK and modulate proliferation of primary cultured proximal tubule cells. **Am J Physiol Renal Physiol**, v. 282, n. 5, p. F943-52, May 2002.

DAIKHIN, Y.; YUDKOFF, M. Compartmentation of brain glutamate metabolism in neurons and glia. **J Nutr**, v. 130, n. 4S Suppl, p. 1026S-31S, Apr 2000.

DAMPNEY, R. A. Functional organization of central pathways regulating the cardiovascular system. **Physiol Rev**, v. 74, n. 2, p. 323-64, Apr 1994.

DAMPNEY, R. A.; COLEMAN, M. J.; FONTES, M. A.; HIROOKA, Y.; HORIUCHI, J.; LI, Y. W.; POLSON, J. W.; POTTS, P. D.; TAGAWA, T. Central mechanisms underlying short- and long-term regulation of the cardiovascular system. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 29, n. 4, p. 261-8, Apr 2002.

DAMPNEY, R. A.; POLSON, J. W.; POTTS, P. D.; HIROOKA, Y.; HORIUCHI, J. Functional organization of brain pathways subserving the baroreceptor reflex: studies in conscious animals using immediate early gene expression. **Cell Mol Neurobiol**, v. 23, n. 4-5, p. 597-616, Oct 2003.

DANBOLT, N. C. Glutamate uptake. **Progress in Neurobiology**, v. 65, n. 1, p. 1-105, 2001.

DAVERN, P. J.; HEAD, G. A. Fos-related antigen immunoreactivity after acute and chronic angiotensin II-induced hypertension in the rabbit brain. **Hypertension**, v. 49, n. 5, p. 1170-7, May 2007.

DÍAZ-CABIALE, Z.; PARRADO, C.; FUXE, K.; AGNATI, L.; NARVÁEZ, J. A. Receptor-receptor interactions in central cardiovascular regulation. Focus on neuropeptide/alpha(2)-adrenoreceptor interactions in the nucleus tractus solitarius. **J Neural Transm.**, v. 114, n. 1, p. 115-125, 2007.

DINH, D. T.; FRAUMAN, A. G.; JOHNSTON, C. I.; FABIANI, M. E. Angiotensin receptors: distribution, signalling and function. **Clin Sci (Lond)**, v. 100, n. 5, p. 481-92, May 2001.

DOBA, N.; REIS, D. J. Acute fulminating neurogenic hypertension produced by brainstem lesions in the rat. **Circ Res**, v. 32, n. 5, p. 584-93, May 1973.

DONG, C. J.; GUO, Y.; AGEY, P.; WHEELER, L.; HARE, W. A. Alpha2 adrenergic modulation of NMDA receptor function as a major mechanism of RGC protection in

experimental glaucoma and retinal excitotoxicity. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 49, n. 10, p. 4515-22, Oct 2008.

FIOR-CHADI, D. R.; FUXE, K. Quantitative receptor radioautography in the study of receptor-receptor interactions in the nucleus tractus solitarii. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** v. 31, n. 2, p. 225-230, 1998.

FIOR, D. R.; YANG, S. N.; HEDLUND, P. B.; NARVAEZ, J. A.; AGNATI, L. F.; FUXE, K. Evidence for an antagonistic angiotensin II/alpha 2-adrenoceptor interaction in the nucleus tractus solitarii. **Eur J Pharmacol**, v. 262, n. 3, p. 271-282, 1994.

FLUGGE, G.; VAN KAMPEN, M.; MEYER, H.; FUCHS, E. Alpha2A and alpha2C-adrenoceptor regulation in the brain: alpha2A changes persist after chronic stress. **Eur J Neurosci**, v. 17, n. 5, p. 917-28, Mar 2003.

FORSYTHE, I. D.; WESTBROOK, G. L. Slow excitatory postsynaptic currents mediated by N-methyl-D-aspartate receptors on cultured mouse central neurones. **J Physiol**, v. 396, p. 515-33, Feb 1988.

FUKUCHI, M.; FUJII, H.; TAKACHI, H.; ICHINOSE, H.; KUWANA, Y.; TABUCHI, A.; TSUDA, M. Activation of tyrosine hydroxylase (TH) gene transcription induced by brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and its selective inhibition through Ca(2+) signals evoked via the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor. **Brain Res**, v. 1366, p. 18-26, Dec 17 2010.

FYHRQUIST, F.; SAIJONMAA, O. Renin-angiotensin system revisited. **J Intern Med**, v. 264, n. 3, p. 224-36, Sep 2008.

GLASS, M. J.; KRUZICH, P. J.; KREEK, M. J.; PICKEL, V. M. Decreased plasma membrane targeting of NMDA-NR1 receptor subunit in dendrites of medial nucleus tractus solitarius neurons in rats self-administering morphine. **Synapse**, v. 53, n. 4, p. 191-201, 2004.

GORDON, F. J. Aortic baroreceptor reflexes are mediated by NMDA receptors in caudal ventrolateral medulla. **Am J Physiol**, v. 252, n. 3 Pt 2, p. R628-33, Mar 1987.

GORDON, F. J.; SVED, A. F. Neurotransmitters in central cardiovascular regulation: glutamate and GABA. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 29, n. 5-6, p. 522-4, May-Jun 2002.

GUTHMANN, A.; HERBERT, H. Expression of N-methyl-D-aspartate receptor subunits in the rat parabrachial and Kolliker-Fuse nuclei and in selected pontomedullary brainstem nuclei. **J Comp Neurol**, v. 415, n. 4, p. 501-517, 1999.

GUYENET, P. G. The sympathetic control of blood pressure. **Nat Rev Neurosci**, v. 7, n. 5, p. 335-46, May 2006.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Textbook of medical physiology**. 11th. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2006. xxxv, 1116 p. ISBN 0721602401.

GYURKO, R.; KIMURA, B.; KURIAN, P.; CREWS, F. T.; PHILLIPS, M. I. Angiotensin II receptor subtypes play opposite roles in regulating phosphatidylinositol hydrolysis in rat skin slices. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 186, n. 1, p. 285-92, Jul 15 1992.

HAEUSLER, G. Cardiovascular regulation by central adrenergic mechanisms and its alteration by hypotensive drugs. **Circ Res**, v. 36, n. 6 Suppl 1, p. 223-32, Jun 1975.

HAYWARD, L. F.; RILEY, A. P.; FELDER, R. B. $\alpha(2)$ -Adrenergic receptors in NTS facilitate baroreflex function in adult spontaneously hypertensive rats. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 282, n. 6, p. H2336-45, Jun 2002.

HECK, D. A.; BYLUND, D. B. Differential down-regulation of α -2 adrenergic receptor subtypes. **Life Sci**, v. 62, n. 17-18, p. 1467-72, 1998.

HEIN, L. Adrenoceptors and signal transduction in neurons. **Cell Tissue Res.**, v. 326, n. 2, p. 541-551, 2006.

HOANG, C. J.; HAY, M. Expression of metabotropic glutamate receptors in nodose ganglia and the nucleus of the solitary tract. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 281, n. 1, p. H457-62, 2001.

JESKE, I.; REIS, D. J.; MILNER, T. A. Neurons in the barosensory area of the caudal ventrolateral medulla project monosynaptically on to sympathoexcitatory bulbospinal neurons in the rostral ventrolateral medulla. **Neuroscience**, v. 65, n. 2, p. 343-353, 1995.

JIMENEZ-RIVERA, C. A.; FIGUEROA, J.; VAZQUEZ-TORRES, R.; VELEZ-HERNANDEZ, M. E.; SCHWARZ, D.; VELASQUEZ-MARTINEZ, M. C.; ARENCIBIA-ALBITE, F. Presynaptic inhibition of glutamate transmission by α 2 receptors in the VTA. **Eur J Neurosci**, v. 35, n. 9, p. 1406-15, May 2012.

KAMISAKI, Y.; HAMADA, T.; MAEDA, K.; ISHIMURA, M.; ITOH, T. Presynaptic α 2 adrenoceptors inhibit glutamate release from rat spinal cord synaptosomes. **J Neurochem**, v. 60, n. 2, p. 522-6, Feb 1993.

KATSUNUMA, N.; TSUKAMOTO, K.; ITO, S.; KANMATSUSE, K. Enhanced angiotensin-mediated responses in the nucleus tractus solitarii of spontaneously hypertensive rats. **Brain Res Bull**, v. 60, n. 3, p. 209-14, May 15 2003.

KIVELL, B. M.; MCDONALD, F. J.; MILLER, J. H. Method for serum-free culture of late fetal and early postnatal rat brainstem neurons. **Brain Res Brain Res Protoc**, v. 6, n. 3, p. 91-99, 2001.

KOHN, D. F. **Anesthesia and analgesia in laboratory animals**. San Diego: Academic Press, 1997. xvii, 426 p. ISBN 0124175708 (alk. paper).

KUTSUWADA, T.; KASHIWABUCHI, N.; MORI, H.; SAKIMURA, K.; KUSHIYA, E.; ARAKI, K.; MEGURO, H.; MASAKI, H.; KUMANISHI, T.; ARAKAWA, M.; ET

AL. Molecular diversity of the NMDA receptor channel. **Nature**, v. 358, n. 6381, p. 36-41, Jul 2 1992.

LAAKE, J. H.; SLYNGSTAD, T. A.; HAUG, F. M.; OTTERSEN, O. P. Glutamine from glial cells is essential for the maintenance of the nerve terminal pool of glutamate: immunogold evidence from hippocampal slice cultures. **J Neurochem**, v. 65, n. 2, p. 871-81, Aug 1995.

LEWIS-TUFFIN, L. J.; QUINN, P. G.; CHIKARAISHI, D. M. Tyrosine hydroxylase transcription depends primarily on cAMP response element activity, regardless of the type of inducing stimulus. **Mol Cell Neurosci.**, v. 25, n. 3, p. 536-547, 2004.

LIM, A. L.; TAYLOR, D. A.; MALONE, D. T. Consequences of early life MK-801 administration: long-term behavioural effects and relevance to schizophrenia research. **Behav Brain Res**, v. 227, n. 1, p. 276-86, Feb 1 2012.

LIU, Q.; WONG-RILEY, M. T. Postnatal developmental expressions of neurotransmitters and receptors in various brain stem nuclei of rats. **J Appl Physiol**, v. 98, n. 4, p. 1442-57, Apr 2005.

MACHADO, B. H.; BONAGAMBA, L. G. Antagonism of glutamate receptors in the intermediate and caudal NTS of awake rats produced no changes in the hypertensive response to chemoreflex activation. **Auton Neurosci**, v. 117, n. 1, p. 25-32, Jan 15 2005.

MACHADO, B. H.; BRODY, M. J. Role of the nucleus ambiguus in the regulation of heart rate and arterial pressure. **Hypertension**, v. 11, n. 6 Pt 2, p. 602-607, 1988.

MADDEN, C. J.; SVED, A. F. Rostral ventrolateral medulla C1 neurons and cardiovascular regulation. **Cell Mol Neurobiol**, v. 23, n. 4-5, p. 739-49, Oct 2003.

MALENKA, R. C.; NICOLL, R. A. Long-term potentiation--a decade of progress? **Science**, v. 285, n. 5435, p. 1870-1874, 1999.

MARTINEZ-HERNANDEZ, A.; BELL, K. P.; NOREMBERG, M. D. Glutamine synthetase: glial localization in brain. **Science**, v. 195, n. 4284, p. 1356-8, Mar 25 1977.

MASSEY, P. V.; BASHIR, Z. I. Long-term depression: multiple forms and implications for brain function. **Trends Neurosci**, v. 30, n. 4, p. 176-84, Apr 2007.

MATSUMURA, K.; AVERILL, D. B.; FERRARIO, C. M. Angiotensin II acts at AT1 receptors in the nucleus of the solitary tract to attenuate the baroreceptor reflex. **Am J Physiol**, v. 275, n. 5 Pt 2, p. R1611-9, Nov 1998.

MAYER, M. L.; VYKLICKY, L., JR.; CLEMENTS, J. Regulation of NMDA receptor desensitization in mouse hippocampal neurons by glycine. **Nature**, v. 338, n. 6214, p. 425-7, Mar 30 1989.

MAYER, M. L.; WESTBROOK, G. L. The physiology of excitatory amino acids in the vertebrate central nervous system. **Prog Neurobiol**, v. 28, n. 3, p. 197-276, 1987.

MAYOROV, D. N.; HEAD, G. A. Glutamate receptors in RVLM modulate sympathetic baroreflex in conscious rabbits. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 284, n. 2, p. R511-9, Feb 2003.

MCKINLEY, M. J.; ALBISTON, A. L.; ALLEN, A. M.; MATHAI, M. L.; MAY, C. N.; MCALLEN, R. M.; OLDFIELD, B. J.; MENDELSON, F. A.; CHAI, S. Y. The brain renin-angiotensin system: location and physiological roles. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 35, n. 6, p. 901-918, 2003.

MEADE, A. J.; MELONI, B. P.; MASTAGLIA, F. L.; WATT, P. M.; KNUCKEY, N. W. AP-1 inhibitory peptides attenuate in vitro cortical neuronal cell death induced by kainic acid. **Brain Res**, v. 1360, p. 8-16, 2010.

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**, v. 29, p. 365-402, 1989.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, Dec 16 1983.

NIEWENHUYIS, R. **Chemoarchitecture of the Brain**. Berlin: Springer, 1985.

ORGANIZATION, W. H. A global brief on hypertension: silent killer, global public health crisis: World Health Day 2013. 2013.

OTTERSEN, O. P.; ZHANG, N.; WALBERG, F. Metabolic compartmentation of glutamate and glutamine: morphological evidence obtained by quantitative immunocytochemistry in rat cerebellum. **Neuroscience**, v. 46, n. 3, p. 519-534, 1992.

OZAWA, S.; KAMIYA, H.; TSUZUKI, K. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. **Prog Neurobiol**, v. 54, n. 5, p. 581-618, Apr 1998.

PANTALEO, T.; BONGIANNI, F.; MUTOLO, D. Central nervous mechanisms of cough. **Pulm Pharmacol Ther**, v. 15, n. 3, p. 227-33, 2002.

PAXINOS, G. **The Rat Nervous System**. San Diego: Academic, 1995.

PETROFF, O. A. GABA and glutamate in the human brain. **Neuroscientist**, v. 8, n. 6, p. 562-73, Dec 2002.

PHILLIPS, M. I.; SUMNERS, C. Angiotensin II in central nervous system physiology. **Regul Pept**, v. 78, n. 1-3, p. 1-11, 1998.

PRALONG, E.; MAGISTRETTI, P.; STOOP, R. Cellular perspectives on the glutamate-monoamine interactions in limbic lobe structures and their relevance for some psychiatric disorders. **Prog Neurobiol**, v. 67, n. 3, p. 173-202, 2002.

RAASCH, W.; DOMINIAK, P.; ZIEGLER, A.; DENDORFER, A. Reduction of vascular noradrenaline sensitivity by AT1 antagonists depends on functional sympathetic innervation. **Hypertension**, v. 44, n. 3, p. 346-51, Sep 2004.

RAYMOND, L. A.; BLACKSTONE, C. D.; HUGANIR, R. L. Phosphorylation of amino acid neurotransmitter receptors in synaptic plasticity. **Trends Neurosci**, v. 16, n. 4, p. 147-53, Apr 1993.

ROH, D. H.; SEO, H. S.; YOON, S. Y.; SONG, S.; HAN, H. J.; BEITZ, A. J.; LEE, J. H. Activation of spinal alpha-2 adrenoceptors, but not mu-opioid receptors, reduces the intrathecal N-methyl-D-aspartate-induced increase in spinal NR1 subunit phosphorylation and nociceptive behaviors in the rat. **Anesth Analg**, v. 110, n. 2, p. 622-9, Feb 1 2010.

SANSOM, M. S.; USHERWOOD, P. N. Single-channel studies of glutamate receptors. **Int Rev Neurobiol**, v. 32, p. 51-106, 1990.

SARICHELOU, I.; CAPPuccio, I.; FERRANTI, F.; MOSILLO, P.; CICERONI, C.; SALE, P.; STOCCHI, F.; BATTAGLIA, G.; NICOLETTI, F.; MELCHIORRI, D. Metabotropic glutamate receptors regulate differentiation of embryonic stem cells into GABAergic neurons. **Cell Death Differ**, v. 15, n. 4, p. 700-7, Apr 2008.

SARTOR, D. M.; VERBERNE, A. J. The role of NMDA and non-NMDA receptors in the NTS in mediating three distinct sympathoinhibitory reflexes. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, v. 376, n. 4, p. 241-52, Dec 2007.

SATO, K.; KIYAMA, H.; TOHYAMA, M. The differential expression patterns of messenger RNAs encoding non-N-methyl-D-aspartate glutamate receptor subunits (GluR1-4) in the rat brain. **Neuroscience**, v. 52, n. 3, p. 515-539, 1993.

SCHOEPP, D.; BOCKAERT, J.; SLADCEK, F. Pharmacological and functional characteristics of metabotropic excitatory amino acid receptors. **Trends Pharmacol Sci**, v. 11, n. 12, p. 508-15, Dec 1990.

SHAN, Z.; ZUBCEVIC, J.; SHI, P.; JUN, J. Y.; DONG, Y.; MURÇA, T. M.; LAMONT, G. J.; CUADRA, A.; YUAN, W.; QI, Y.; LI, Q.; PATON, J. F. R.; KATOVICH, M. J.; SUMNERS, C.; RAIZADA, M. K. Chronic Knockdown of the Nucleus of the Solitary Tract AT1 Receptors Increases Blood Inflammatory-Endothelial Progenitor Cell Ratio and Exacerbates Hypertension in the Spontaneously Hypertensive Rat. **Hypertension**, 2013.

SIEGEL, G.; ALBERS, R.; BRADY, S.; PRICE, D. **Basic neurochemistry: molecular, cellular, and medical aspects**. Academic Press, 2006.

SONG, K.; ALLEN, A. M.; PAXINOS, G.; MENDELSON, F. A. Mapping of angiotensin II receptor subtype heterogeneity in rat brain. **J Comp Neurol**, v. 316, n. 4, p. 467-84, Feb 22 1992.

SPYER, K. M.; LOEWY, A. D. Vagal Preganglionic Neurons. In: AD, L. e KM, S. (Ed.). **Central Regulation of Autonomic Functions**. Oxford: Oxford Publicity Press, 1990.

STORNETTA, R. L. Neurochemistry of bulbospinal presympathetic neurons of the medulla oblongata. **J Chem Neuroanat**, v. 38, n. 3, p. 222-230, 2009.

STORNETTA, R. L.; SEVIGNY, C. P.; GUYENET, P. G. Vesicular glutamate transporter DNPI/VGLUT2 mRNA is present in C1 and several other groups of brainstem catecholaminergic neurons. **J Comp Neurol**, v. 444, n. 3, p. 191-206, Mar 2002.

SVED, A. F.; TSUKAMOTO, K.; SCHREIHOFFER, A. M. Stimulation of alpha 2-adrenergic receptors in nucleus tractus solitarius is required for the baroreceptor reflex. **Brain Res**, v. 576, n. 2, p. 297-303, Apr 3 1992.

TALAIA, C.; QUEIROZ, G.; PINHEIRO, H.; MOURA, D.; GONCALVES, J. Involvement of G-protein betagamma subunits on the influence of inhibitory alpha2-autoreceptors on the angiotensin AT1-receptor modulation of noradrenaline release in the rat vas deferens. **Neurochem Int**, v. 49, n. 7, p. 698-707, Dec 2006.

TALMAN, W. T.; PERRONE, M. H.; REIS, D. J. Evidence for L-glutamate as the neurotransmitter of baroreceptor afferent nerve fibers. **Science (New York, N.Y.)**, v. 209, n. 4458, p. 813-815, 1980.

TAPIERO, H.; MATHE, G.; COUVREUR, P.; TEW, K. D. II. Glutamine and glutamate. **Biomed Pharmacother**, v. 56, n. 9, p. 446-57, Nov 2002.

TESCHEMACHER, A. G.; WANG, S.; RAIZADA, M. K.; PATON, J. F.; KASPAROV, S. Area-specific differences in transmitter release in central catecholaminergic neurons of spontaneously hypertensive rats. **Hypertension**, v. 52, n. 2, p. 351-8, Aug 2008.

TRACHTE, G. J.; STEIN, E.; PEACH, M. J. Alpha adrenergic receptors mediate angiotensin-induced prostaglandin production in the rabbit isolated vas deferens. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 240, n. 2, p. 433-40, Feb 1987.

TRENDELENBURG, A. U.; MEYER, A.; KLEBROFF, W.; GUIMARAES, S.; STARKE, K. Crosstalk between presynaptic angiotensin receptors, bradykinin receptors and alpha 2-autoreceptors in sympathetic neurons: a study in alpha 2-adrenoceptor-deficient mice. **Br J Pharmacol**, v. 138, n. 8, p. 1389-402, Apr 2003.

TSUDA, K. Renin-Angiotensin system and sympathetic neurotransmitter release in the central nervous system of hypertension. **Int J Hypertens**, v. 2012, p. 474870, 2012.

TSUKAMOTO, K.; ITO, S.; KATSUNUMA, N.; HIRATSUKA, M.; MASUBUCHI, Y.; KANAI, T.; KAWABE, T.; YAJIMA, Y.; KANMATSUSE, K. Effect of phenylephrine injected into the nucleus tractus solitarius of Sprague-Dawley rats and spontaneously hypertensive rats. **Brain Res Bull**, v. 58, n. 4, p. 351-6, Aug 15 2002.

TUNG, C. S.; GOLDBERG, M. R.; HOLLISTER, A. S.; ROBERTSON, D. Both alpha- and beta-adrenoreceptors contribute to the central depressor effect of catecholamines. **Brain Res**, v. 456, n. 1, p. 64-70, Jul 19 1988.

VAN DEN BERG, C. J.; GARFINKEL, D. A stimulation study of brain compartments. Metabolism of glutamate and related substances in mouse brain. **Biochem J**, v. 123, n. 2, p. 211-8, Jun 1971.

VAN GIERSBERGEN, P. L.; PALKOVITS, M.; DE JONG, W. Involvement of neurotransmitters in the nucleus tractus solitarii in cardiovascular regulation. **Physiol Rev**, v. 72, n. 3, p. 789-824, Jul 1992.

VELASCO, I.; VELASCO-VELÁZQUEZ, M. A.; SALAZAR, P.; LAJUD, N.; TAPIA, R. Influence of serum-free medium on the expression of glutamate transporters and the susceptibility to glutamate toxicity in cultured cortical neurons. **Journal of neuroscience research**, v. 71, n. 6, p. 811-8, 2003.

WANG, L.-G.; ZENG, J.; YUAN, W.-J.; SU, D.-F.; WANG, W.-Z. Comparative study of NMDA and AMPA/kainate receptors involved in cardiovascular inhibition produced by imidazoline-like drugs in anaesthetized rats. **Experimental physiology**, v. 92, n. 5, p. 849-58, 2007.

WANG, W. Z.; GAO, L.; PAN, Y. X.; ZUCKER, I. H.; WANG, W. AT1 receptors in the nucleus tractus solitarii mediate the interaction between the baroreflex and the cardiac sympathetic afferent reflex in anesthetized rats. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 292, n. 3, p. R1137-45, Mar 2007.

WATKINS, J. C.; KROGSGAARD-LARSEN, P.; HONORE, T. Structure-activity relationships in the development of excitatory amino acid receptor agonists and competitive antagonists. **Trends Pharmacol Sci**, v. 11, n. 1, p. 25-33, Jan 1990.

YAMAZATO, M.; FERREIRA, A. J.; YAMAZATO, Y.; DIEZ-FREIRE, C.; YUAN, L.; GILLIES, R.; RAIZADA, M. K. Gene transfer of angiotensin-converting enzyme 2 in the nucleus tractus solitarius improves baroreceptor heart rate reflex in spontaneously hypertensive rats. **J Renin Angiotensin Aldosterone Syst**, v. 12, n. 4, p. 456-61, Dec 2011.

YANG, C. H.; SHYR, M. H.; TAN, P. P.; CHAN, S. H. Participation of AT1 and AT2 receptors in the differential interaction between angiotensin II or III and alpha-2 adrenoceptors in the nucleus reticularis gigantocellularis in cardiovascular regulation and antinociception in rats. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 279, n. 2, p. 795-802, Nov 1996.

YOUNG, A. B.; FAGG, G. E. Excitatory amino acid receptors in the brain: membrane binding and receptor autoradiographic approaches. **Trends Pharmacol Sci**, v. 11, n. 3, p. 126-33, Mar 1990.

YOUNG, W. S., 3RD; KUCHAR, M. J. Noradrenergic alpha 1 and alpha 2 receptors: autoradiographic visualization. **Eur J Pharmacol**, v. 59, n. 3-4, p. 317-9, Nov 16 1979.

ZANDBERG, P.; PALKOVITS, M.; DE JONG, W. Effect of various lesions in the nucleus tractus solitarii of the rat on blood pressure, heart rate and cardiovascular reflex responses. **Clin Exp Hypertens**, v. 1, n. 3, p. 355-79, 1978.

ZEC, N.; KINNEY, H. C. Anatomic relationships of the human nucleus of the solitary tract in the medulla oblongata: a DiI labeling study. **Auton Neurosci**, v. 105, n. 2, p. 131-44, May 30 2003.