

Sergio Marinho da Silva

Ação modulatória do glutamato sobre o sistema  
catecolaminérgico em cultura de células do  
bulbo de ratos neonatos

Modulatory action of glutamate over the  
catecholaminergic system in cell cultures of the  
medulla oblongata of newborn rats

São Paulo

2010

Sergio Marinho da Silva

Ação modulatória do glutamato sobre o sistema  
catecolaminérgico em cultura de células do  
bulbo de ratos neonatos

Modulatory action of glutamate over the  
catecholaminergic system in cell culture of the  
medulla oblongata of newborn rats

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

Orientadora: Débora Rejane Fior-  
Chadi

São Paulo

2010

# Ficha Catalográfica

---

S 586a Silva, Sergio Marinho da  
Ação modulatória do glutamato sobre o sistema catecolaminérgico em cultura de células do bulbo de ratos neonatos / Sergio Marinho da Silva. -- São Paulo : S.M.S., 2010  
82p. : il.

Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Fisiologia, 2010.

1. Transmissão nervosa 2. Neurobiologia. 3. Glutamato. 4. Catecolaminas I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Fisiologia.

QP364.5

Nome: Silva, Sergio Marinho da

Título: Ação modulatória do glutamato sobre o sistema catecolaminérgico em cultura de células do bulbo de ratos neonatos

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Comissão Julgadora:

---

Prof(a). Dr(a).

---

Prof(a). Dr(a).

---

Prof(a). Dr.(a).

Orientador(a)

## Dedicatória

---

Seus pais... os deuses... tantos outros...  
Você poderia passar o resto de sua vida  
Tentando retornar todos os favores que você deve  
E ainda não seria tempo o suficiente  
(Inoue Takehiko)

## Agradecimentos

---

À Dra. Débora Rejane Fior-Chadi pela oportunidade de realizar este projeto de mestrado, assim como pelos ensinamentos e pelo apoio.

Ao Dr. Daniel Carneiro Carrettiero e à Dra. Merari de Fátima Ramires Ferrari pelos ensinamentos, pelas ajudas e por terem comparecido sempre quando mais precisei. A vocês, meu muito obrigado.

Aos meus colegas e amigos: Andreas, Daniela, João Paulo, Karen, Maísa, Murilo e Paulo, pelo apoio tanto nas horas de trabalho quanto estudo e lazer.

À Dra. Luciente Covolan, ao Dr. Luiz Roberto Giorgetti de Britto e ao Dr. Gerson Chadi pelo empréstimo de materiais. Sem a contribuição de vocês, este projeto não poderia ter sido desenvolvido.

A todos aqueles que me apoiaram mesmo sem estarem diretamente envolvidos no projeto. Meu muito obrigado a toda minha família, à minha namorada Heloíse, aos meus grandes amigos sempre presentes e àqueles que apenas puderam estar comigo por um curto intervalo de tempo.

À FAPESP pelo apoio financeiro.

## Epígrafe

---



See everything in its entirety...effortlessly. That is what it means to truly "see"

(Inoue Takehiko)

## Resumo:

Encontramos no bulbo diversos núcleos, assim como diversos neurotransmissores, relacionados com a manutenção da pressão arterial. Dentre os núcleos, o núcleo do trato solitário se destaca por ser um dos principais moduladores do sistema nervoso autônomo, sendo o primeiro a receber aferências dos barorreceptores e encaminhá-los para diversos outros núcleos. Dentre estes neurotransmissores, encontramos o glutamato e as catecolaminas, sendo ambos essenciais para a manutenção da pressão arterial. É sabido que a atuação de transmissores em células do sistema nervoso pode levar a alterações em outras vias de neurotransmissão, alterando assim a resposta das células a estímulos. Levando em consideração a importância do glutamato e das catecolaminas na modulação da pressão arterial, e que tanto os receptores glutamatérgicos quanto catecolaminérgicos podem interferir no metabolismo celular e gerar mudanças estruturais nos neurônios, cogitamos que a atuação do sistema glutamatérgico poderia modular o sistema catecolaminérgico. Neste trabalho, avaliamos se o sistema glutamatérgico e catecolaminérgico podem interagir em culturas de células do bulbo de ratos neonatos, a partir de tratamentos das culturas com glutamato ou noradrenalina. Observamos que o tratamento destas culturas com glutamato leva a uma redução nos níveis de proteína e de mRNA da enzima tirosina hidroxilase e do receptor  $\alpha_2$  adrenérgico. A modulação do sistema glutamatérgico a partir de tratamentos com noradrenalina não mostrou variações significativas. Concluímos que o sistema glutamatérgico pode modular o sistema catecolaminérgico em células do bulbo de ratos neonatos, e que esta modulação pode ser importante na regulação da pressão arterial pelos núcleos bulbares.

Palavras-chave: Transmissão nervosa. Neurobiologia. Glutamato. Catecolaminas



## Abstract

It is found in the medulla oblongata several nuclei, as well as several neurotransmitters, related with the maintenance of the arterial pressure. Among these nuclei, the nucleus of the solitary tract stands aside for being one of the main modulators of the autonomic nervous system, being the first to receive afferences from baroreceptors and to send their stimuli to other nuclei. Among these neurotransmitters, glutamate and the catecholamines are both essentials to the maintenance of the arterial pressure. It is known that the stimulation of brain cells by neurotransmitters can result in changes in other neurotransmitter pathways, changing the cell response to certain stimuli. Taking in consideration the importance of glutamate and the catecholamines in the modulation of the arterial pressure, and that both of them can interfere in the cellular metabolism and create structural changes in neurons, we have speculated that the stimulation of the glutamatergic system could modulate the catecholaminergic system. In this work, it was evaluated if the glutamatergic and catecholaminergic systems could interact in cell cultures of the medulla oblongata of newborn rats, from treatments of the cultures with glutamate or noradrenaline. It was found that the treatment of these cultures with glutamate leads to a reduction in the protein and mRNA levels of the enzyme tyrosine hydroxylase and the receptor  $\alpha_2$  adrenergic. The modulation of the glutamatergic system from treatments with noradrenaline did not show significative variation. We concluded that the glutamatergic system can modulate the catecholaminergic system in medulla oblongata cell cultures, and that this modulation can be important in the regulation of the arterial pressure by nuclei present in the medulla oblongata.

Keywords: Nervous transmission. Neurobiology. Glutamate. Catecholamines

## Lista de Tabelas

<b>TABELA 1</b> – Descrição do protocolo a ser utilizado para o preparo das amostras que foram submetidas à análise por PCR em tempo real. ....	39
<b>TABELA 2</b> – Número total de células e de neurônios em cultura de células do bulbo de ratos Wistar após o período de 7 dias. ....	42
<b>TABELA 3</b> – Densidade óptica relativa em unidade arbitrária (u.a.), em porcentagem, do receptor $\alpha 2$ adrenérgico em cultura de células do bulbo de ratos neonatos após tratamento com glutamato por 24 horas, nas concentrações de 0,1, 1, 10 ou 100 $\mu$ M....	49
<b>TABELA 4</b> – Variação na expressão do mRNA do receptor $\alpha 2$ adrenérgico em cultura de células do bulbo de ratos neonatos após tratamento com glutamato por 12 e 24 horas, na concentração de 10 $\mu$ M. ....	50
<b>TABELA 5</b> – Densidade óptica relativa em unidade arbitrária (u.a.), em porcentagem, da enzima tirosina hidroxilase, em cultura de células do bulbo de ratos neonatos após tratamento com glutamato por 24 horas, nas concentrações de 0,1, 1, 10 ou 100 $\mu$ M....	51
<b>TABELA 6</b> – Variação na expressão do mRNA da enzima tirosina hidroxilase em cultura de células do bulbo de ratos neonatos após tratamento com glutamato por 12 e 24 horas, na concentração de 10 $\mu$ M .....	52
<b>TABELA 7</b> – Densidade óptica relativa em unidade arbitrária (u.a.), em porcentagem, do receptor $\alpha 2$ adrenérgico, em cultura de células do bulbo de ratos neonatos após tratamento por 24 horas com 10 $\mu$ M de glutamato, 10 $\mu$ M de NMDA, 5 $\mu$ M de MK801, 10 $\mu$ M de glutamato com 5 $\mu$ M de MK801 e 10 $\mu$ M de NMDA com 5 $\mu$ M de MK801....	53
<b>TABELA 8</b> - Densidade óptica relativa em unidade arbitrária (u.a.), em porcentagem, do receptor NMDA NR1, em cultura de células do bulbo de ratos neonatos após tratamento com noradrenalina por 24 horas, nas concentrações de 0,1, 1, 10 ou 100 $\mu$ M. ....	56

## Lista de figuras

<b>FIGURA 1</b> - Esquema ilustrativo do barorreflexo..	17
<b>FIGURA 2</b> – Número total de células e de neurônios por mm <sup>2</sup> em culturas de células do bulbo.	42
<b>FIGURA 3</b> – Imagens de imunofluorescência de cultura de células do bulbo de ratos neonatos por 7 dias.	43
<b>FIGURA 4</b> – Imagem de imunofluorescência de astrócitos e núcleos celulares, obtidas de cultura de células do bulbo de ratos neonatos, após 7 dias (A) e após 3 dias (B).	44
<b>FIGURA 5</b> – Fotografia da cultura de células do bulbo de ratos neonatos tratadas com glutamato e trypan blue..	46
<b>FIGURA 6</b> – Densidade óptica relativa em porcentagem (%) da marcação referente ao receptor $\alpha 2$ adrenérgico em cultura do bulbo de ratos Wistar, a partir da técnica de Western Blotting.	49
<b>FIGURA 7</b> – Variação na expressão do mRNA do receptor $\alpha 2$ adrenérgico em cultura de células do bulbo de ratos Wistar após tratamento com glutamato (10 $\mu$ M) durante 12 e 24 horas.	50
<b>FIGURA 8</b> – Densidade óptica relativa em porcentagem (%) da marcação referente à enzima tirosina hidroxilase em cultura do bulbo de ratos Wistar, a partir da técnica de Western Blotting. Resultados obtidos após tratamento com 0,1; 1; 10 e 100 $\mu$ M de glutamato por 24 horas.	51
<b>FIGURA 9</b> – Variação na expressão do mRNA da enzima tirosina hidroxilase em cultura de células do bulbo de ratos Wistar após tratamento com glutamato (10 $\mu$ M) durante 12 e 24 horas.	52
<b>FIGURA 10</b> – Densidade óptica relativa em porcentagem (%) da marcação referente ao receptor $\alpha 2$ adrenérgico em cultura do bulbo de ratos Wistar, a partir da técnica de Western Blotting. Resultados obtidos após tratamento com 10 $\mu$ M de glutamato, 10 $\mu$ M de NMDA, 5 $\mu$ M do antagonista de receptores NMDA MK801, 10 $\mu$ M de glutamato junto com 5 $\mu$ M de MK801 e 10 $\mu$ M de NMDA com 5 $\mu$ M de MK801, por 24 horas.	54
<b>FIGURA 11</b> - Densidade óptica relativa em porcentagem (%) da marcação referente ao receptor NMDA NR1 em cultura do bulbo de ratos Wistar, a partir da técnica de Western Blotting. Resultados obtidos após tratamento com 0,1; 5; 10 e 100 $\mu$ M de noradrenalina por 24 horas	56

## Lista de abreviações

AMPA – ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propionato, agonista de receptor

AMPA

ANOVA – análise de variância

cAMP – adenosina monofosfato cíclico, ou AMP cíclico

cDNA – ácido desoxirribonucléico complementar, DNA obtido a partir do mRNA

DAPI – 4',6 - diamidino-2-fenilindol

DEPC – dietil pirocarbonato

DNA – ácido desoxirribonucléico

DP – desvio padrão

LTD – depressão de longo prazo

LTP – potenciação de longo prazo

mGluR – receptor de glutamato metabotrópico

mRNA – ácido ribonucléico mensageiro ou RNA mensageiro

NMDA – ácido N- Metil-D-Aspartato, agonista de receptor NMDA

RNA – ácido ribonucléico

RNAse – ribonuclease, enzima que catalisa a degradação de RNA

RT-PCR – reação de polimerização em cadeia para a transcriptase reversa

# Sumário

---

<b>1 - Introdução.....</b>	<b>15</b>
1.1 - <i>Controle da pressão arterial pelo sistema nervoso.....</i>	15
1.2 - <i>Neurotransmissores atuantes na modulação da pressão arterial.....</i>	18
1.2.1 - <i>Glutamato .....</i>	19
1.2.2 - <i>Catecolaminas.....</i>	23
1.3 - <i>Interação entre sistemas de neurotransmissão.....</i>	26
1.4 - <i>Estudos em organismos vivos e em culturas de células .....</i>	27
1.5 - <i>Importância da interação entre vias de neurotransmissão.....</i>	28
<b>2 - Objetivos.....</b>	<b>30</b>
<b>3 - Material e Métodos.....</b>	<b>31</b>
3.1 - <i>Cultura de células.....</i>	31
3.2 - <i>Tratamentos.....</i>	32
3.3 - <i>Análise da toxicidade do glutamato.....</i>	33
3.4 - <i>Imunofluorescência .....</i>	33
3.5 - <i>Western Blotting.....</i>	34
3.6 - <i>Análise da expressão de mRNA.....</i>	36
3.6.1 - <i>Extração e Quantificação de RNA.....</i>	36
3.6.2 - <i>RT-PCR em Tempo Real.....</i>	38
3.7 - <i>Análise dos dados .....</i>	40
<b>4 - Resultados.....</b>	<b>41</b>
4.1 - <i>Análise das culturas de células.....</i>	41
4.2 - <i>Análise da toxicidade do glutamato.....</i>	45
4.3 - <i>Influência do glutamato sobre o sistema catecolaminérgico .....</i>	47
4.4 - <i>Influência da noradrenalina sobre o receptor NMDA .....</i>	55
<b>5 - Discussão .....</b>	<b>57</b>
5.1 - <i>Análise do tratamento sobre neurônios e astrócitos .....</i>	57
5.2 - <i>Interação entre sistemas de neurotransmissão .....</i>	61
5.2 .1 - <i>Receptores NMDA, modulação da força sináptica e ativação de mensageiros secundários.....</i>	62
5.2 .2 - <i>Influência do glutamato sobre a enzima tirosina hidroxilase .....</i>	64
5.2 .3 - <i>Influência do glutamato sobre o receptor <math>\alpha</math>2 adrenérgico.....</i>	65
5.3 - <i>Interação entre transmissores e modulação da pressão arterial.....</i>	66
<b>6 - Conclusão.....</b>	<b>69</b>
<b>7 - Referências:.....</b>	<b>70</b>

# 1 - Introdução

## 1.1 - Controle da pressão arterial pelo sistema nervoso

Neurônios da região caudal inferior do tronco encefálico, compreendendo o bulbo e a ponte, são críticos para a regulação tônica e reflexa da pressão arterial sistêmica. Estes neurônios são importantes por manter níveis normais de repouso da pressão arterial (Alexander, 1946; Kumada *et al.*, 1979; Dampney, 1981) e por serem o sítio de terminação das aferências de barorreceptores, quimiorreceptores e receptores cardiopulmonares (Miura; Reis, 1969; Kalia; Mesulam, 1980; Kalia, 1981; Spyer, 1981).

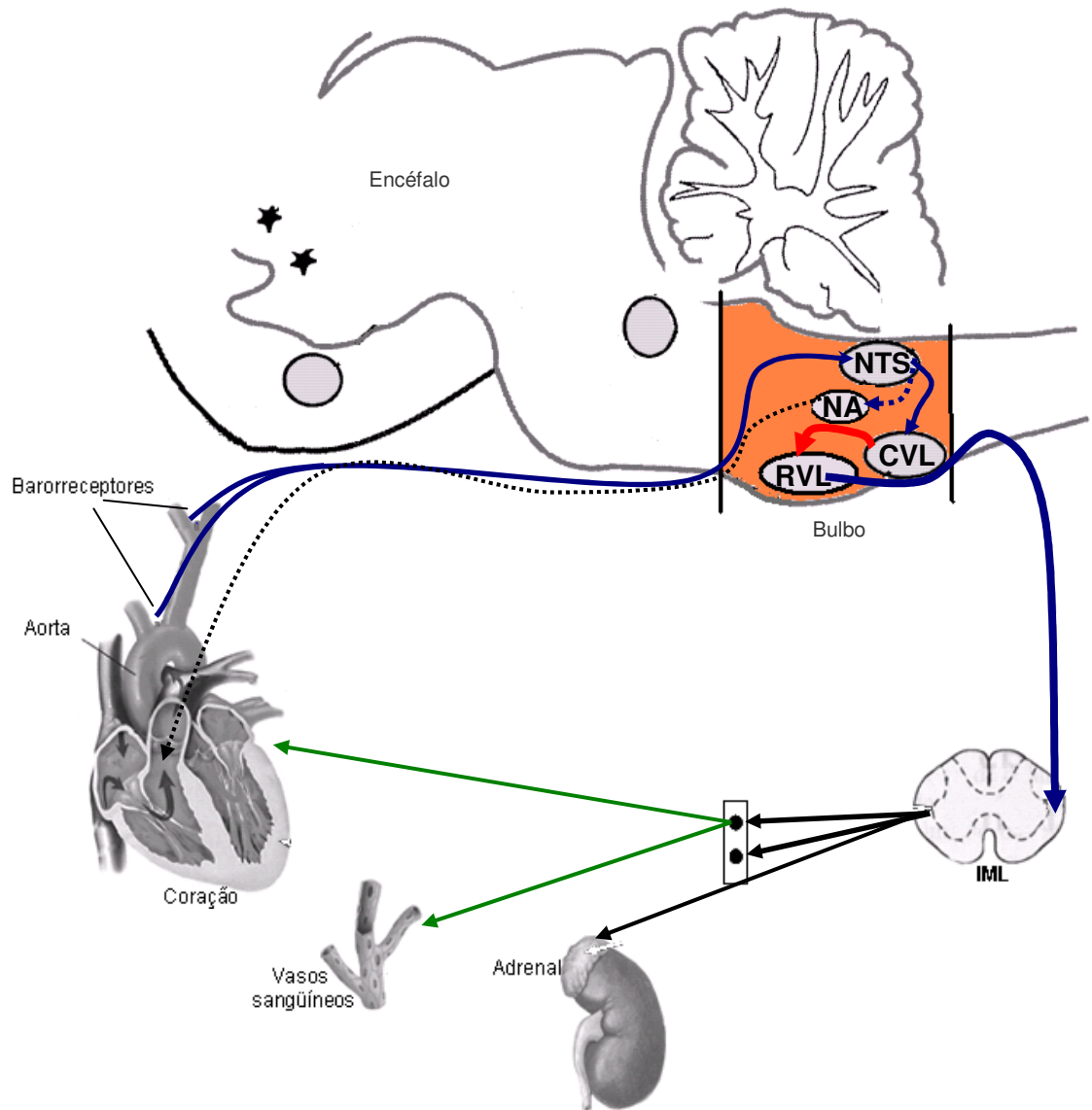
Na região dorso-medial do bulbo, encontra-se um núcleo importante para a regulação do sistema nervoso autônomo, o núcleo do trato solitário (Van Giersbergen *et al.*, 1992). Este núcleo recebe aferências primárias que derivam de diversos receptores viscerais, dentre eles barorreceptores, receptores cardiopulmonares, viscerais, hepáticos e pancreáticos e quimiorreceptores, através dos nervos vago e glossofaríngeo (Mifflin *et al.*, 1988; Andresen; Kunze, 1994), além de aferências de centros superiores do encéfalo (Van Der Kooy *et al.*, 1984) e de aferências somáticas (Potts, 2006), sendo assim um dos principais controladores das atividades viscerais.

A participação do núcleo do trato solitário ocorre de diversas maneiras. O controle de atuação mais rápida e significativa se dá pelo barorreflexo. O principal propósito do barorreflexo é prover estabilização rápida e eficiente da pressão arterial através de sensores estrategicamente localizados que são sensíveis a variações da pressão arterial e são conhecidos como barorreceptores arteriais. Estes receptores, cujas terminações se localizam primariamente na adventícia do seio carotídeo e do arco

aórtico, possuem o seu soma localizado respectivamente nos gânglios petroso e nodoso, e são inervados pelos nervos cranianos glossofaríngeo (IX) e vago (X) (Spyer, 1981).

O aumento da pressão arterial promove um estiramento dos barorreceptores. Estes enviam estímulos excitatórios, através principalmente da liberação de glutamato (Talman *et al.*, 1980) para neurônios de segunda ordem do núcleo do trato solitário. Estes neurônios de segunda-ordem se projetam para o bulbo ventrolateral caudal, onde eles fazem sinapse excitatórias, usando para isso, dentre outros neurotransmissores, o glutamato (Gordon, 1987). Os neurônios do bulbo ventrolateral caudal, por sua vez, enviam estímulos inibitórios, através do neurotransmissor GABA, para neurônios simpatoexcitatórios localizados no bulbo ventrolateral rostral (Blessing, 1988; Jeske *et al.*, 1995) (FIGURA 1). Em paralelo, neurônios de segunda ordem do núcleo do trato solitário mantêm uma influência excitatória direta, através do glutamato, sobre neurônios pré-ganglionares parassimpáticos localizados principalmente no núcleo ambíguo (Machado; Brody, 1988). Logo, barorreceptores arteriais 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).

O aumento da pressão arterial, desta forma, leva a redução do tônus simpático e aumento do tônus vagal, resultando em redução na contração dos vasos sanguíneos, na liberação de catecolaminas pelas glândulas supra-renais, na redução da força de contração do coração e em bradicardia. A redução da pressão arterial, por outro lado, leva a um aumento do tônus simpático e redução do tônus vagal, resultando em repostas opostas ao aumento da pressão (Sagawa, 1983).



**FIGURA 1** - Esquema ilustrativo do barorreflexo. Corte longitudinal do bulbo de rato ilustrando o bulbo (laranja), os núcleos envolvidos no controle reflexo da pressão arterial e as projeções modulatórias do sistema nervoso autônomo simpático (linha contínua) e parassimpático (linha tracejada). A explicação detalhada se encontra no texto. Abreviaturas: CVL: bulbo ventrolateral caudal; IML: coluna intermediolateral da medula espinhal; NTS: núcleo do trato solitário; RVL: bulbo ventrolateral rostral. Setas azuis: aferências glutamatérgicas; setas vermelhas: aferências GABAérgicas; setas pretas: eferências colinérgicas; setas verdes: eferências noradrenérgicas. Imagem adaptada de Dampney *et al.*, 2002.



Outras vias reflexas estão relacionadas com a manutenção da pressão arterial, mas de modo menos significativo que o barorreflexo. Dentre elas, encontramos o reflexo quimiorreceptor, que também promove ajustes na função cardiovascular, além de ajustes na ventilação, como uma tentativa de manter perfusão adequada aos órgãos vitais. (Housley; Sinclair, 1988; Mifflin, 1992).

As respostas enviadas pelos barorreceptores são integradas não apenas em níveis bulbares, mas também envolvem a participação de estruturas mais altas dentro do sistema nervoso, tais como o hipotálamo, que contém importantes áreas responsáveis pela integração de funções vegetativas e comportamentais. Entre os centros modulatórios do hipotálamo, o núcleo supraóptico e paraventricular são áreas de grande importância para o controle autonômico e neuroendócrino. O núcleo supraóptico do hipotálamo contém neurônios vasopressinérgicos e ocitocinérgicos que sintetizam e liberam estes transmissores no sangue via neurohipófise. Neurônios do núcleo paraventricular do hipotálamo se projetam para núcleos encefálicos (núcleo do trato solitário, núcleo motor dorsal do vago, núcleo ambíguo, bulbo ventrolateral) e para as células da coluna intermediolateral da medula espinal, estando envolvidos no controle autonômico da circulação (Buijs *et al.*, 1978; Nilaver *et al.*, 1980; Sawchenko; Swanson, 1982).

## **1.2 - Neurotransmissores atuantes na modulação da pressão arterial**

A modulação neural da pressão arterial ocorre não somente pela interação entre diversos núcleos, mas também pela ativação de diversas vias de neurotransmissores. Não somente os neurotransmissores induzem respostas distintas de acordo com os neurônios em que atuam e com os receptores que são ativados, mas também as vias de

neurotransmissores podem interagir entre si, gerando respostas, intracelulares e sistêmicas, ainda mais complexas.

O núcleo do trato solitário é o núcleo que mostra maior complexidade em mediar suas funções. Foram encontrados nele mais de 30 transmissores (e seus respectivos receptores na maior parte dos casos), em concentrações relativamente altas, a maioria destes influenciando a modulação da pressão arterial (Van Giersbergen *et al.*, 1992).

Dentre os neurotransmissores e receptores relacionados com a modulação da pressão arterial, encontramos o glutamato, presente tanto na via do barorreflexo quanto nas vias do quimiorreflexo e reflexo cardiopulmonar (Machado, Mauad, Chianca Junior *et al.*, 1997). Observamos também que diversos neurônios participantes do controle barorreflexo são encontrados em centros catecolaminérgicos bulbares, e a atividade destes neurônios é alterada mediante estimulações do barorreflexo (Blessing *et al.*, 1986; Dampney *et al.*, 2003). Estas duas vias de neurotransmissão possuem não só papel chave na regulação da pressão arterial, mas em diversas outras vias neuronais.

### **1.2.1 - Glutamato**

O aminoácido l-glutamato está, de diversas formas, envolvido na maior parte dos aspectos das funções encefálicas, normais e patológicas, assim como no funcionamento de órgãos periféricos (Attwell, 2000; Petroff, 2002). Este é considerado o maior mediador de sinais excitatórios no sistema nervoso mamaliano e está envolvido na maior parte das funções normais encefálicas, incluindo cognição, memória e aprendizado (Danbolt, 2001). O glutamato também possui grande importância no desenvolvimento do sistema nervoso central, incluindo indução e eliminação de sinapses, migração celular, diferenciação e morte celular (Sarichelou *et al.*, 2008).

A sua síntese em neurônios se dá mais comumente dentro das mitocôndrias pela conversão do aminoácido glutamina em glutamato, através da enzima glutaminase. O

glutamato é então transportado para fora das mitocôndrias e novamente para as vesículas sinápticas. Após ser liberado na fenda sináptica, o glutamato é removido através da recaptação por neurônios e por células gliais. Quando o glutamato é recaptado pelos neurônios, ele é em grande parte transportado para vesículas sinápticas (Van Den Berg; Garfinkel, 1971; Daikhin; Yudkoff, 2000). Em astrócitos, o glutamato, após ser absorvido do meio extracelular, é convertido em glutamina através da enzima glutamina sintetase. A glutamina é então liberada no meio extracelular e reconvertida em glutamato dentro dos neurônios pela via já descrita. (Martinez-Hernandez *et al.*, 1977; Ottersen *et al.*, 1992; Laake *et al.*, 1995).

O glutamato não é necessariamente derivado da glutamina, tampouco é necessariamente convertido em glutamina após absorção pelos astrócitos. Alguns neurônios glutamatérgicos, por exemplo, não expressam a enzima glutaminase, obtendo o glutamato por outras vias (Ottersen *et al.*, 1998; Laake *et al.*, 1999). Deste modo, não é sempre possível caracterizar um neurônio como glutamatérgico através das enzimas que ele expressa, uma vez que este pode obter o glutamato por outras formas.

Os receptores glutamatérgicos são divididos em dois grupos distintos: receptores ionotrópicos e metabotrópicos associados à proteína G (Monaghan *et al.*, 1989; Watkins *et al.*, 1990; Young; Fagg, 1990). Os receptores ionotrópicos compreendem os canais iônicos que seletivamente são permeáveis a cátions e são divididos em 3 subgrupos, de acordo com seus agonistas seletivos: N-metil-D-aspartato (NMDA), cainato e  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionato (AMPA) (Monaghan *et al.*, 1989). Estes dois últimos são comumente referidos como receptores não-NMDA.

Todos os receptores iônicos glutamatérgicos são formados por quatro subunidades. Duas das subunidades que formam os receptores NMDA são do tipo NR1 enquanto as outras duas são do tipo NR2. Existem diferentes variantes das subunidades

NR1 e NR2, e estas estão relacionadas com a localização e a atuação dos receptores nos neurônios. Os receptores do tipo AMPA são compostos por diferentes combinações de quatro tipos das subunidades GluR1, GluR2, GluR3 e GluR4, enquanto os receptores de cainato podem ser formados por diferentes combinações de GluR5, GluR6, GluR7, KA1 e KA2. As diferentes combinações possíveis acarretam em diferenças na atuação dos canais, podendo variar a condutância iônica e o tempo de abertura dos canais (Hassel; Dingledine, 2006).

Os receptores de NMDA são caracterizados por seu bloqueio voltagem-dependente pelo  $Mg^{++}$  (Mayer *et al.*, 1989) e por uma alta permeabilidade a  $Ca^{++}$ . 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 a  $Na^+$  e  $K^+$ , e seus canais iônicos abrem rapidamente após a ligação do glutamato com seus receptores (Pralong *et al.*, 2002).

Na maioria das sinapses glutamatérgicas, a liberação de glutamato produz uma corrente excitatória pós-sináptica com 2 componentes (Mayer; Westbrook, 1987; Forsythe; Westbrook, 1988; Bekkers; Stevens, 1989; Collingridge; Lester, 1989; Hestrin, Nicoll *et al.*, 1990; Hestrin, Sah *et al.*, 1990; Keller *et al.*, 1991). Receptores ionotrópicos não-NMDA são responsáveis pela primeira porção da despolarização, caracterizada por um rápido início e rápido decaimento da despolarização, enquanto os receptores NMDA mediam o segundo componente com 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).

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).

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 (1-5Hz), pode-se observar a LTD, que leva a uma menor eficácia na transmissão do impulso (Hassel; Dingledine, 2006). Ambos os processos estão relacionados com a abertura de canais NMDA após a despolarização da membrana plasmática pelos receptores não-NMDA e são desencadeados pelo cálcio. O que vai determinar qual processo será desencadeado é principalmente por quanto tempo, em que concentrações e em que lugares ele estará no neurônio (Massey; Bashir, 2007).

É aceito que o glutamato é o neurotransmissor liberado no núcleo do trato solitário em resposta a ativação dos barorreceptores e a ativação 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). Já dentre os receptores NMDA no núcleo do trato solitário, ocorre predomínio das subunidades NR1 e NR2D (Guthmann; Herbert, 1999). Os receptores NMDA do núcleo do trato solitário 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 núcleo do trato solitário (Hoang; Hay, 2001).

Tanto os receptores metabotrópicos quanto os ionotrópicos glutamatérgicos, quando ativados no núcleo do trato solitário, resultam em respostas depressoras e bradicárdicas. Estes efeitos podem ser devidos tanto pela ativação de receptores pré-sinápticos quanto pós-sinápticos. O papel de receptores glutamatérgicos ionotrópicos no barorreflexo, quimiorreflexo e reflexo cardiopulmonar é bem conhecido. O modo como receptores metabotrópicos atuam, contudo, ainda não é claro (Talman *et al.*, 1980; Vardhan *et al.*, 1993b; a; De Paula; Branco, 2005).

### **1.2.2 - Catecolaminas**

Assim como os receptores glutamatérgicos metabotrópicos, 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 (Kuhar *et al.*, 2006). Encontramos 19 centros catecolaminérgicos no sistema nervoso central, sendo 10 centros dopaminérgicos, 6 centros noradrenérgicos e 3 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 bulbo, ponte e mesencéfalo, enquanto os centros adrenérgicos se localizam principalmente na região do bulbo (Cooper *et al.*, 1977; Niewenhuys, 1985; Paxinos, 1995; Kuhar *et al.*, 2006).

Todos os neurônios catecolaminérgicos têm em comum duas das 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

decarboxilase. A noradrenalina e a adrenalina compartilham uma mesma terceira etapa: a conversão da dopamina em noradrenalina pela enzima dopamina- $\beta$ -hidroxilase. Apenas em neurônios adrenérgicos ocorre a conversão da noradrenalina em adrenalina pela enzima fenil-etanolamina N-metil transferase (Cooper *et al.*, 1977; Bjöklund; Hökfelt, 1984).

Os efeitos da noradrenalina e da adrenalina são mediados através de nove receptores distintos agrupados em três famílias, sendo estas  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  e  $\beta$ . Estas três famílias de adrenoceptores ativam diferentes tipos de proteína G, induzindo sinais intracelulares específicos. Os adrenoceptores  $\alpha_1$  estão ligados vias mediadas pelas proteínas  $G_q$ , que aumentam a síntese de inositol 1,4,5 trifosfato e de diacil glicerol, resultando em um aumento de atividade da proteína quinase C e aumento de cálcio intracelular. Os receptores  $\alpha_2$  induzem efeitos intracelulares via proteínas  $G_i$ , que inibem a adenilil ciclase, levando a redução níveis de AMP cíclico e reduzindo a fosforilação da proteína quinase A. Receptores  $\alpha_2$  adrenérgicos também podem ser acoplados a canais de cálcio, inibindo sua função (Boehm; Huck, 1996; Cussac *et al.*, 2002). Os receptores  $\beta$  adrenérgicos estão ligados a proteína  $G_s$ , que quando acionados levam a um aumento da atividade da adenilil ciclase, resultando em aumento da síntese de AMP cíclico e da atividade da proteína quinase A (Kuhar *et al.*, 2006). Comparada com a noradrenalina, contudo, a adrenalina é menos específica a  $\alpha_2$ -adrenoreceptores e estimula  $\beta$ -adrenoceptores e  $\alpha_1$  adrenoceptores de modo similar (Berthelsen; Pettinger, 1977; Bylund; U'prichard, 1983).

A noradrenalina e a adrenalina possuem papel inibitório na regulação da pressão arterial e nos batimentos cardíacos (Bhargava *et al.*, 1972; Baum; Shropshire, 1973). Apesar de ainda não ser claro o papel de cada receptor, evidências indicam que os efeitos adrenérgicos partem principalmente da ativação de receptores  $\alpha_2$  adrenérgicos,

sendo este controle fundamental para a manutenção da regulação do barorreflexo pelo núcleo do trato solitário (Tung *et al.*, 1988; Sved *et al.*, 1992). Os receptores  $\alpha_2$  adrenérgicos estão presentes em maior quantidade no núcleo do trato solitário do que os receptores  $\alpha_1$  e  $\beta$  adrenérgicos (Young; Kuhar, 1979), sendo que até o momento, não é certo o envolvimento destes últimos na modulação da pressão arterial (Aoki; Pickel, 1992; Dampney, 1994; Tsukamoto *et al.*, 2002).

O receptor  $\alpha_2$  adrenérgico interage com diversos outros receptores importantes para o controle da pressão arterial, dentre eles os receptores de angiotensina II e do neuropeptídeo Y (Fior *et al.*, 1994; Yang *et al.*, 1997; Díaz-Cabiale *et al.*, 2007). O neurotransmissor angiotensina II, por exemplo, ao atuar em receptores AT1 no núcleo do trato solitário, pode reduzir a afinidade da noradrenalina pelos receptores  $\alpha_2$  adrenérgicos, e esta interação entre os receptores acontece ao nível da membrana celular (Fior *et al.*, 1994). Deste modo, os receptores  $\alpha_2$  são importantes no controle da pressão arterial não apenas pelo seu efeito direto sobre a pressão arterial, mas também através de sua interação com outros receptores.

Acredita-se que alterações no 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 receptores  $\alpha_2$  adrenérgicos em ratos espontaneamente hipertensos em relação aos animais normotensos, sendo que os animais normotensos são mais sensíveis à noradrenalina (Hayward *et al.*, 2002). Em animais hipertensos, observamos também que há maior liberação de noradrenalina pelos neurônios após estimulação. Os neurônios de ratos hipertensos também se mostram, comparados com normotensos, mais sensíveis a estimulação por angiotensina II, importante neurotransmissor relacionado com a regulação da pressão arterial (Teschmacher *et al.*, 2008).



### **1.3 – Interação entre sistemas de neurotransmissão**

Existem diversas formas pelas quais a atuação de receptores pode ser modulada em células do sistema nervoso. Dependendo do estímulo realizado nas células, os receptores podem ter sua sensibilidade aos transmissores alterada, como formar oligômeros com outros receptores, ou mesmo serem internalizados ou degradados, dentre outras respostas. Caso os estímulos sejam intensos ou durem por longos intervalos de tempo, estes podem influenciar o controle da transcrição de genes, e assim resultar tanto no aumento como na redução da síntese de receptores. Sabe-se, por exemplo, que a estimulação de receptores  $\alpha_2$  adrenérgicos reduz a quantidade de receptores  $\alpha_2$  adrenérgico na célula (Heck; Bylund, 1997). O receptor glutamatérgico NMDA e o receptor dopaminérgico D1, por sua vez, podem interagir de diversos modos, dentre eles formação de dímeros e alteração da sensibilidade a transmissores (Cepeda; Levine, 2006).

Da mesma forma que ocorre com os receptores, as diversas etapas envolvidas com a síntese e liberação de neurotransmissores também estão sujeitas a modulação. É sabido, por exemplo, que há aumento de recaptção de noradrenalina após estímulo de células em cultura por angiotensina II (Lu *et al.*, 1996). Observamos também que fatores relacionados com o aumento do AMP cíclico (cAMP) nos neurônios catecolaminérgicos levam ao aumento na síntese de catecolaminas (Lewis-Tuffin *et al.*, 2004).

As diferentes formas pelas quais um sistema de neurotransmissão (envolvendo os transmissores e os receptores, transportadores e enzimas relacionadas) pode ser modulado podem ocorrer como uma consequência da ativação de mensageiros secundários. Em cultura de células do tronco encefálico, receptores de adenosina A1, quando estimulados, aumentam a afinidade de receptores  $\alpha_2$  adrenérgicos através de

uma via dependente de fosfolipase C (Carrettiero *et al.*, 2009). A alteração da atuação de uma via de neurotransmissão por outra via também pode ser direta, onde a ativação de um receptor específico atua diretamente sobre outros receptores. As respostas geradas por essa atuação podem ser diversas, incluindo formação de dímeros com outros receptores, aumento ou redução da atividade do canal, internalização do receptor, entre outras. Sabe-se, por exemplo, que receptores glutamatérgicos e dopaminérgicos podem desencadear respostas diretas um sobre o outro em diversos núcleos do sistema nervoso (Cepeda; Levine, 2006).

#### **1.4 – Estudos em organismos vivos e em culturas de células**

Em um organismo vivo, os neurônios e as células gliais de um núcleo encefálico específico podem receber estímulos de diversas regiões diferentes, oriundos tanto do próprio sistema nervoso como a partir de receptores periféricos. Estas mesmas células também podem enviar estímulos tanto para outros núcleos encefálicos como para o organismo. Como exemplo, podemos citar o núcleo ambíguo, que recebe e envia estímulos ao organismo a partir do nervo vago, e também interage com o núcleo do trato solitário.

Após, por exemplo, o tratamento do núcleo do trato solitário com glutamato, observa-se redução da pressão arterial, resultando em uma menor estimulação dos barorreceptores. Da mesma forma, o tratamento do bulbo ventrolateral rostral com glutamato leva a um aumento da pressão arterial, o que resulta em aumento da estimulação dos barorreceptores, resultando em redução da estimulação do bulbo ventrolateral rostral. Desta forma, quando se estuda, em um organismo vivo, as possíveis respostas de um dado núcleo encefálico a uma estimulação específica, devemos levar em consideração que os possíveis efeitos do tratamento se devem

também à interação da região tratada com o organismo, bem como em resposta às alterações na pressão arterial.

Ao realizarmos uma cultura de células de um núcleo específico, isolamos as células deste núcleo em um ambiente controlado, onde as únicas estimulações que as células recebem são oriundas das próprias células presentes na cultura. Desta forma, ao expormos estas células a um estímulo específico, as respostas observadas se devem à atuação do estímulo sobre as células e da interação entre as células presentes na cultura.

Muitos trabalhos sobre o núcleo do trato solitário encontrados na literatura, assim como de outros núcleos bulbares relacionados com o controle da pressão arterial, foi realizada em secções histológicas de encéfalos de animais adultos (tratados ou não) (Van Giersbergen *et al.*, 1992; Maley, 1996) ou através da análise comportamental após introdução de substâncias diretamente na área desejada em animais vivos, estando estes anestesiados ou não (Johnson; Ascher, 1987; Le Galloudec *et al.*, 1989; Machado; Bonagamba, 1992; Colombari *et al.*, 1994; Colombari *et al.*, 1996; Potts, 2006). Estes trabalhos, apesar de caracterizarem bem a atuação do Núcleo do Trato Solitário no controle da pressão arterial e de mostrarem a presença dos neurotransmissores, neurorreceptores e enzimas envolvidas, não caracterizam bem a atuação das células deste, tampouco a importância de cada tipo celular. Por isto, consideramos importante a realização de estudos de modulação de sistemas de neurotransmissão de células do bulbo em cultura.

### **1.5 – Importância da interação entre vias de neurotransmissão**

A interação entre sistemas de neurotransmissão tem sido bastante estudada entre os mais diversos neurotransmissores e tem se verificado que isso ocorre quase como via de regra no sistema nervoso central. A interação entre o sistema catecolaminérgico e glutamatérgico, apesar da reconhecida importância de ambos, foi pouco explorada até o

momento. O estudo de modulação do sistema catecolaminérgico pelo glutamato é de grande relevância devido a ações que estes apresentam no sistema nervoso central.

Deste modo, considerando-se que:

- Os sistemas glutamatérgico e catecolaminérgico são muito importantes no sistema nervoso, estando relacionados com diversas funções;

- O glutamato e a noradrenalina são neurotransmissores encontrados em grande quantidade nos principais centros controladores da pressão arterial;

- A cada dia há mais evidências de que os neurotransmissores exercem efeitos modulatórios uns sobre os outros;

Acreditamos que a interação entre os sistemas catecolaminérgico e glutamatérgico possa desempenhar papel importante na via de regulação da pressão arterial. Assim sendo, propomos uma análise dos mecanismos envolvidos na modulação dos sistemas catecolaminérgicos e glutamatérgicos em cultura primária de células do bulbo.

## 2 - Objetivos

-Verificar se há existência de modulação entre a via glutamatérgica e noradrenérgica em culturas de células do bulbo de ratos neonatos.

### **Objetivos específicos:**

Realizar cultura primária de células do bulbo de ratos. A partir desta:

- Caracterizar o número de células e neurônios nas culturas, assim como a presença de células gliais, através de técnicas de imunohistoquímica.

- Observar se a presença do glutamato na cultura de células influencia a produção de tirosina hidroxilase, através de técnicas de PCR em tempo real e Western Blotting.

- Observar se a presença do glutamato na cultura de células influencia a produção do receptor  $\alpha 2$  adrenérgico, através de técnicas de PCR em tempo real e Western Blotting.

- Observar se a presença de antagonista do receptor glutamatérgico NMDA influencia a produção do receptor  $\alpha 2$  adrenérgico, através de Western Blotting.

- Observar se a presença de noradrenalina na cultura de células influencia a produção do receptor glutamatérgico NMDA NR1, através de Western Blotting.

### **3 - Material e Métodos**

Para todos os procedimentos descritos abaixo, foram utilizados ratos neonatos obtidos do Biotério do Departamento de Fisiologia do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo – SP.

#### **3.1 - Cultura de células**

Para todas as etapas descritas abaixo, exceto quando citado, o tecido obtido foi mantido em solução-tampão gelada (120 mM NaCl, 5 mM KCl, 1,2 mM KH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1,2 mM MgSO<sub>4</sub>, 25m M NaHCO<sub>3</sub> e 13 mM glicose, a pH 7.4).

Para a realização da cultura de células, foi extraído o bulbo de ratos neonatos o qual foi submetido a tratamento com tripsina (concentração 2,5%) (Gibco, EUA), em banho-maria à 37°C, a 100 rotações por minuto, por 40 minutos. Para este tratamento, o tecido foi previamente reduzido a fragmentos de cerca de 1 mm<sup>2</sup>. A ação da tripsina foi então interrompida pela adição de 0,006 g do inibidor da tripsina (Gibco). O tecido, então, foi pipetado e retornado ao seu recipiente diversas vezes até que as células do tecido estivessem dissociadas e livres na solução.

As células foram concentradas após centrifugação por cinco minutos a 300g. Logo após, a solução-tampão foi removida e às células foram ressuspensas em meio de cultura Neurobasal (Gibco), suplementado com 2% de B27 (Gibco), 0,25mM de glutamax (Gibco) e 0,25mM de L-glutamina (Sigma-Aldrich, EUA) e antibiótico Gentamicin (Gibco). Para verificar a concentração de células no meio, 200µl de meio de cultura com células foi aplicada em uma câmara para contagem Neubauer (Optik Labor, Alemanha). A diferenciação de células mortas ou lesadas foi feita através de tratamento com 0,02% Trypan blue (Sigma-Aldrich).

As células foram plaqueadas na concentração de 1800 células/mm<sup>2</sup> em placas de petri de dimensões de 35 x 10 mm (Nunc, Dinamarca) ou em placas para cultura de células com 24 poços (TPP, Suíça) tratadas com Poly-D-Lisina (Sigma-Aldrich) por 40 minutos e com soro fetal bovino (Sigma). As culturas de células foram mantidas em estufa à 37°C em uma atmosfera com concentração de CO<sub>2</sub> em 5%. O meio de cultura foi trocado após 3 horas, três e seis dias após a realização da cultura.

### **3.2 - Tratamentos**

Seis dias após o plaqueamento, as células foram submetidas a tratamento com glutamato ou noradrenalina, seguido de extração de proteínas para a realização de Western Blotting e extração de mRNA para a realização do PCR em tempo real.

Para a extração de proteínas, as culturas foram tratadas com as seguintes concentrações de glutamato (L-glutamic acid, Sigma-Aldrich): 0,1 μM, 1 μM, 10 μM e 100 μM, pelo período de 24 horas. Também foram tratadas as culturas com 1 μM de glutamato por diferentes tempos: 4, 12, 24 e 48 horas. As culturas também foram tratadas com noradrenalina (± arterenol, Sigma) nas concentrações de 0,1 μM, 5 μM, 10 μM e 100 μM por 24 horas, assim como tratadas com 5 μM de noradrenalina por 4, 12, 24 e 48 horas. As concentrações utilizadas neste estudo foram selecionadas a partir de diversos trabalhos, levando-se em consideração a concentração ótima para se observar atividade modulatória e evitar toxicidade induzida pelo tratamento, tanto em neurônios como em células gliais (Cull-Candy; Ogden, 1985; Marchetti *et al.*, 1986; Tolbert *et al.*, 2003; Velasco *et al.*, 2003).

As culturas também foram submetidas a tratamentos com os seguintes agonistas e antagonistas de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA: NMDA e MK801, respectivamente. Foram feitos experimentos para a verificação da modulação do sistema catecolaminérgico pela ativação e inibição dos canais glutamatérgicos NMDA.

Para este experimento, as células foram incubadas, em cada cultura, com 10 $\mu$ M de NMDA (Sigma-Aldrich), 5 $\mu$ M de MK801 (Sigma-Aldrich) e 10  $\mu$ M de NMDA junto com 5  $\mu$ M de MK801.

Após o tempo do tratamento, as culturas de células foram rapidamente lavadas com PBS e tiveram suas proteínas extraídas para análise por Western Blotting ou então tiveram o RNA extraído para ser analisado por PCR em tempo real.

### ***3.3 - Análise da toxicidade do glutamato***

A viabilidade das células após o tratamento com glutamato foi verificada por contagem celular. As células foram incubadas com PBS (11,4g/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O; 2,6g/l NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O; 0,2g/l NaCl; 8g/l NaCl; água) gelado contendo 0,02% de trypan blue por cinco minutos e então fotografadas em microscópio invertido. Foi contado o número de células coradas com trypan-blue de seis campos por placa.

### ***3.4 - Imunofluorescência***

Após 3 ou 6 dias, as placas foram submetidas à reação de imunofluorescência utilizando-se anticorpos primários específicos para identificar: neurônios (anti MAP2, Sigma) e astrócitos (anti GFAP, DAKO, EUA). O anticorpo anti MAP2 foi produzido em camundongo e o anti GFAP foi produzido em coelho. Todas as placas foram marcadas com dois anticorpos primários distintos, sendo sempre um deles ou MAP ou GFAP.

Sete dias após o plaqueamento, as culturas de células foram lavadas com PBS gelado e fixadas com solução 50% metanol 50% acetona. Logo após, foram mantidas em -20°C até o dia da realização da imunofluorescência.

As células foram permeabilizadas com PBS contendo 0,2% triton por 30 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas foram incubadas com



solução PBS contendo 2% soro normal de cabra (NGS, Vector, EUA), 4% albumina de soro bovino (BSA, Sigma) e 0,2% Triton (+-octylphenoxypolyethoxyethanol, Sigma-Aldrich) por 30 minutos em temperatura ambiente, com o objetivo de inibir as ligações não específicas que podem estar presentes no tecido conjuntivo. As placas foram incubadas com os anticorpos primários, por 18 a 24 horas, a 4°C. O meio de diluição para o anticorpo consiste em solução de PBS, 0,2% Triton, 1% NGS e 2% BSA.

Os anticorpos de ligação ao anticorpo primário utilizados são anticorpos fluorescentes (FITC, Jackson; Texas Red, Jackson), produzidos em cabra e com especificidade anti-coelho e anti-camundongo e são usados por duas horas à temperatura ambiente.

Ao término, foi utilizado o corante fluorescente DAPI para corar o DNA das células e assim tornar distinguível a presença do núcleo celular.

### **3.5 - Western Blotting**

Para a extração de proteínas, o meio de cultura foi extraído das placas de cultura e estas foram lavadas rapidamente com PBS gelado. As células foram lisadas e as proteínas extraídas aplicando-se RIPA em cada placa (1% NP40; 0,5% Deoxicolato de sódio; 1% SDS; 1mM EDTA; 1mM EGTA; 1% Coquetel inibidor de protease (Sigma-Aldrich); PBS) e esfregando a ponta da ponteira nas placas. O lisado das células, transferido para tubos, foi agitado vigorosamente diversas vezes e centrifugado (14000 rpm, 20 min) a 4°C. O extrato de proteínas obtido foi mantido em freezer -80°C até o momento do uso.

A concentração de proteínas dos lisados de células foi quantificada através do método de Bradford. Foram preparadas alíquotas compostas de extratos de proteínas e de diferentes concentrações conhecidas de albumina diluídas em água. 40ul de cada alíquota foi transferido para poços de uma placa de elisa e, em seguida, foram

adicionados 200ul de solução de Bradford em cada poço. A placa de elisa com as soluções de albumina e de proteínas foi então analisada por um espectrofotômetro.

Alíquotas com proteínas do bulbo foram preparadas misturando-se 15ug de proteínas do extrato de proteínas, Sample Buffer (Sigma-Aldrich) e RIPA. Esta solução foi então fervida por 3 minutos e rapidamente colocada em gelo. Foram adicionados 10ul das alíquotas de proteínas, intercalados com marcadores de peso molecular Kaleidoscope (Bio-Rad, EUA), a poços do gel de SDS-poliacrilamida (FisherBiotech, EUA) 12%. Este gel então foi exposto a eletroforese em gel em 100V por 1h em solução de corrida (25mM Trizma base, 96mM Glicina, 10% SDS, água) para a separação das proteínas por peso molecular. Após a eletroforese, o gel foi mergulhado em tampão de transferência (25mM Tris, 190mM Glicina, 10% Metanol, água), junto com uma membrana de nitrocelulose, ambos envoltos por papel absorvente (BioRad, EUA) e flanelas brancas grossas, conjunto conhecido como “sandwich”. Este sandwich foi submetido a corrente elétrica de 100V mergulhado em tampão de transferência, em gelo, por 1h, para a transferência das proteínas do gel para a membrana de nitrocelulose.

As membranas de poliácrlamida foram retiradas do “sandwich”, lavadas rapidamente em TBS-T (150mM NaCl, 10mM Tris, 0,05% Tween 20, água) e bloqueadas com 3% leite em TBS-T por 1h em temperatura ambiente. As membranas bloqueadas foram incubadas com os anticorpos monoclonais anti-tirosina hidroxilase produzido em camundongo (Chemiconm, EUA), anti  $\alpha$ 2 adrenérgico produzido em cabra (Santa Cruz, EUA) e anti NR1 (Chemicon) produzido em camundongo, 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 1h a temperatura ambiente. A detecção do complexo anticorpo primário-secundário foi feita usando-se solução HPR para detecção quimioluminescente (Millipore, EUA) de acordo com instruções do

fabricante. As membranas foram então expostas a filmes fotográficos quimioluminescentes de alta performance Amersham Hyperfilm ECL (GE, EUA) por 5 minutos, em câmara escura. Os filmes foram mergulhados no revelador Devalex Air (Champion, Inglaterra) por 5 minutos, lavados rapidamente em água destilada e mergulhados no fixador GBX (Kodak, Brasil) por 10 minutos.

Para a marcação da membrana com o anticorpo  $\alpha$  tubulina, os anticorpos anteriormente usados foram removidos da membrana por incubação com Erasing Buffer (62,5M Tris-HCL, 2% SDS, 100mM 2-Mercaptoethanol (Sigma-Aldrich), água) à 57°C por 18 minutos. Após a remoção, as membranas foram lavadas diversas vezes em TBS-T, bloqueadas com leite 5% em TBS-T e incubadas com anticorpo primário anti- $\alpha$  tubulina em solução 1% BSA em TBS-T por 1h em temperatura ambiente. Após a incubação com o anticorpo primário, a membrana foi lavada duas vezes 10 minutos com TBS-T e incubada com anticorpo secundário HRP. A detecção do complexo anticorpo primário-secundário foi feita como descrita acima.

### ***3.6 - Análise da expressão de mRNA***

#### **3.6.1 - Extração e Quantificação de RNA**

O ambiente de trabalho foi limpo utilizando-se solução descontaminante de RNase (RNase ZAP, Ambion). Foram utilizados tubos, ponteiros e soluções livres de RNases. Para a extração de RNA, foi utilizado o Invisorb Spin Cell RNA mini Kit (Invitek, Alemanha). Todos os materiais citados no processo de extração, exceto quando citado o contrário, foi fornecido pelo fabricante.

Inicialmente, retiramos o meio de cultura das placas e lavamos as células com PBS rapidamente. As células em seguida são lisadas na própria placa pela aplicação de 350 $\mu$ l de solução de lise R enriquecido com 1% de 1M dithiothreitol (Sigma). Esta

solução é então sugada e recolocada na placa diversas vezes para que o processo de lise atinja todas as células.

Para a remoção do DNA, a solução resultante, formada pelas células lisadas e o tampão de lise, é transferida para um filtro específico para adesão ao DNA. Este filtro com a solução é então colocado em um tubo de centrífuga de coleta de 2ml. A solução foi incubada no filtro dentro do tubo de coleta por um minuto e depois centrifugada a 12000rpm por 2 minutos. Logo após esta etapa, o filtro foi descartado.

Foram ajustadas em seguida as condições necessárias para o isolamento do RNA adicionando-se 350 $\mu$ l de etanol 70% (Synth, Brasil) e pipetando a mistura vigorosamente. Para o isolamento do RNA, agora já isolado do DNA, a solução resultante da etapa anterior foi adicionada ao filtro RNA-RTA e este filtro foi colocado em um tubo de coleta. A solução foi incubada por 1 minuto e centrifugada a 10000rpm por 30 segundos. O líquido resultante é descartado e o tubo de coleta reutilizado. Em seguida, 600 $\mu$ l de tampão de lavagem R1 é adicionado ao filtro RNA-RTA e este é centrifugado por 30 segundos. O líquido resultante é então descartado e o filtro RNA-RTA é colocado em um novo tubo coletor. É adicionado ao filtro 700 $\mu$ l de tampão de lavagem R2 e este é centrifugado por 30 segundos a 10000rpm. O líquido resultante é descartado e o tubo coletor é reutilizado. Em seguida, novamente é adicionado 700 $\mu$ l de tampão de lavagem R2 e este é centrifugado por 30 segundos. O líquido resultante então é desprezado.

Para deixar o filtro RNA-RTA seco, o filtro é secado através de centrifugação por 5 minutos a 12000rpm e o tubo coletor é substituído por um novo. O processo de extração de RNA é concluído pela eluição do RNA presente no filtro em 20  $\mu$ l de tampão de eluição R, adicionado diretamente à membrana do filtro. O tampão de eluição é incubado no filtro por 2 minutos e o filtro é então centrifugado por 1 minuto a

10000rpm. Em seguida, o tubo coletor com o mRNA isolado é conservado em freezer - 80°C.

Para acessar a quantidade e qualidade do RNA extraído, primeiramente uma amostra diluída a 1:50 em tampão TE (10mM Tris, 1mM EDTA, 100ml água, pH8,0) foi submetida a espectrofotômetro para ter a absorbância à UV determinada e sua concentração. Após a determinação da concentração de RNA por tubo, uma outra amostra de 15µM contendo 1,5µg de RNA total foi colocada em gel de agarose 1% contendo brometo de etídio (0,1µg/mL) e submetida à corrida nas seguintes condições: pólo positivo para o negativo, 80V, durante 30 minutos com tampão de corrida constituído de TBE (324 g Tris base, 165g ácido bórico, 120mls 0.5M EDTA, pH 8.0).

### **3.6.2 - RT-PCR em Tempo Real**

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 MgCl<sub>2</sub>(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  $-80^{\circ}\text{C}$  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) e do receptor  $\alpha 2$  adrenérgico (Rn00562488\_s1 - Adrenergic receptor alpha 2 a) contêm FAM<sup>TM</sup> 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<sup>TM</sup> e também é comercialmente disponível (Applied Biosystems, EUA). A TABELA 1 exemplifica o protocolo que foi utilizado.

**TABELA 1** – Descrição do protocolo a ser utilizado para o preparo das amostras que foram submetidas à análise por PCR em tempo real.

<b>18S</b>	<b>Volume por reação (25<math>\mu</math>L)</b>
2x Master Mix	12,5 $\mu$ L
Probe	0,156 $\mu$ L
Primers	0,25 $\mu$ L (reverso e de avanço)
cDNA (diluído 1:100)	5 $\mu$ L
Água livre de RNase	6,84 $\mu$ L
<b>Demais mRNAs</b>	
2x Master Mix	12,5 $\mu$ L
Probe/primers	1,25 $\mu$ L
cDNA (diluído 1:5)	5 $\mu$ L
Água DEPC	6,25 $\mu$ L

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 50 ciclos.

Os dados referentes aos mRNA de estudo foram corrigidos através de subtração dos valores referentes ao 18S e comparados entre si por normalização logarítmica ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ ).

### **3.7 - Análise dos dados**

As imagens da imunofluorescência foram gravadas através de câmera digital ligada a um fotomicroscópio (Zeiss Axiophot, Alemanha) acoplado a lâmpada de mercúrio (Zeiss HBO 100W, Alemanha), utilizando-se um filtro para fluorescência (Chroma Technology, EUA). A quantificação dos perfis celulares obtidas pelo fotomicroscópio foi feita através do programa de análise de imagens Image-Pro Plus (versão 4,5 Media Cybernetics Inc. EUA).

Todos os experimentos foram realizados no mínimo em triplicata. Os dados quantitativos obtidos foram analisados através da análise de variância (ANOVA) de uma via e pós-teste de Bonferroni ou pós-teste de Dunnet. 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). Foram aceitas como variações significativas aquelas em que a diferença entre os grupos resultou em um valor de p menor ou igual a 0,05.

## 4 - Resultados

### 4.1 - Análise das culturas de células

As culturas de células do bulbo de ratos neonatos realizadas neste trabalho apresentam o número médio de 2012 células por mm<sup>2</sup>, sendo que este número variou entre 1862 e 2150 células no total (TABELA 2). Destas, cerca de 16% são neurônios (FIGURA 2).

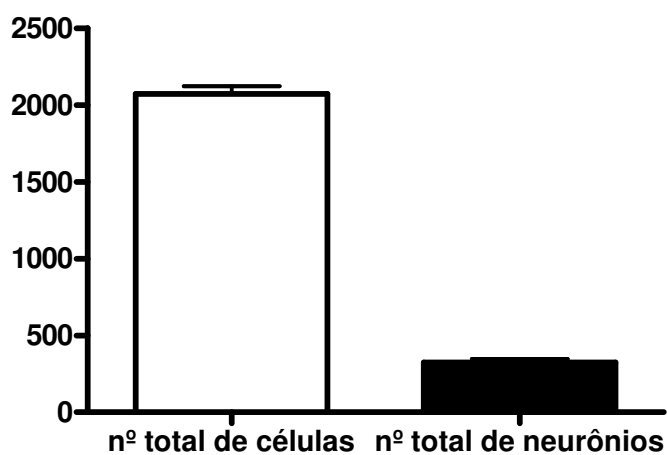
Verificamos que os astrócitos presentes nestas culturas apresentaram longas ramificações, às quais muitas vezes se sobrepõem aos núcleos presentes no campo (FIGURA 3). Analisando-se imagens de culturas de células mantidas por apenas 3 dias em cultura, observamos que as ramificações dos astrócitos neste estágio são menores, não envolvendo grande parte dos núcleos presentes (FIGURA 4).

A proporção de neurônios em relação ao número total de células que encontramos na cultura (FIGURA 2) se mostrou mais baixa em relação aos trabalhos de Kivell, grupo responsável pelo protocolo de cultura de células utilizado (Kivell *et al.*, 2000), variando entre 25% e 31%, enquanto em nossas culturas encontramos entre 14% e 19%.

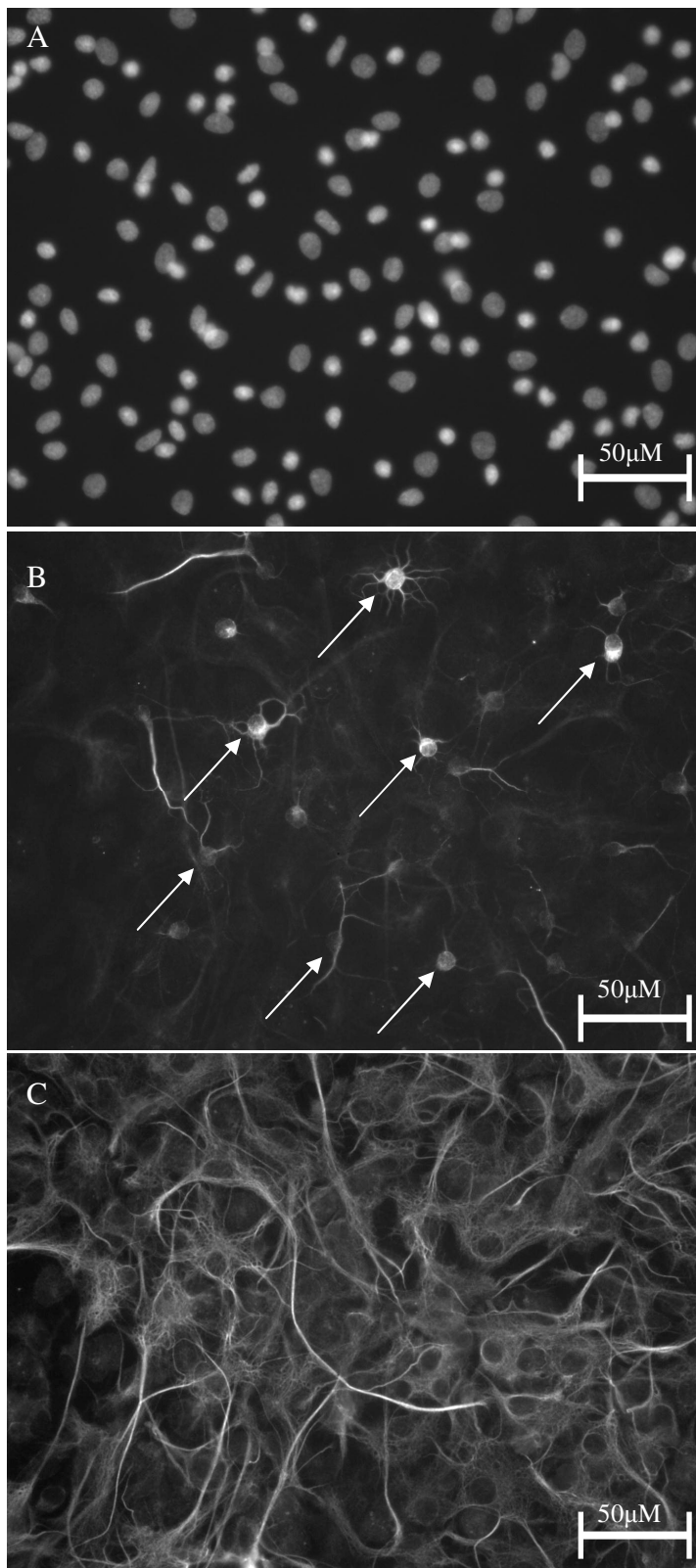


**TABELA 2** – Número total de células e de neurônios em cultura de células do bulbo de ratos Wistar após o período de 7 dias.

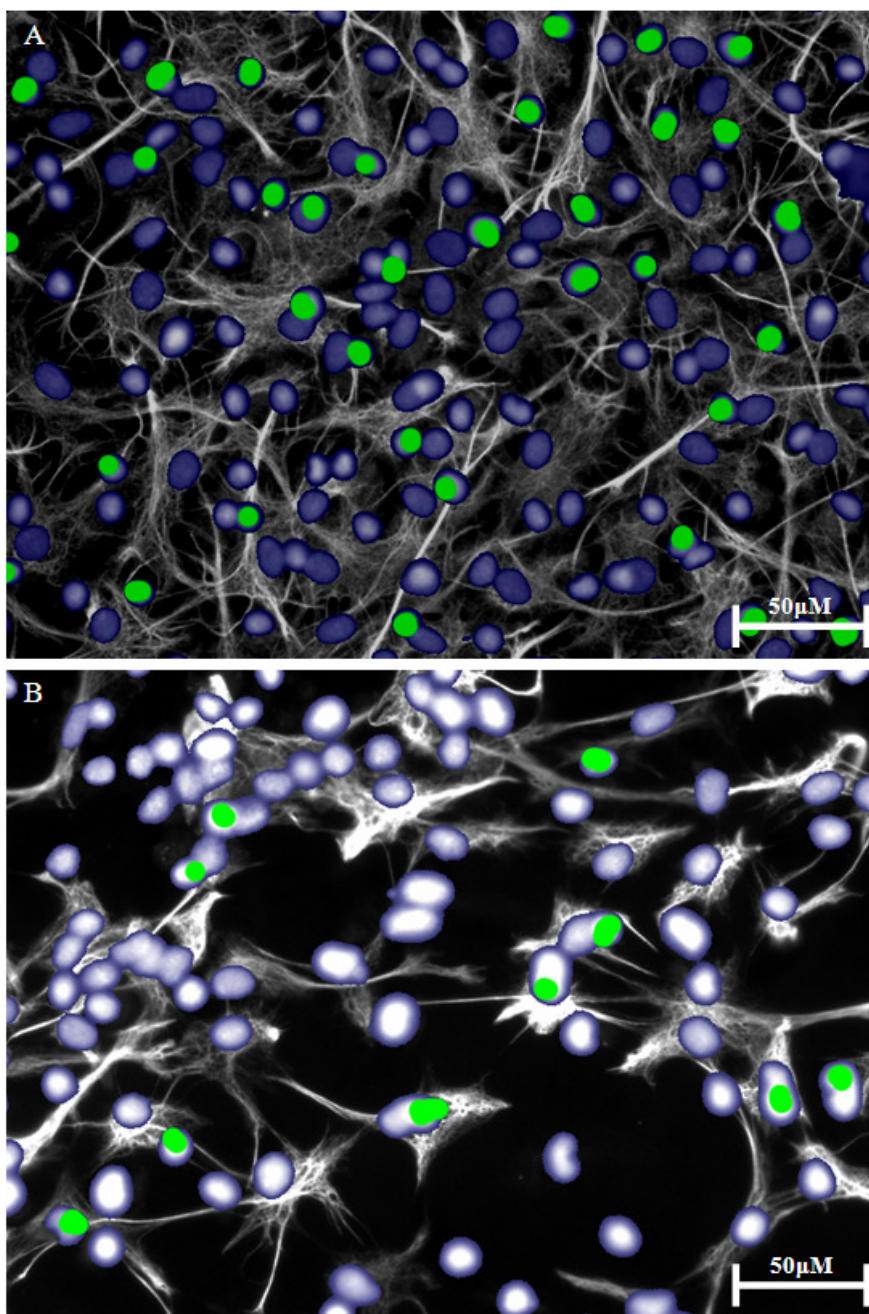
	<i>Nº de células em mm<sup>2</sup></i>	
	<b>Total</b>	<i>Neurônios</i>
<b>Média ± DP</b>	2102±106	315±50



**FIGURA 2** – Número total de células e de neurônios por mm<sup>2</sup> em culturas de células do bulbo.



**FIGURA 3** – Imagens de imunofluorescência de cultura de células do bulbo de ratos neonatos por 7 dias. A – núcleos das células; B – neurônios; C – astrócitos. Imagens da mesma região vistas por filtros diferentes. Aumento: 200x.



**FIGURA 4** – Imagem de imunofluorescência de astrócitos e núcleos celulares, obtidas de cultura de células do bulbo de ratos neonatos, após 7 dias (A) e após 3 dias (B). Esferas azuis – núcleos celulares; esferas verdes – núcleos de neurônios. Notar que as ramificações dos astrócitos de culturas de sete dias (A) são significativamente maiores do que as ramificações dos astrócitos de culturas mantidas por três dias (B). Somente em B há núcleos de células não envolvidos por ramificações de astrócitos. Aumento: 200x.

## **4.2 - Análise da toxicidade do glutamato**

Para verificar se o resultado da modulação das células por glutamato não era devido à sua toxicidade, verificamos se as concentrações de glutamato usadas neste experimento poderiam levar alguma célula da cultura a um estado de necrose ou morte celular. Tratamos as culturas de células com as seguintes concentrações de glutamato: 0,1 $\mu$ M; 1 $\mu$ M, 10 $\mu$ M; 50 $\mu$ M e 100 $\mu$ M. Para cada etapa foi utilizada uma placa como controle negativo.

As imagens obtidas pelo microscópio indicaram que, após os tratamentos nas diferentes concentrações, nenhuma célula foi marcada pelo trypan blue (FIGURA 5). As imagens obtidas também mostraram que o número de células em todas as placas tratadas com glutamato, em todas as concentrações, era similar. Assim, concluímos que o tratamento das culturas com estas concentrações de glutamato não resultou em necrose ou morte celular após 24 horas de tratamento.



**FIGURA 5** – Fotografia da cultura de células do bulbo de ratos neonatos tratadas com glutamato e trypan blue. O número de células coradas com trypan blue não variou após o tratamento com glutamato. Apenas aglomerados celulares apresentaram marcação (seta pequena), enquanto células adultas (seta grande) não foram coradas, indicando que não entraram em estado de necrose. Aumento: 200x.

### **4.3 - Influência do glutamato sobre o sistema catecolaminérgico**

Através da análise dos níveis de proteína pelo Western Blotting, observamos que o tratamento d cultura de células do bulbo com diferentes concentrações de glutamato durante um período de 24 horas levou a uma redução dos níveis do receptor  $\alpha 2$  adrenérgico de forma dose-dependente (FIGURA 6). As reduções foram significativas em relação ao controle nas concentrações de  $1\mu\text{M}$  e  $10\mu\text{M}$ . Houve também diferença estatisticamente significativa entre as concentrações de  $0,1\mu\text{M}$  e  $10\mu\text{M}$ . A queda nos níveis do receptor  $\alpha 2$  foi maior após tratamento das culturas com  $10\mu\text{M}$  de glutamato, onde encontramos uma redução de 51% em relação ao controle (TABELA 3).

A análise através do RT-PCR em tempo real das culturas de células tratadas com glutamato, na concentração de  $10\mu\text{M}$  por 12 e 24 horas, também mostrou redução nos níveis de mRNA do receptor  $\alpha 2$  adrenérgico (FIGURA 7). Esta redução na quantidade de mRNA, é similar à observada nos níveis de proteína deste receptor tanto em 12 horas, onde observamos redução de 49% em relação ao controle, quanto em 24 horas, onde observamos redução de 44% em relação ao controle (TABELA 4).

Também observamos que o tratamento da cultura de células do bulbo com diferentes concentrações de glutamato durante um período de 24 horas levou a uma redução dos níveis da proteína da enzima tirosina hidroxilase de forma dose-dependente (FIGURA 8). As reduções foram significativas em relação ao controle nas concentrações de  $0,1\mu\text{M}$ ,  $1\mu\text{M}$  e  $10\mu\text{M}$ , e houve diferença significativa entre as concentrações de  $1\mu\text{M}$  e  $100\mu\text{M}$ , assim como entre  $10\mu\text{M}$  e  $100\mu\text{M}$ . Nesta concentração, o nível de proteína do receptor, apesar de menor, é similar ao encontrado no controle. Observamos que as concentrações de glutamato que induziram maior

redução nos níveis de tirosina hidroxilase foram  $1\mu\text{M}$  e  $10\mu\text{M}$ , reduzindo em 43% e 42%, respectivamente os níveis de tirosina hidroxilase em relação ao controle (TABELA 5).

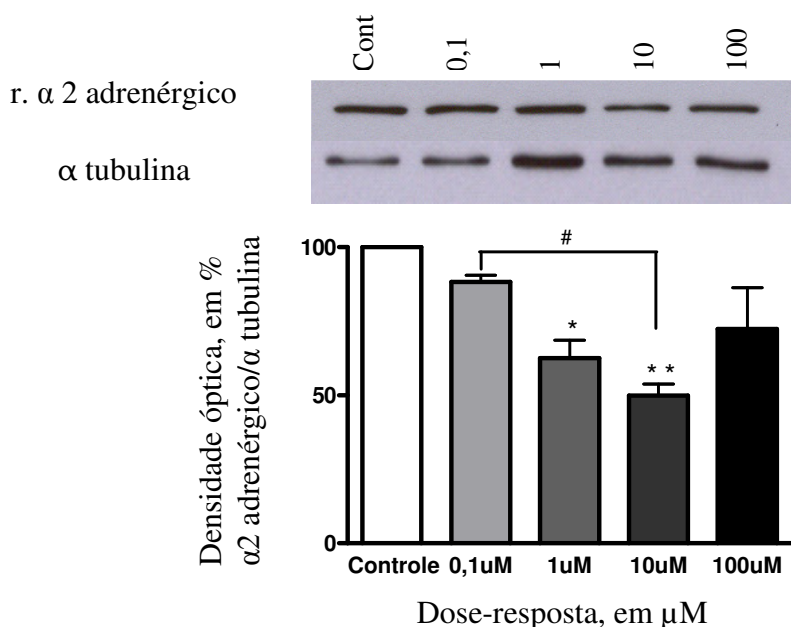
O tratamento das culturas de células do bulbo com glutamato, na concentração de  $10\mu\text{M}$  por 12 e 24 horas, também levou a reduções significativas nos níveis de mRNA da Tirosina Hidroxilase (FIGURA 9). A redução na quantidade de mRNA, observada após realização do RT-PCR em tempo real, foi de 52% em relação ao controle. Já no tratamento com glutamato por 12 horas, observamos uma redução de 80% em relação ao controle (TABELA 6). As diferenças entre os tratamentos de 12 e 24 horas são estatisticamente significantes (FIGURA 8).

Para verificar se a modulação do sistema catecolaminérgico pelo glutamato nas culturas está relacionada com a ativação de receptores NMDA ou de outros receptores glutamatérgicos, tratamos as culturas de células do bulbo com glutamato, agonista e antagonista do receptor NMDA. Os tratamentos foram realizados na seguinte ordem:  $10\mu\text{M}$  de glutamato,  $10\mu\text{M}$  de NMDA,  $5\mu\text{M}$  do antagonista de receptores NMDA MK801,  $10\mu\text{M}$  de glutamato junto com  $10\mu\text{M}$  de MK801 e  $10\mu\text{M}$  de NMDA junto com  $5\mu\text{M}$  de MK801. Todos estes tratamentos duraram 24 horas. Observamos aqui reduções significativas na quantidade de receptores  $\alpha_2$  adrenérgico em todos os casos, exceto no tratamento com o antagonista (FIGURA 10). Nos tratamentos com glutamato e NMDA, a redução foi de 32% em relação ao controle, enquanto as reduções observadas nos tratamentos com antagonista junto com glutamato e do antagonista junto com NMDA foram de, respectivamente, 39% e 43% em relação ao controle (TABELA 7). A ausência da inibição da ação do NMDA pelo antagonista se deve provavelmente à baixa concentração usada do antagonista MK801.

**TABELA 3** – Densidade óptica relativa em unidade arbitrária (u.a.), em porcentagem, do receptor  $\alpha 2$  adrenérgico em cultura de células do bulbo de ratos neonatos após tratamento com glutamato por 24 horas, nas concentrações de 0,1, 1, 10 ou 100 $\mu$ M.

	Tratamento				
	controle	0,1 $\mu$ M	1 $\mu$ M	10 $\mu$ M	100 $\mu$ M
<b>Média <math>\pm</math> DP</b>	100 $\pm$ 0	88 $\pm$ 4	63 $\pm$ 9*	50 $\pm$ 6** <sup>#</sup>	72 $\pm$ 24

\* $p < 0,05$  comparado com controle, \*\* $p < 0,01$  comparado com controle, <sup>#</sup> $p < 0,05$  comparado com 0,1 $\mu$ M segundo análise de variância (ANOVA) de uma via seguida do pós-teste de Bonferroni.



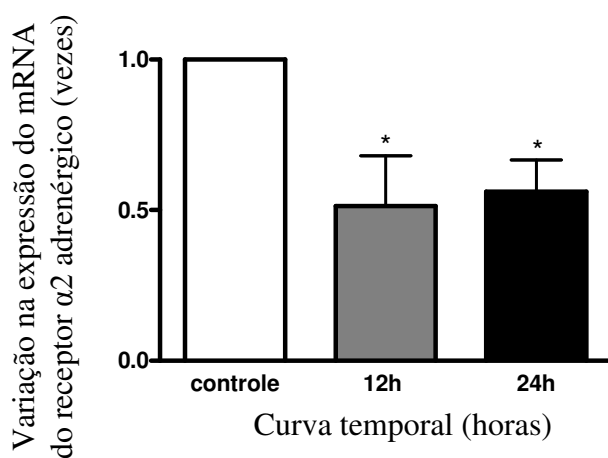
**FIGURA 6** – Densidade óptica relativa em porcentagem (%) da marcação referente ao receptor  $\alpha 2$  adrenérgico em cultura do bulbo de ratos Wistar, a partir da técnica de Western Blotting. Resultados obtidos após tratamento com 0,1; 1; 10 e 100 $\mu$ M de glutamato por 24 horas. Os valores foram normalizados dividindo-se o valor referente ao receptor  $\alpha 2$  adrenérgico pelo valor da  $\alpha$ -tubulina e estão representados como média aritmética  $\pm$  EPM. \* $p < 0,05$  comparado com controle, \*\* $p < 0,01$  comparado com controle, <sup>#</sup> $p < 0,05$  comparado com 0,1 $\mu$ M segundo a análise de variância (ANOVA) de uma via seguida do pós-teste de Bonferroni.



**TABELA 4** – Variação na expressão do mRNA do receptor  $\alpha 2$  adrenérgico em cultura de células do bulbo de ratos neonatos após tratamento com glutamato por 12 e 24 horas, na concentração de  $10\mu\text{M}$ .

	Tratamento		
	Controle	12 horas	24 horas
<b>Média <math>\pm</math> DP</b>	1 $\pm$ 0	0,5 $\pm$ 0,2*	0,6 $\pm$ 0,15*

\* $p < 0,05$  comparado com controle, segundo a análise de variância (ANOVA) de uma via seguida do pós-teste de Bonferroni

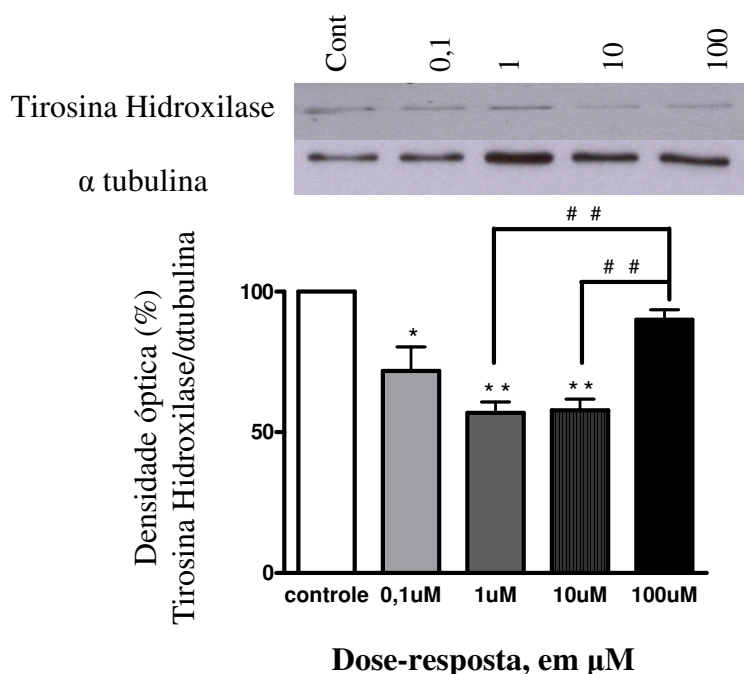


**FIGURA 7** – Variação na expressão do mRNA do receptor  $\alpha 2$  adrenérgico em cultura de células do bulbo de ratos Wistar após tratamento com glutamato ( $10\mu\text{M}$ ) durante 12 e 24 horas. Os valores estão representados como média aritmética  $\pm$  EPM. \* $p < 0,05$ ; comparado com controle, segundo a análise de variância (ANOVA) de uma via seguida do pós-teste de Bonferroni.

**TABELA 5** – Densidade óptica relativa em unidade arbitrária (u.a.), em porcentagem, da enzima tirosina hidroxilase, em cultura de células do bulbo de ratos neonatos após tratamento com glutamato por 24 horas, nas concentrações de 0,1, 1, 10 ou 100 $\mu$ M.

	Tratamento				
	Controle	0,1 $\mu$ M	1 $\mu$ M	10 $\mu$ M	100 $\mu$ M
<b>Média <math>\pm</math> DP</b>	100,0 $\pm$ 0,0	72 $\pm$ 15*	57 $\pm$ 5** <sup>##</sup>	58 $\pm$ 6** <sup>##</sup>	90 $\pm$ 6

\* $p$ <0,05 comparado com controle, \*\* $p$ <0,01 comparado com controle, <sup>##</sup> $p$ <0,01 comparado com 100 $\mu$ M segundo análise de variância (ANOVA) de uma via seguida do pós-teste de Bonferroni.

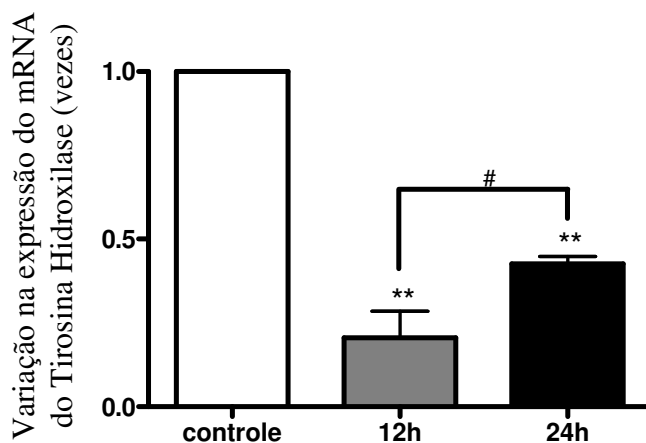


**FIGURA 8** – Densidade óptica relativa em porcentagem (%) da marcação referente à enzima tirosina hidroxilase em cultura do bulbo de ratos Wistar, a partir da técnica de Western Blotting. Resultados obtidos após tratamento com 0,1; 1; 10 e 100 $\mu$ M de glutamato por 24 horas. Os valores foram normalizados dividindo-se o valor referente à enzima tirosina hidroxilase pelo valor da  $\alpha$ -tubulina e estão representados como média aritmética  $\pm$  EPM. \* $p$ <0,05 comparado com controle, \*\* $p$ <0,01 comparado com controle, <sup>##</sup> $p$ <0,01 comparado com 100 $\mu$ M segundo análise de variância (ANOVA) de uma via seguida do pós-teste de Bonferroni.

**TABELA 6** – Variação na expressão do mRNA da enzima tirosina hidroxilase em cultura de células do bulbo de ratos neonatos após tratamento com glutamato por 12 e 24 horas, na concentração de 10 $\mu$ M

	Tratamento		
	controle	12 horas	24 horas
<b>Média <math>\pm</math> DP</b>	1 $\pm$ 0	0,2 $\pm$ 0,11**	0,43 $\pm$ 0,03** <sup>#</sup>

\*\* $p < 0,01$  comparado com controle, <sup>#</sup> $p < 0,05$  comparado com 12 horas, segundo análise de variância (ANOVA) de uma via seguida do pós-teste de Bonferroni.

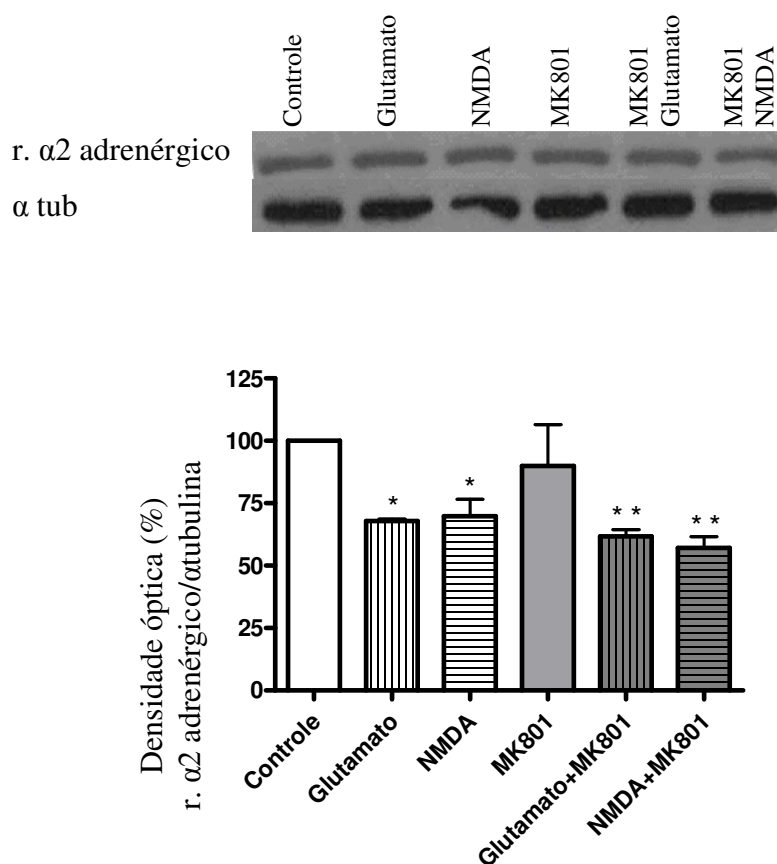


**FIGURA 9** – Variação na expressão do mRNA da enzima tirosina hidroxilase em cultura de células do bulbo de ratos Wistar após tratamento com glutamato (10 $\mu$ M) durante 12 e 24 horas. Os valores estão representados como média aritmética  $\pm$  EPM. \*\* $p < 0,01$  comparado com controle, <sup>#</sup> $p < 0,05$  comparado com 12 horas, segundo análise de variância (ANOVA) de uma via seguida do pós-teste de Bonferroni.

**TABELA 7** – Densidade óptica relativa em unidade arbitrária (u.a.), em porcentagem, do receptor  $\alpha 2$  adrenérgico, em cultura de células do bulbo de ratos neonatos após tratamento por 24 horas com 10 $\mu$ M de glutamato, 10 $\mu$ M de NMDA, 5 $\mu$ M de MK801, 10 $\mu$ M de glutamato com 5 $\mu$ M de MK801 e 10 $\mu$ M de NMDA com 5 $\mu$ M de MK801.

<b>Tratamento</b>	<b>Média<math>\pm</math>DP</b>
<b>Controle</b>	100 $\pm$ 0
<b>Glutamato</b>	68 $\pm$ 1*
<b>NMDA</b>	70 $\pm$ 10*
<b>MK801</b>	90 $\pm$ 29
<b>Glutamato+MK801</b>	62 $\pm$ 4**
<b>NMDA+MK801</b>	57 $\pm$ 6**

\* $p < 0,05$  comparado com controle, \*\* $p < 0,01$  comparado com controle, segundo análise de variância (ANOVA) de uma via seguida do pós-teste de Dunnett.



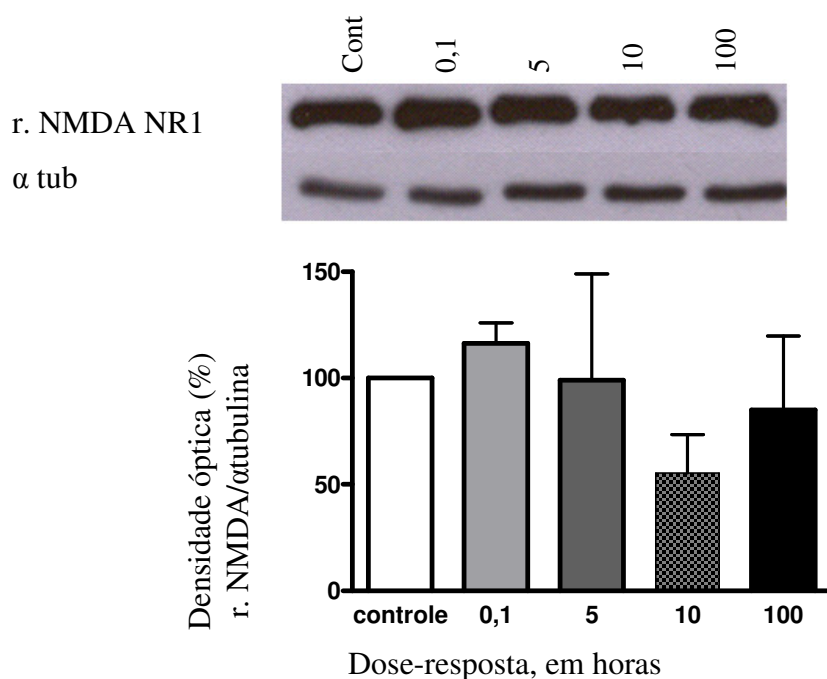
**FIGURA 10** – Densidade óptica relativa em porcentagem (%) da marcação referente ao receptor  $\alpha 2$  adrenérgico em cultura do bulbo de ratos Wistar, a partir da técnica de Western Blotting. Resultados obtidos após tratamento com  $10\mu\text{M}$  de glutamato,  $10\mu\text{M}$  de NMDA,  $5\mu\text{M}$  do antagonista de receptores NMDA MK801,  $10\mu\text{M}$  de glutamato junto com  $5\mu\text{M}$  de MK801 e  $10\mu\text{M}$  de NMDA com  $5\mu\text{M}$  de MK801, por 24 horas. Os valores foram normalizados dividindo-se o valor referente ao receptor  $\alpha 2$  adrenérgico pelo valor da  $\alpha$ -tubulina e estão representados como média aritmética  $\pm$  EPM. \* $p < 0,05$  comparado com controle, \*\* $p < 0,01$  comparado com controle, segundo análise de variância (ANOVA) de uma via seguida do pós-teste de Dunnett.

#### ***4.4 - Influência da noradrenalina sobre o receptor NMDA***

Observamos que o tratamento da cultura de células do bulbo com diferentes concentrações de noradrenalina durante um período de 24 horas não resultou em variações significantes dos níveis do receptor NMDA NR1 (TABELA 8 e FIGURA 11).

**TABELA 8** - Densidade óptica relativa em unidade arbitrária (u.a.), em porcentagem, do receptor NMDA NR1, em cultura de células do bulbo de ratos neonatos após tratamento com noradrenalina por 24 horas, nas concentrações de 0,1, 1, 10 ou 100 $\mu$ M.

	Tratamento				
	controle	0,1 $\mu$ M	5 $\mu$ M	10 $\mu$ M	100 $\mu$ M
<b>Media <math>\pm</math> DP</b>	100,0	116,4 $\pm$ 14	99 $\pm$ 87	55 $\pm$ 25	85 $\pm$ 60



**FIGURA 11** - Densidade óptica relativa em porcentagem (%) da marcação referente ao receptor NMDA NR1 em cultura do bulbo de ratos Wistar, a partir da técnica de Western Blotting. Resultados obtidos após tratamento com 0,1; 5; 10 e 100 $\mu$ M de noradrenalina por 24 horas. Os valores foram normalizados dividindo-se o valor referente ao receptor NMDA pelo valor da  $\alpha$ -tubulina e estão representados como média aritmética  $\pm$  EPM.

## 5 – Discussão

### 5.1 - Análise do tratamento sobre neurônios e astrócitos

Neste estudo, analisamos a influência do glutamato sobre a síntese da enzima tirosina hidroxilase e do receptor  $\alpha 2$  adrenérgico, assim como a influência da noradrenalina sobre o receptor NMDA, em culturas de células do bulbo de ratos. Estas análises estão relacionadas com a modulação do sistema catecolaminérgico a partir da ativação de receptores glutamatérgicos, assim como a modulação do sistema glutamatérgico a partir da estimulação de receptores noradrenérgicos. Estas análises foram realizadas em culturas de células do bulbo de ratos neonatos devido à possibilidade de realizarmos tratamentos sobre as células em um ambiente controlado, onde as únicas variáveis são as interações entre as células presentes nas culturas, assim como pela importância do bulbo para o estudo do sistema catecolaminérgico e glutamatérgico em relação ao controle neural da pressão arterial.

Diversos estudos indicam que há interações entre vias de neurotransmissão, o que aumenta ainda mais a complexidade envolvida na atuação dos neurotransmissores (Cepeda; Levine, 2006; Díaz-Cabiale *et al.*, 2007). A estimulação de uma célula - neurônio ou célula glial - por um dado neurotransmissor muitas vezes altera a afinidade de outro tipo de neurotransmissor por seus receptores, podendo levar a uma redução de receptores na membrana plasmática, bem como interferir na produção de enzimas envolvidas na produção destes neurotransmissores (Foote *et al.*, 1983; Fuxe *et al.*, 1998). Assim sendo, o papel de um neurotransmissor ao transmitir um sinal depende dos tipos de receptores que ele ativa, do tipo de célula e de outros sistemas de neurotransmissão com os quais esta via de neurotransmissão interage. Não somente isso, o efeito gerado pela atuação de neurotransmissores na célula-alvo muitas vezes também depende da frequência com que o receptor é ativado e do tempo de ativação dos



receptores, como no caso da potenciação e depressão de longo prazo (Malenka; Nicoll, 1999; Massey; Bashir, 2007).

Deve-se também levar em consideração que, após o tratamento das culturas de células, as possíveis variações observadas serão referentes à influência do tratamento tanto em neurônios como nas células gliais, tendo em vista que encontramos diversos receptores para transmissores em células gliais, assim como indícios de síntese de transmissores e de sua atuação na modulação da atividade sináptica (Ebersolt *et al.*, 1981; Aantaa *et al.*, 1995; Pfrieger; Barres, 1996; Araque; Perea, 2004). Como neste estudo avaliamos culturas mistas de neurônios e células gliais, levaremos em consideração a atuação dos tratamentos sobre os neurônios e a importância das células gliais na regulação e modulação dos sistemas de neurotransmissão.

Ao contrário do que era acreditado até poucos anos atrás, os astrócitos possuem papel relevante na modulação da atividade sináptica além de remover neurotransmissores da fenda sináptica, sustentação e manutenção dos neurônios (Araque; Perea, 2004; Araque, 2008). Sabe-se hoje que os astrócitos possuem receptores para diferentes transmissores, como glutamato (Porter; McCarthy, 1996; Pasti *et al.*, 1997; Bezzi *et al.*, 1998; Latour *et al.*, 2001) e noradrenalina (Lee *et al.*, 1998; Kulik *et al.*, 1999). A ativação destes receptores acarreta na liberação de transmissores pelos astrócitos. Estes são geralmente liberados de maneira controlada, atuando em receptores neuronais específicos (Araque; Perea, 2004) e são capazes de gerar potenciais de ação neuronais (Araque, Sanzgiri *et al.*, 1998).

São diversas as evidências que mostram que a sinalização existente entre neurônios e astrócitos é recíproca. Os astrócitos, desta forma, não apenas respondem à atividade neural, mas também ativamente modulam a excitabilidade neural e a transmissão sináptica, através da ativação de receptores astrocíticos e da liberação de

transmissores – chamados de gliotransmissores (Arcuino *et al.*, 2002; Beattie *et al.*, 2002; Navarrete; Araque, 2008). Esta interação já foi observada em diversas regiões do sistema nervoso central, apesar de ainda faltar uma caracterização detalhada deste fenômeno (Grosche *et al.*, 2002; Newman, 2004; Perea; Araque, 2005; Schipke *et al.*, 2008), assim como no sistema nervoso periférico (Colomar; Robitaille, 2004).

Uma das vias de atuação de transmissão mais estudadas em astrócitos é a via do glutamato. Trabalhos mostram que os astrócitos, ao serem estimulados por glutamato, apresentam um aumento dos níveis intracelulares de  $Ca^{2+}$  em regiões próximas da área de estimulação. Este aumento acarreta a liberação de gliotransmissores, que atuam em receptores neuronais localizados fora da fenda sináptica (Araque, Parpura *et al.*, 1998; Araque, Sanzgiri *et al.*, 1998; Araque *et al.*, 2000).

Sabemos que, nas culturas de células do bulbo utilizadas neste trabalho, encontramos tanto neurônios como astrócitos. Observamos que os astrócitos presentes nas culturas possuem extensas ramificações, que envolvem todos os neurônios presentes nas placas, assim como outros astrócitos. O tratamento das culturas com glutamato, desta forma, resulta provavelmente na ativação tanto de receptores glutamatérgicos neuronais como de astrócitos. Considerando que é conhecida a presença de receptores  $\alpha 2$  adrenérgicos em astrócitos e neurônios do tronco encefálico (Kubo, 1981; Lee *et al.*, 1998), é provável que o tratamento das células com glutamato tenha modulado a expressão de receptores  $\alpha 2$  adrenérgicos destas células. De modo similar, o tratamento das culturas de células do bulbo com noradrenalina também deve resultar na ativação de receptores  $\alpha 2$  adrenérgicos em neurônios e astrócitos, e estes também podem resultar em modulação do sistema glutamatérgico.

Contudo, como pouco é sabido até o momento sobre a modulação de sistemas de neurotransmissão em astrócitos, pouco podemos especular sobre esta via. Desta forma,

daremos maior ênfase sobre as vias de modulação sobre os neurônios, uma vez que o sistema é mais conhecido no presente momento. Tendo-se em vista que não conseguimos obter resultados significantes sobre a modulação do sistema glutamatérgico pela noradrenalina em culturas de células do bulbo, este trabalho terá ênfase sobre as possíveis vias de atuação do glutamato sobre a modulação do sistema catecolaminérgico.

As vias pelas quais o glutamato pode modular os neurônios e os seus sistemas de neurotransmissão são diversas, tendo-se em vista a grande quantidade de receptores ionotrópicos e metabotrópicos glutamatérgicos existentes, acoplados a canais iônicos com diferentes permeabilidades a íons e ligados a diferentes tipos de proteína G. Um dos principais mecanismos pelo qual o glutamato pode interferir diretamente no metabolismo celular é através da abertura dos canais do tipo NMDA (Hassel; Dingledine, 2006). Estes canais, quando abertos, permitem grande fluxo de  $\text{Ca}^{++}$  para o interior dos neurônios. O cálcio, quando no citoplasma, pode então funcionar como um mensageiro secundário e mediar uma ampla gama de respostas celulares. Quando os canais NMDA permanecem abertos por um longo intervalo de tempo, devido à alta frequência e longo período de liberação de glutamato, a presença prolongada de grande concentração de cálcio no espaço intracelular pode chegar a interferir na expressão de genes (Ghosh; Greenberg, 1995). Caso o influxo de cálcio seja muito grande, o cálcio pode se tornar tóxico e induzir a morte celular (Stout *et al.*, 1998).

Os receptores metabotrópicos glutamatérgicos, como já foi dito, estão ligados a diversas enzimas sinalizadoras. A atuação dos receptores pertencentes ao grupo I ativa a fosfolipase C e a liberação de cálcio de cisternas intracelulares. Já a ativação de receptores do tipo II e III resultam na inibição da enzima adenilil ciclase, resultando na inibição da síntese de cAMP (Kew; Kemp, 2005). Este é um importante mensageiro

secundário relacionado com diversas atividades intracelulares, dentre elas ativação da proteína-quinase A, a qual induz a ativação do fator de transcrição CREB (Lewis-Tuffin *et al.*, 2004).

Encontramos tanto receptores glutamatérgicos ionotrópicos como metabotrópicos no núcleo do trato solitário e a ativação destes está relacionada com a modulação da pressão arterial (Machado, Mauad, Chianca Jr *et al.*, 1997; Baude *et al.*, 2009). Contudo, a atuação dos receptores metabotrópicos glutamatérgicos ainda não é bem compreendida. Sabe-se que, de um modo geral, todos os subtipos encontrados no núcleo do trato solitário atuam na redução da pressão arterial quando ativados (Viard; Sapru, 2002).

Diversos trabalhos mostram que, na região medial do núcleo do trato solitário, o aumento da estimulação glutamatérgica dos neurônios por aferências leva a uma redução na força sináptica. Esta redução é caracterizada como uma redução relativa na amplitude de potenciais pós-sinápticos excitatórios e como uma redução relativa no número de potenciais de ação gerados (Chen *et al.*, 1999). Este processo ainda não é bem compreendido, mas sabe-se que está relacionado com a ativação de receptores glutamatérgicos AMPA e metabotrópicos (Baude *et al.*, 2009).

## **5.2 - Interação entre sistemas de neurotransmissão**

O sistema glutamatérgico apresenta grande importância na regulação de atividades celulares também através de sua interação com outros sistemas de neurotransmissão. A interação entre o sistema glutamatérgico e catecolaminérgico no sistema nervoso, por exemplo, está relacionada com a manutenção de diversas funções neurais em diversas regiões do sistema nervoso central (Pralong *et al.*, 2002; Cepeda; Levine, 2006).

A despolarização de neurônios pelo glutamato pode também levar a liberação de diversos transmissores, os quais podem exercer papel modulatório junto com a ativação dos receptores glutamatérgicos. Considerando a ampla variedade de neurotransmissores encontrados nos neurônios do núcleo do trato solitário (Van Giersbergen *et al.*, 1992), assim como a grande quantidade de neurônios catecolaminérgicos encontrada no bulbo (Kalia, Woodward *et al.*, 1985), existe a possibilidade de diversos neurotransmissores, especialmente a noradrenalina e a adrenalina, serem, em parte, liberados em decorrência da estimulação das células bulbares pelo glutamato.

### **5.2 .1 - Receptores NMDA, modulação da força sináptica e ativação de mensageiros secundários**

Diversos trabalhos associam a localização do receptor NMDA com a sua atuação. Se os receptores NMDA se encontrarem dentro da densidade pós-sináptica, a ativação destes levará a ativação do fator de transcrição CREB e da MAPK, gerando aumento da expressão do gene do fator neurotrófico derivado do encéfalo e do gene da tirosina hidroxilase, dentre outros. Se os receptores NMDA se encontrarem fora da densidade pós-sináptica, será observada a inibição destas vias. Inclusive, a neurotoxicidade induzida pelo glutamato, acredita-se, está associada com a estimulação de receptores fora da densidade pós-sináptica (Hardingham *et al.*, 2002; Papadia *et al.*, 2005; Ivanov *et al.*, 2006).

Estes dados levam a supor que há uma relação entre as subunidades do receptor NMDA e a atuação do receptor, uma vez que algumas das subunidades encontram-se preferencialmente fora da densidade pós-sináptica, enquanto outras se encontram majoritariamente dentro. Trabalhos realizados em culturas de células do hipocampo mostram predomínio de receptores NR2B fora da densidade pós-sináptica. Contudo, não há indícios de que a ativação de canais NMDA formados por diferentes

subunidades estejam relacionados com a ativação ou inibição da MAPK e CREB, indicando que provavelmente o tipo de receptor NMDA não é o único fator envolvido (Tang *et al.*, 1999; Krapivinsky *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2005; Bradley *et al.*, 2006; Groc *et al.*, 2006).

Estes dados mostram que o nível de cálcio intracelular não é o único determinante da atuação dos receptores de NMDA (Riccio; Ginty, 2002). As diferentes respostas induzidas por receptores NMDA, assim como trabalhos com variações na subunidade NR1 do receptor (Rao; Finkbeiner, 2007) mostram que estes receptores ativam cascatas de mensageiros secundários, e estes podem estar relacionados com diversos dos efeitos observados pela estimulação destes receptores. Como evidência de que os resultados não estão relacionados exclusivamente aos níveis intracelulares de cálcio, ao se comparar o mesmo nível de influxo de cálcio induzido por glutamato e KCl em culturas de células do hipocampo, apenas a partir da estimulação glutamatérgica se observa efeitos neurotóxicos (Hardingham *et al.*, 2002).

No tronco encefálico de ratos, ocorre o predomínio de receptores NMDA com a subunidade NR2D, localizados majoritariamente fora da densidade pós-sináptica (Guthmann; Herbert, 1999). Além disso, ao se estimular o núcleo do trato solitário de animais vivos com glutamato, observa-se o enfraquecimento da força sináptica, em um processo de depreciação de longo prazo (Miles, 1986; Chen *et al.*, 1999). Levando em consideração que os receptores NMDA localizados fora da densidade pós-sináptica estão relacionados com a inibição do fator de transcrição CREB, é possível supor que a estimulação de receptores NMDA extra-sinápticos pelo glutamato esteja induzindo a redução da expressão do gene da tirosina hidroxilase, como observado neste trabalho, tanto pela redução da força sináptica como pela inibição da fosforilação do CREB.

## 5.2 .2 - Influência do glutamato sobre a enzima tirosina hidroxilase

Estudos com neurônios adrenérgicos mostram que são diversos os estímulos relacionados com a modulação da tirosina hidroxilase, sendo alguns destes: neuropeptídeos (Wessels-Reiker *et al.*, 1991; Hiremagalur *et al.*, 1993; Wessels-Reiker *et al.*, 1993), atividade sináptica (Baker *et al.*, 1983; Baker *et al.*, 1993), hipóxia (Czyzyk-Krzeska *et al.*, 1992; Kornhauser *et al.*, 2002) e estresse (Sabban *et al.*, 1998). Em estudo realizado em culturas de células da medula adrenal de ratos, observou-se que o mensageiro secundário cAMP e o fator de transcrição CREB estão fortemente relacionados com esta modulação da expressão do gene da tirosina hidroxilase (Lewis-Tuffin *et al.*, 2004).

Nossos resultados mostram que o tratamento de culturas de células do bulbo de ratos neonatos com glutamato leva a redução nos níveis de tirosina hidroxilase após 24 horas. Podemos supor que tanto os receptores ionotrópicos como os metabotrópicos glutamatérgicos estejam relacionados com esta modulação. Como a redução observada na expressão das proteínas é crescente até a concentração de 10 $\mu$ M (FIGURA 8), poder-se-ia supor que esta redução está relacionada com o aumento dos níveis de glutamato aplicado. Ao levarmos em consideração os estímulos relacionados com o aumento da expressão da tirosina hidroxilase, é possível que o aumento da concentração de glutamato entre 0,1 $\mu$ M e 10 $\mu$ M resulte, após 24 horas, em redução de um ou mais fatores relacionados com a ativação do fator de transcrição CREB. Também é plausível a possibilidade da atuação de receptores metabotrópicos glutamatérgicos do tipo II e III, já que estes, quando ativados, inibem a síntese de cAMP, reduzindo assim a probabilidade de ativação do fator de transcrição CREB, importante para a transcrição do gene da tirosina hidroxilase.

É possível também que a redução observada seja devido a outros transmissores. As células, uma vez excitadas pelo glutamato, poderiam levar à liberação de diversos neurotransmissores diferentes, ativando assim também diversos receptores distintos. No caso, como as culturas foram realizadas a partir de células do bulbo, podemos esperar que o tratamento tenha despolarizado diversas células noradrenérgicas e adrenérgicas (Kalia, Fuxe *et al.*, 1985b; a), resultando na liberação de noradrenalina e adrenalina. Estes ativariam os receptores  $\alpha_2$  adrenérgicos presentes nas células da cultura, tanto em sítios pré- como pós-sinápticos. Como estes receptores estão acoplados à proteína  $G_i$ , estes levariam a inibição da síntese de cAMP e hiperpolarização das células pré e pós-sinápticas (Hein, 2006), novamente contribuindo para a redução nos níveis da síntese de tirosina hidroxilase.

Uma possível consequência da redução dos níveis da tirosina hidroxilase é a redução na expressão de catecolaminas pelos neurônios da cultura. Contudo, não foram verificados os níveis de catecolaminas no meio de cultura para se confirmar este fato.

### **5.2 .3 - Influência do glutamato sobre o receptor $\alpha_2$ adrenérgico**

Observamos que o tratamento das culturas de células do bulbo de ratos neonatos com glutamato leva à redução dos níveis de mRNA e de proteínas do receptor  $\alpha_2$  adrenérgico. Desta forma, a atuação do glutamato sobre a redução dos níveis deste receptor provavelmente ocorre em nível transcricional, e talvez pós-transcricional. Assim como com a tirosina hidroxilase, a redução dos níveis do receptor  $\alpha_2$  foi maior na concentração de  $10\mu\text{M}$  (FIGURA 6).

A redução dos níveis de proteína do receptor  $\alpha_2$  adrenérgico após tratamento com NMDA foi similar à observada após tratamento com glutamato. Este resultado sugere que a ativação dos receptores NMDA, dentre os receptores glutamatérgicos, é capaz de gerar resposta modulatória sobre os receptores  $\alpha_2$  adrenérgicos. Verificamos,



assim, que o receptor glutamatérgico NMDA possui papel modulatório sobre o receptor  $\alpha 2$  adrenérgico.

Como também ocorreu redução dos níveis de proteína deste receptor após tratamento com NMDA e o antagonista de receptor NMDA MK801, não é possível dizer que o antagonista está impedindo a ativação dos receptores NMDA. Como foram utilizados  $5\mu\text{M}$  de MK801 e  $10\mu\text{M}$  de NMDA, provavelmente este resultado significa que a concentração de antagonista não é suficiente para impedir a ativação de receptores pelo NMDA.

Diversos estudos, em diferentes tecidos, mostram que o aumento na estimulação de receptores  $\alpha 2$  adrenérgicos favorece a redução no número destes receptores na célula (Thomas; Hoffman, 1986; Barturen; Garcia-Sevilla, 1992; Ribas *et al.*, 1993; Heck; Bylund, 1997). Como estes receptores estão relacionados principalmente com a proteína  $G_i$ , é provável que reduções dos níveis de  $\text{Ca}^{++}$  e cAMP estejam envolvidos na modulação, assim como ocorre na modulação da tirosina hidroxilase.

A redução dos níveis de receptor  $\alpha 2$  adrenérgico na cultura, associada a uma possível redução nos níveis de expressão das catecolaminas, poderia indicar que menores taxas de noradrenalina e adrenalina estariam sendo liberadas pelos neurônios e que haveria ainda uma menor quantidade de receptores neuronais para ser ativado.

### **5.3 - Interação entre transmissores e modulação da pressão arterial**

O sistema catecolaminérgico, assim como o glutamatérgico, apresenta grande importância no controle da pressão arterial. A estimulação de receptores  $\alpha 2$  adrenérgicos no núcleo do trato solitário, tanto pela noradrenalina quanto pela adrenalina, leva a redução da pressão arterial (Sved *et al.*, 1992; Van Giersbergen *et al.*,

1992; Hayward *et al.*, 2002). Um papel importante deste receptor é a sua interação com outros receptores também relacionados com o controle da pressão arterial. (Hayward *et al.*, 2002); (Díaz-Cabiale *et al.*, 2007)

O transmissor angiotensina II, por exemplo, é um peptídeo relacionado com a modulação da pressão arterial tanto na periferia quanto no sistema nervoso central (Ferrario *et al.*, 1972; Reid, 1992; Díaz-Cabiale *et al.*, 2007), estando presente no núcleo do trato solitário e nas regiões catecolaminérgicas A1 e C1 (Coveñas *et al.*, 1990). Observa-se que tratamentos com angiotensina II podem levar a uma redução na afinidade da noradrenalina pelos receptores  $\alpha_2$  adrenérgicos, mediados pelo receptor AT1 da angiotensina II (Fior *et al.*, 1994). Existem evidências também de que o receptor  $\alpha_2$  adrenérgico interage com receptores do neuropeptídeo Y (Yang, Fior, Hedlund, Agnati *et al.*, 1994), assim como receptores de galanina (Díaz-Cabiale *et al.*, 2005).

Observamos a importância dos receptores  $\alpha_2$  adrenérgicos quando comparamos animais espontaneamente hipertensos e normotensos. O sistema adrenérgico está alterado em animais espontaneamente hipertensos quando comparados com animais normotensos. Observamos, dentre outras alterações, que há menor quantidade de noradrenalina e menor densidade de receptores  $\alpha_2$  adrenérgicos no núcleo do trato solitário (Sautel *et al.*, 1988; Yao *et al.*, 1989; Yang, Fior, Hedlund, Narváez *et al.*, 1994). Observamos também que, em animais hipertensos, há maior liberação de noradrenalina no núcleo do trato solitário (Teschmacher *et al.*, 2008), maior recaptção de noradrenalina em cultura de células de animais hipertensos após estimulação por angiotensina II, assim como maior atuação dos receptores  $\alpha_2$  adrenérgicos no controle do barorreflexo de animais espontaneamente hipertensos (Hayward *et al.*, 2002). Assim sendo, estas diferenças relacionadas com o receptor  $\alpha_2$  adrenérgico entre animais

espontaneamente hipertensos e normotensos podem estar relacionadas com a hipertensão essencial.

Poder-se-ia especular, a partir das evidências citadas, que os receptores  $\alpha_2$  adrenérgicos sejam de grande importância para a manutenção do barorreflexo, atuando em conjunto com diversos outros receptores. Alterações na quantidade ou sensibilidade destes receptores podem, de algum modo, estar relacionados com um desbalanço deste controle e estar na origem da hipertensão essencial.

As evidências obtidas neste trabalho sugerem que, uma vez que o glutamato é capaz de modular a expressão do receptor  $\alpha_2$  adrenérgico e da tirosina hidroxilase em cultura de células do bulbo, é possível que o glutamato possua efeito modulatório similar no bulbo de animais vivos. Como o receptor  $\alpha_2$  adrenérgico está relacionado com diversos outros receptores, pode-se supor que esta modulação do sistema catecolaminérgico influencie vários dos sistemas de neurotransmissão que interagem com este. Deste modo, é possível que o glutamato seja capaz de modular diversas outras vias de neurotransmissão direta ou indiretamente.

## 6 - Conclusão

Com base nos resultados obtidos neste estudo, pode-se concluir que:

- O glutamato é capaz de modular os níveis da enzima tirosina hidroxilase em culturas de células do bulbo de ratos neonatos, reduzindo a expressão de mRNA e de proteínas desta enzima 24 horas após o tratamento
- O glutamato é capaz de modular os níveis do receptor  $\alpha 2$  adrenérgico em culturas de células do bulbo de ratos neonatos, reduzindo a expressão de mRNA e de proteínas deste receptor 24 horas após o tratamento
- O receptor NMDA modula os níveis do receptor  $\alpha 2$  adrenérgico em culturas de células do bulbo de ratos neonatos, reduzindo a expressão de proteínas deste receptor 24 horas após tratamento com agonista

## Referências:

AANTAA, R.; MARJAMAKI, A.; SCHEININ, M. Molecular pharmacology of alpha 2-adrenoceptor subtypes. *Ann Med*, v. 27, n. 4, p. 439-49, Aug 1995.

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. 107-10, Jan 15 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. 119-32, 1999.

ALEXANDER, R. S. Tonic and reflex functions of medullary sympathetic cardiovascular centers. *J Neurophysiol*, v. 9, p. 205-217, 1946.

ANDRESEN, M. C.; KUNZE, D. L. Nucleus tractus solitarius--gateway to neural circulatory control. *Annu Rev Physiol*, v. 56, p. 93-116, 1994.

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.

ARAQUE, A. Astrocytes process synaptic information. *Neuron Glia Biol.*, v. 4, n. 1, p. 3-10, 2008.

ARAQUE, A.; LI, N.; DOYLE, R. T.; HAYDON, P. G. SNARE protein-dependent glutamate release from astrocytes. *J Neurosci.*, v. 20, n. 2, p. 666-673, 2000.

ARAQUE, A.; PARPURA, V.; SANZGIRI, R. P.; HAYDON, P. G. Glutamate-dependent astrocyte modulation of synaptic transmission between cultured hippocampal neurons. *Eur J Neurosci.*, v. 10, n. 6, p. 2129-2142, 1998.

ARAQUE, A.; PEREA, G. Glial modulation of synaptic transmission in culture. *Glia*, v. 47, n. 3, p. 241-8, Aug 15 2004.

ARAQUE, A.; SANZGIRI, R. P.; PARPURA, V.; HAYDON, P. G. Calcium elevation in astrocytes causes an NMDA receptor-dependent increase in the frequency of miniature synaptic currents in cultured hippocampal neurons. *J Neurosci.*, v. 18, n. 17, p. 6822-6829, 1998.

ARCUINO, G.; LIN, J. H. C.; TAKANO, T.; LIU, C.; JIANG, L.; GAO, Q.; KANG, J.; NEDERGAARD, M. Intercellular calcium signaling mediated by point-source burst release of ATP. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, v. 99, n. 15, p. 9840-9845, 2002.

ATTWELL, D. Brain uptake of glutamate: food for thought. *J Nutr*, v. 130, n. 4S Suppl, p. 1023S-5S, Apr 2000.

BAKER, H.; KAWANO, T.; MARGOLIS, F. L.; JOH, T. H. Transneuronal regulation of tyrosine hydroxylase expression in olfactory bulb of mouse and rat. *J Neurosci*, v. 3, n. 1, p. 69-78, Jan 1983.

BAKER, H.; MOREL, K.; STONE, D. M.; MARUNIAK, J. A. Adult naris closure profoundly reduces tyrosine hydroxylase expression in mouse olfactory bulb. *Brain Res*, v. 614, n. 1-2, p. 109-16, Jun 18 1993.

BARTUREN, F.; GARCIA-SEVILLA, J. A. Long term treatment with desipramine increases the turnover of alpha 2-adrenoceptors in the rat brain. *Mol Pharmacol*, v. 42, n. 5, p. 846-55, Nov 1992.

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, Jan 1973.

BEATTIE, E. C.; STELLWAGEN, D.; MORISHITA, W.; BRESNAHAN, J. C.; HA, B. K.; VON ZASTROW, M.; BEATTIE, M. S.; MALENKA, R. C. Control of synaptic strength by glial TNFalpha. *Science (New York, N.Y.)*, v. 295, n. 5563, p. 2282-2285, 2002.

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. 230-3, Sep 21 1989.

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.

BEZZI, P.; CARMIGNOTO, G.; PASTI, L.; VESCE, S.; ROSSI, D.; RIZZINI, B. L.; POZZAN, T.; VOLTERRA, A. Prostaglandins stimulate calcium-dependent glutamate release in astrocytes. *Nature*, v. 391, n. 6664, p. 281-285, 1998.

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.

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

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.

BLESSING, W. W.; HOWE, P. R.; JOH, T. H.; OLIVER, J. R.; WILLOUGHBY, J. O. Distribution of tyrosine hydroxylase and neuropeptide Y-like immunoreactive neurons in rabbit medulla oblongata, with attention to colocalization studies, presumptive

adrenaline-synthesizing perikarya, and vagal preganglionic cells. *J Comp Neurol*, v. 248, n. 2, p. 285-300, Jun 8 1986.

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.

BRADLEY, J.; CARTER, S. R.; RAO, V. R.; WANG, J.; FINKBEINER, S. Splice variants of the NR1 subunit differentially induce NMDA receptor-dependent gene expression. *J Neurosci*, v. 26, n. 4, p. 1065-76, Jan 25 2006.

BUIJS, R. M.; SWAAB, D. F.; DOGTEROM, J.; VAN LEEUWEN, F. W. Intra- and extrahypothalamic vasopressin and oxytocin pathways in the rat. *Cell Tissue Res*, v. 186, n. 3, p. 423-33, Jan 31 1978.

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.; DA SILVA, S.; FIOR-CHADI, D. Adenosine modulates alpha2-adrenergic receptors through a phospholipase C pathway in brainstem cell culture of rats. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical*, v., 2009.

CEPEDA, C.; LEVINE, M. S. Where do you think you are going? The NMDA-D1 receptor trap. *Sci STKE*, v. 2006, n. 333, p. pe20-pe20, 2006.

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.-Y.; HOROWITZ, J. M.; BONHAM, A. C. A presynaptic mechanism contributes to depression of autonomic signal transmission in NTS. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, v. 277, n. 4, p. H1350-1360-H1350-1360, 1999.

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.

COLLINGRIDGE, G. L.; LESTER, R. A. Excitatory amino acid receptors in the vertebrate central nervous system. *Pharmacol Rev*, v. 41, n. 2, p. 143-210, Jun 1989.

COLOMAR, A.; ROBITAILLE, R. Glial modulation of synaptic transmission at the neuromuscular junction. *Glia*, v. 47, n. 3, p. 284-289, 2004.

COLOMBARI, E.; BONAGAMBA, L. G.; MACHADO, B. H. Mechanisms of pressor and bradycardic responses to L-glutamate microinjected into the NTS of conscious rats. *Am J Physiol*, v. 266, n. 3 Pt 2, p. R730-8, Mar 1994.

COLOMBARI, E.; MENANI, J. V.; TALMAN, W. T. Commissural NTS contributes to pressor responses to glutamate injected into the medial NTS of awake rats. *Am J Physiol*, v. 270, n. 6 Pt 2, p. R1220-5, Jun 1996.

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

COVEÑAS, R.; FUXE, K.; CINTRA, A.; AGUIRRE, J. A.; GOLDSTEIN, M.; GANTEN, D. Evidence for the existence of angiotensin II like immunoreactivity in subpopulations of tyrosine hydroxylase immunoreactive neurons in the A1 and C1 area of the ventral medulla of the male rat. *Neurosci Lett.*, v. 114, n. 2, p. 160-166, 1990.

COWLEY, A. Long-term control of arterial blood pressure. v. 72. n. 1: *Am Physiological Soc*, 1992. p. 231-300.

CULL-CANDY, S.; KELLY, L.; FARRANT, M. Regulation of Ca<sup>2+</sup>-permeable AMPA receptors: synaptic plasticity and beyond. *Curr Opin Neurobiol*, v. 16, n. 3, p. 288-97, Jun 2006.

CULL-CANDY, S. G.; OGDEN, D. C. Ion channels activated by L-glutamate and GABA in cultured cerebellar neurons of the rat. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, v. 224, n. 1236, p. 367-73, May 22 1985.

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.

CZYZYK-KRZESKA, M. F.; BAYLISS, D. A.; LAWSON, E. E.; MILLHORN, D. E. Regulation of tyrosine hydroxylase gene expression in the rat carotid body by hypoxia. *J Neurochem*, v. 58, n. 4, p. 1538-46, Apr 1992.

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. Functional organization of central cardiovascular pathways. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, v. 8, n. 3, p. 241-259, 1981.

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. *Prog Neurobiol*, v. 65, n. 1, p. 1-105, Sep 2001.



DE PAULA, P. M.; BRANCO, L. G. Glutamatergic receptors of the rostral ventrolateral medulla are involved in the ventilatory response to hypoxia. *Respir Physiol Neurobiol*, v. 146, n. 2-3, p. 125-34, Apr 15 2005.

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.

DÍAZ-CABIALE, Z.; PARRADO, C.; VELA, C.; RAZANI, H.; COVEÑAS, R.; FUXE, K.; NARVÁEZ, J. A. Role of galanin and galanin(1-15) on central cardiovascular control. *Neuropeptides*, v. 39, n. 3, p. 185-190, 2005.

EBERSOLT, C.; PEREZ, M.; BOCKAERT, J. Alpha 1 and alpha 2 Adrenergic receptors in mouse brain astrocytes from primary cultures. *J Neurosci Res*, v. 6, n. 5, p. 643-52, 1981.

FERRARIO, C. M.; GILDENBERG, P. L.; MCCUBBIN, J. W. Cardiovascular effects of angiotensin mediated by the central nervous system. *Circ Res.*, v. 30, n. 3, p. 257-262, 1972.

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. 271-82, Sep 12 1994.

FOOTE, S. L.; BLOOM, F. E.; ASTON-JONES, G. Nucleus locus ceruleus: new evidence of anatomical and physiological specificity. *Physiol Rev*, v. 63, n. 3, p. 844-914, Jul 1983.

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.

FUXE, K.; FERRE, S.; ZOLI, M.; AGNATI, L. F. Integrated events in central dopamine transmission as analyzed at multiple levels. Evidence for intramembrane adenosine A2A/dopamine D2 and adenosine A1/dopamine D1 receptor interactions in the basal ganglia. *Brain Res Brain Res Rev*, v. 26, n. 2-3, p. 258-73, May 1998.

GHOSH, A.; GREENBERG, M. E. Calcium signaling in neurons: molecular mechanisms and cellular consequences. *Science*, v. 268, n. 5208, p. 239-47, Apr 14 1995.

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, Sep 15 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.

GROC, L.; HEINE, M.; COUSINS, S. L.; STEPHENSON, F. A.; LOUNIS, B.; COGNET, L.; CHOQUET, D. NMDA receptor surface mobility depends on NR2A-2B subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 103, n. 49, p. 18769-74, Dec 5 2006.

GROSCHKE, J.; KETTENMANN, H.; REICHENBACH, A. Bergmann glial cells form distinct morphological structures to interact with cerebellar neurons. *J Neurosci Res.*, v. 68, n. 2, p. 138-149, 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. 501-17, Dec 27 1999.

HARDINGHAM, G. E.; FUKUNAGA, Y.; BADING, H. Extrasynaptic NMDARs oppose synaptic NMDARs by triggering CREB shut-off and cell death pathways. *Nat Neurosci*, v. 5, n. 5, p. 405-14, May 2002.

HASSEL, B.; DINGLELINE, R. Glutamate. In: SIEGEL, G. J. *et al* (Ed.). *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects*: Academic Press, 2006.

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. H2336-2345-H2336-2345, 2002.

HECK, D. A.; BYLUND, D. B. Mechanism of down-regulation of alpha-2 adrenergic receptor subtypes. *J Pharmacol Exp Ther.*, v. 282, n. 3, p. 1219-1227, 1997.

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

HESTRIN, S.; NICOLL, R. A.; PERKEL, D. J.; SAH, P. Analysis of excitatory synaptic action in pyramidal cells using whole-cell recording from rat hippocampal slices. *J Physiol*, v. 422, p. 203-25, Mar 1990.

HESTRIN, S.; SAH, P.; NICOLL, R. A. Mechanisms generating the time course of dual component excitatory synaptic currents recorded in hippocampal slices. *Neuron*, v. 5, n. 3, p. 247-53, Sep 1990.

HIREMAGALUR, B.; NANKOVA, B.; NITAHARA, J.; ZEMAN, R.; SABBAN, E. L. Nicotine increases expression of tyrosine hydroxylase gene. Involvement of protein kinase A-mediated pathway. *J Biol Chem*, v. 268, n. 31, p. 23704-11, Nov 5 1993.

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, Jul 2001.

HOUSLEY, G. D.; SINCLAIR, J. D. Localization by kainic acid lesions of neurones transmitting the carotid chemoreceptor stimulus for respiration in rat. *J Physiol*, v. 406, p. 99-114, Dec 1988.

IVANOV, A.; PELLEGRINO, C.; RAMA, S.; DUMALSKA, I.; SALYHA, Y.; BEN-ARI, Y.; MEDINA, I. Opposing role of synaptic and extrasynaptic NMDA receptors in regulation of the extracellular signal-regulated kinases (ERK) activity in cultured rat hippocampal neurons. *J Physiol*, v. 572, n. Pt 3, p. 789-98, May 1 2006.

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. 343-53, Mar 1995.

JOHNSON, J. W.; ASCHER, P. Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons. *Nature*, v. 325, n. 6104, p. 529-31, Feb 5-11 1987.

KALIA, M. Brain stem localization of vagal preganglionic neurons. *J Auton Nerv Syst*, v. 3, n. 2-4, p. 451-81, Apr 1981.

KALIA, M.; FUXE, K.; GOLDSTEIN, M. Rat medulla oblongata. II. Dopaminergic, noradrenergic (A1 and A2) and adrenergic neurons, nerve fibers, and presumptive terminal processes. *J Comp Neurol*, v. 233, n. 3, p. 308-32, Mar 15 1985a.

\_\_\_\_\_. Rat medulla oblongata. III. Adrenergic (C1 and C2) neurons, nerve fibers and presumptive terminal processes. *J Comp Neurol*, v. 233, n. 3, p. 333-49, Mar 15 1985b.

KALIA, M.; MESULAM, M. M. Brain stem projections of sensory and motor components of the vagus complex in the cat: I. The cervical vagus and nodose ganglion. *J Comp Neurol*, v. 193, n. 2, p. 435-65, Sep 15 1980.

KALIA, M.; WOODWARD, D. J.; SMITH, W. K.; FUXE, K. Rat medulla oblongata. IV. Topographical distribution of catecholaminergic neurons with quantitative three-dimensional computer reconstruction. *J Comp Neurol*, v. 233, n. 3, p. 350-64, Mar 15 1985.

KELLER, B. U.; KONNERTH, A.; YAARI, Y. Patch clamp analysis of excitatory synaptic currents in granule cells of rat hippocampus. *J Physiol*, v. 435, p. 275-93, Apr 1991.

KEW, J. N.; KEMP, J. A. Ionotropic and metabotropic glutamate receptor structure and pharmacology. *Psychopharmacology (Berl)*, v. 179, n. 1, p. 4-29, Apr 2005.

KIM, M. J.; DUNAH, A. W.; WANG, Y. T.; SHENG, M. Differential roles of NR2A- and NR2B-containing NMDA receptors in Ras-ERK signaling and AMPA receptor trafficking. *Neuron*, v. 46, n. 5, p. 745-60, Jun 2 2005.

KIVELL, B. M.; MCDONALD, F. J.; MILLER, J. H. Serum-free culture of rat post-natal and fetal brainstem neurons. *Brain Res Dev Brain Res*, v. 120, n. 2, p. 199-210, Apr 14 2000.

KORNHAUSER, J. M.; COWAN, C. W.; SHAYWITZ, A. J.; DOLMETSCH, R. E.; GRIFFITH, E. C.; HU, L. S.; HADDAD, C.; XIA, Z.; GREENBERG, M. E. CREB

transcriptional activity in neurons is regulated by multiple, calcium-specific phosphorylation events. *Neuron*, v. 34, n. 2, p. 221-33, Apr 11 2002.

KRAPIVINSKY, G.; KRAPIVINSKY, L.; MANASIAN, Y.; IVANOV, A.; TYZIO, R.; PELLEGRINO, C.; BEN-ARI, Y.; CLAPHAM, D. E.; MEDINA, I. The NMDA receptor is coupled to the ERK pathway by a direct interaction between NR2B and RasGRF1. *Neuron*, v. 40, n. 4, p. 775-84, Nov 13 2003.

KUBO, T., MISU, Y. Pharmacological characterization of the  $\alpha$ -adrenoceptors responsible for a decrease of blood pressure in the nucleus tractus solitarii of the rat. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, v. 317, p. 120-125, 1981.

KUHAR, M. J.; MINNEMAN, K.; MULY, E. C. Catecholamines. In: SIEGEL, G. J. *et al* (Ed.). *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects*: Academic Press, 2006. p. 992.

KULIK, A.; HAENTZSCH, A.; LÜCKERMANN, M.; REICHELT, W.; BALLANYI, K. Neuron-glia signaling via  $\alpha(1)$  adrenoceptor-mediated  $Ca(2+)$  release in Bergmann glial cells in situ. *J Neurosci.*, v. 19, n. 19, p. 8401-8408, 1999.

KUMADA, M.; DAMPNEY, R.; REIS, D. Profound hypotension and abolition of the vasomotor component of the cerebral ischemic response produced by restricted lesions of medulla oblongata in rabbit. Relationship to the so-called tonic vasomotor center. *Circulation Research*, v. 45, n. 1, p. 63-70, 1979.

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.

LAAKE, J. H.; TAKUMI, Y.; EIDET, J.; TORGNER, I. A.; ROBERG, B.; KVAMME, E.; OTTERSEN, O. P. Postembedding immunogold labelling reveals subcellular localization and pathway-specific enrichment of phosphate activated glutaminase in rat cerebellum. *Neuroscience*, v. 88, n. 4, p. 1137-51, 1999.

LATOUR, I.; GEE, C. E.; ROBITAILLE, R.; LACAILLE, J. C. Differential mechanisms of  $Ca^{2+}$  responses in glial cells evoked by exogenous and endogenous glutamate in rat hippocampus. *Hippocampus*, v. 11, n. 2, p. 132-145, 2001.

LE GALLOUDEC, E.; MERAHI, N.; LAGUZZI, R. Cardiovascular changes induced by the local application of glutamate-related drugs in the rat nucleus tractus solitarii. *Brain Res*, v. 503, n. 2, p. 322-5, Dec 4 1989.

LEE, A.; ROSIN, D. L.; VAN BOCKSTAELE, E. J.  $[\alpha]2A$ -adrenergic receptors in the rat nucleus locus coeruleus: subcellular localization in catecholaminergic dendrites, astrocytes, and presynaptic axon terminals. *Brain Research*, v. 795, n. 1-2, p. 157-169, 1998.

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.

LU, D.; YU, K.; PADDY, M. R.; ROWLAND, N. E.; RAIZADA, M. K. Regulation of norepinephrine transport system by angiotensin II in neuronal cultures of normotensive and spontaneously hypertensive rat brains. *Endocrinology*, v. 137, n. 2, p. 763-772, 1996.

MACHADO, B. H.; BONAGAMBA, L. G. Microinjection of L-glutamate into the nucleus tractus solitarii increases arterial pressure in conscious rats. *Brain Res*, v. 576, n. 1, p. 131-8, Mar 27 1992.

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. 602-7, Jun 1988.

MACHADO, B. H.; MAUAD, H.; CHIANCA JR, D. A.; HAIBARA, A. S.; COLOMBARI, E. Autonomic processing of the cardiovascular reflexes in the nucleus tractus solitarii. *Braz J Med Biol Res*, 1997.

MACHADO, B. H.; MAUAD, H.; CHIANCA JUNIOR, D. A.; HAIBARA, A. S.; COLOMBARI, E. Autonomic processing of the cardiovascular reflexes in the nucleus tractus solitarii. *Braz J Med Biol Res*, v. 30, n. 4, p. 533-43, Apr 1997.

MALENKA, R. C.; NICOLL, R. A. Long-term potentiation--a decade of progress? *Science*, v. 285, n. 5435, p. 1870-4, 1999.

MALEY, B. E. Immunohistochemical localization of neuropeptides and neurotransmitters in the nucleus solitarius. *Chem Senses*, v. 21, n. 3, p. 367-76, Jun 1996.

MARCHETTI, C.; CARBONE, E.; LUX, H. D. Effects of dopamine and noradrenaline on Ca channels of cultured sensory and sympathetic neurons of chick. *Pflugers Arch*, v. 406, n. 2, p. 104-11, Feb 1986.

MARTINEZ-HERNANDEZ, A.; BELL, K. P.; NORENBERG, 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. 176-184, 2007.

MAYER, M. L.; VYKLIČKY, 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.

MIFFLIN, S. W. Arterial chemoreceptor input to nucleus tractus solitarius. *Am J Physiol*, v. 263, n. 2 Pt 2, p. R368-75, Aug 1992.

MIFFLIN, S. W.; SPYER, K. M.; WITHINGTON-WRAY, D. J. Baroreceptor inputs to the nucleus tractus solitarius in the cat: modulation by the hypothalamus. *J Physiol*, v. 399, p. 369-87, May 1988.

MILES, R. Frequency dependence of synaptic transmission in nucleus of the solitary tract in vitro. *J Neurophysiol*, v. 55, n. 5, p. 1076-90, May 1986.

MIURA, M.; REIS, D. Termination and secondary projections of carotid sinus nerve in the cat brain stem. *American Journal of Physiology*, v. 217, n. 1, p. 142-153, 1969.

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.

NAVARRETE, M.; ARAQUE, A. Endocannabinoids mediate neuron-astrocyte communication. *Neuron*, v. 57, n. 6, p. 883-893, 2008.

NEWMAN, E. A. A dialogue between glia and neurons in the retina: modulation of neuronal excitability. *Neuron Glia Biology*, v. 1, n. 3, p. 245-252, 2004.

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

NILAVER, G.; ZIMMERMAN, E. A.; WILKINS, J.; MICHAELS, J.; HOFFMAN, D.; SILVERMAN, A. J. Magnocellular hypothalamic projections to the lower brain stem and spinal cord of the rat. Immunocytochemical evidence for predominance of the oxytocin-neurophysin system compared to the vasopressin-neurophysin system. *Neuroendocrinology*, v. 30, n. 3, p. 150-8, 1980.

OTTERSEN, O. P.; TAKUMI, Y.; MATSUBARA, A.; LANDSEND, A. S.; LAAKE, J. H.; USAMI, S. Molecular organization of a type of peripheral glutamate synapse: the afferent synapses of hair cells in the inner ear. *Prog Neurobiol*, v. 54, n. 2, p. 127-48, Feb 1998.

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. 519-34, 1992.

PAPADIA, S.; STEVENSON, P.; HARDINGHAM, N. R.; BADING, H.; HARDINGHAM, G. E. Nuclear Ca<sup>2+</sup> and the cAMP response element-binding protein family mediate a late phase of activity-dependent neuroprotection. *J Neurosci*, v. 25, n. 17, p. 4279-87, Apr 27 2005.

PASTI, L.; VOLTERRA, A.; POZZAN, T.; CARMIGNOTO, G. Intracellular calcium oscillations in astrocytes: a highly plastic, bidirectional form of communication between neurons and astrocytes in situ. *J Neurosci.*, v. 17, n. 20, p. 7817-7830, 1997.

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

PEREA, G.; ARAQUE, A. Properties of synaptically evoked astrocyte calcium signal reveal synaptic information processing by astrocytes. *J Neurosci.*, v. 25, n. 9, p. 2192-2203, 2005.

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

PFRIEGER, F. W.; BARRES, B. A. New views on synapse-glia interactions. *Curr Opin Neurobiol*, v. 6, n. 5, p. 615-21, Oct 1996.

PORTER, J. T.; MCCARTHY, K. D. Hippocampal astrocytes in situ respond to glutamate released from synaptic terminals. *J Neurosci.*, v. 16, n. 16, p. 5073-5081, 1996.

POTTS, J. T. Inhibitory neurotransmission in the nucleus tractus solitarii: implications for baroreflex resetting during exercise. *Exp Physiol*, v. 91, n. 1, p. 59-72, Jan 2006.

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.

RAO, V. R.; FINKBEINER, S. NMDA and AMPA receptors: old channels, new tricks. *Trends Neurosci*, v. 30, n. 6, p. 284-91, Jun 2007.

REID, I. A. Interactions between ANG II, sympathetic nervous system, and baroreceptor reflexes in regulation of blood pressure. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, v. 262, n. 6, p. E763-778-E763-778, 1992.

RIBAS, C.; MIRALLES, A.; GARCIA-SEVILLA, J. A. Acceleration by chronic treatment with clorgyline of the turnover of brain alpha 2-adrenoceptors in normotensive but not in spontaneously hypertensive rats. *Br J Pharmacol*, v. 110, n. 1, p. 99-106, Sep 1993.

RICCIO, A.; GINTY, D. D. What a privilege to reside at the synapse: NMDA receptor signaling to CREB. *Nat Neurosci*, v. 5, n. 5, p. 389-90, May 2002.

SABBAN, E. L.; NANKOVA, B. B.; SEROVA, L. I.; HIREMAGALUR, B.; RUSNAK, M.; SAEZ, E.; SPIEGELMAN, B.; KVETNANSKY, R. Regulation of gene expression of catecholamine biosynthetic enzymes by stress. *Adv Pharmacol*, v. 42, p. 564-7, 1998.

SAGAWA, K. *Baroreflex control of systemic arterial pressure and vascular bed.*, 1983. (Handbook of Physiology, section 2, The Cardiovascular System).

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.

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. 515-39, Feb 1993.

SAUTEL, M.; SACQUET, J.; VINCENT, M.; SASSARD, J. NE turnover in genetically hypertensive rats of Lyon strain. I. Brain nuclei. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, v. 255, n. 4, p. H729-735-H729-735, 1988.

SAWCHENKO, P. E.; SWANSON, L. W. Immunohistochemical identification of neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus that project to the medulla or to the spinal cord in the rat. *J Comp Neurol*, v. 205, n. 3, p. 260-72, Mar 1 1982.

SCHIPKE, C. G.; HAAS, B.; KETTENMANN, H. Astrocytes discriminate and selectively respond to the activity of a subpopulation of neurons within the barrel cortex. *Cereb Cortex*, v. 18, n. 10, p. 2450-2459, 2008.

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.

SPYER, K. Neural organisation and control of the baroreceptor reflex. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, v. 88, n. -1, p. 23-124, 1981.

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

STOUT, A. K.; RAPHAEL, H. M.; KANTEREWICZ, B. I.; KLANN, E.; REYNOLDS, I. J. Glutamate-induced neuron death requires mitochondrial calcium uptake. *Nat Neurosci*, v. 1, n. 5, p. 366-373, 1998.

SVED, A. F.; TSUKAMOTO, K.; SCHREIHOFER, 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, 1992.

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.

TANG, Y. P.; SHIMIZU, E.; DUBE, G. R.; RAMPON, C.; KERCHNER, G. A.; ZHUO, M.; LIU, G.; TSIEN, J. Z. Genetic enhancement of learning and memory in mice. *Nature*, v. 401, n. 6748, p. 63-9, Sep 2 1999.

TESCHEMACHER, A. G.; WANG, S.; RAIZADA, M. K.; PATON, J. F. R.; KASPAROV, S. Area-specific differences in transmitter release in central catecholaminergic neurons of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*, v. 52, n. 2, p. 351-358, 2008.



THOMAS, J. M.; HOFFMAN, B. B. Agonist-induced down-regulation of muscarinic cholinergic and alpha 2-adrenergic receptors after inactivation of Ni by pertussis toxin. *Endocrinology*, v. 119, n. 3, p. 1305-14, Sep 1986.

TOLBERT, L. M.; RUSSELL, D. S.; DUMAN, R. S. Norepinephrine activates extracellular-regulated kinase in cortical neurons. *Biol Psychiatry*, v. 54, n. 10, p. 983-93, Nov 15 2003.

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 DER KOOY, D.; KODA, L. Y.; MCGINTY, J. F.; GERFEN, C. R.; BLOOM, F. E. The organization of projections from the cortex, amygdala, and hypothalamus to the nucleus of the solitary tract in rat. *J Comp Neurol*, v. 224, n. 1, p. 1-24, Mar 20 1984.

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, 1992.

VARDHAN, A.; KACHROO, A.; SAPRU, H. N. Excitatory amino acid receptors in commissural nucleus of the NTS mediate carotid chemoreceptor responses. *Am J Physiol*, v. 264, n. 1 Pt 2, p. R41-50, Jan 1993a.

\_\_\_\_\_. Excitatory amino acid receptors in the nucleus tractus solitarius mediate the responses to the stimulation of cardio-pulmonary vagal afferent C fiber endings. *Brain Res*, v. 618, n. 1, p. 23-31, Jul 30 1993b.

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. *J Neurosci Res.*, v. 71, n. 6, p. 811-818, 2003.

VIARD, E.; SAPRU, H. N. Cardiovascular responses to activation of metabotropic glutamate receptors in the nTS of the rat. *Brain Res.*, v. 952, n. 2, p. 308-321, 2002.

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.

WESSELS-REIKER, M.; BASIBOINA, R.; HOWLETT, A. C.; STRONG, R. Vasoactive intestinal polypeptide-related peptides modulate tyrosine hydroxylase gene expression in PC12 cells through multiple adenylate cyclase-coupled receptors. *J Neurochem*, v. 60, n. 3, p. 1018-29, Mar 1993.

WESSELS-REIKER, M.; HAYCOCK, J. W.; HOWLETT, A. C.; STRONG, R. Vasoactive intestinal polypeptide induces tyrosine hydroxylase in PC12 cells. *J Biol Chem*, v. 266, n. 15, p. 9347-50, May 25 1991.

YANG, S. N.; FIOR, D. R.; HANSSON, A. C.; CINTRA, A.; CASTELLANO, M.; GANTEN, U.; GANTEN, D.; AGNATI, L. F.; FUXE, K. Increased potency of neuropeptide Y to antagonize  $\alpha_2$ -adrenoceptor function in the nucleus tractus solitarius of the spontaneously hypertensive rat. *Neuroscience*, v. 78, n. 3, p. 803-813, 1997.

YANG, S. N.; FIOR, D. R.; HEDLUND, P. B.; AGNATI, L. F.; FUXE, K. Antagonistic regulation of  $\alpha_2$ -adrenoceptors by neuropeptide Y receptor subtypes in the nucleus tractus solitarius. *Eur J Pharmacol*, v. 271, p. 201-212, 1994.

YANG, S. N.; FIOR, D. R.; HEDLUND, P. B.; NARVÁEZ, J. A.; AGNATI, L. F.; FUXE, K. Coinjections of NPY(1-36) or [Leu31,Pro34]NPY with adrenaline in the nucleus tractus solitarius of the rat counteract the vasodepressor responses to adrenaline. *Neuroscience Letters*, v. 171, n. 1-2, p. 27-31, 1994.

YAO, H.; MATSUMOTO, T.; HIRANO, M.; KUROKI, T.; TSUTSUMI, T.; UCHIMURA, H.; NAKAMURA, K.; NAKAHARA, T.; FUJISHIMA, M. Involvement of brain stem noradrenergic neurons in the development of hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Neurochem Res*, v. 14, n. 1, p. 75-79, 1989.

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.