

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 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>12</b>
<i>1.1 - Controle da pressão arterial pelo sistema nervoso.....</i>	<i>12</i>
<i>1.2 - Neurotransmissores atuantes na modulação da pressão arterial.....</i>	<i>15</i>
1.2.1 - Glutamato .....	16
1.2.2 - Catecolaminas .....	20
1.3 – <i>Interação entre sistemas de neurotransmissão.....</i>	<i>23</i>
1.4 – <i>Estudos em organismos vivos e em culturas de células .....</i>	<i>24</i>
1.5 – <i>Importância da interação entre vias de neurotransmissão.....</i>	<i>25</i>
<b>2 - Objetivos.....</b>	<b>27</b>
<b>Objetivos específicos: .....</b>	<b>27</b>
<b>3 - Conclusão.....</b>	<b>28</b>
<b>Referências:.....</b>	<b>29</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).

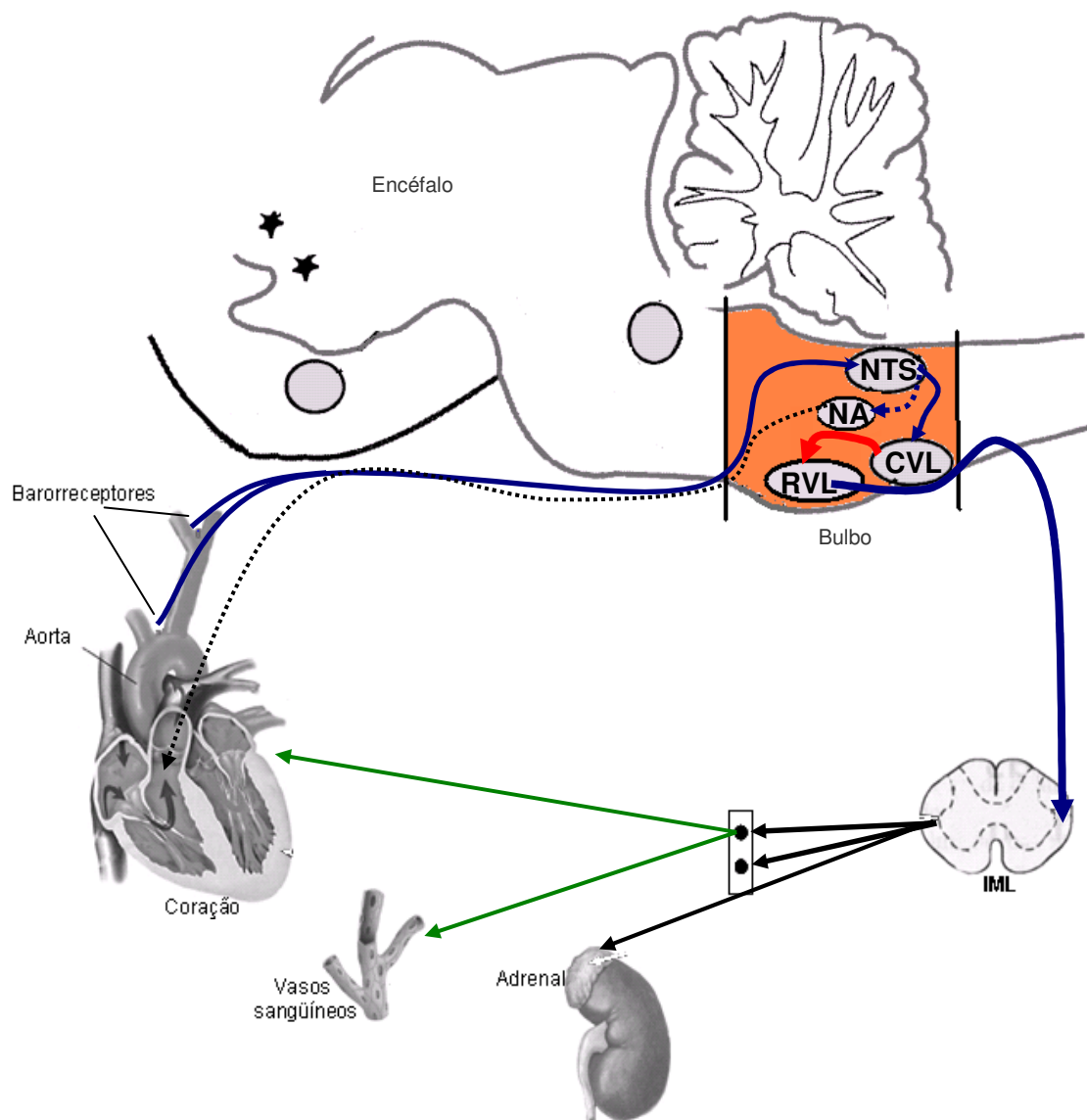
Na região dorso-medial do bulbo, encontra-se um núcleo importante para a regulação do sistema nervoso autônomo, o núcleo do trato solitário (Van Giersbergen *et al.*, 1992). Este núcleo recebe aferências primárias que derivam de diversos receptores viscerais, dentre eles barorreceptores, receptores cardiopulmonares, 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 *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 recaptação 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 - 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:

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.

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

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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

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

DAMPNEY, R. 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.

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.

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.

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.

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.

HASSEL, B.; DINGLEDINE, 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.

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.

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.

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.; 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.

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.



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.

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.

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.

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 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.

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

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

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

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.

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.

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.

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

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

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.

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.

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.

SCHOEPP, D.; BOCKAERT, J.; SLADDECZEK, 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.

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.

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.

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.

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.

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 alpha2-adrenoceptor function in the nucleus tractus solitarii of the spontaneously hypertensive rat. *Neuroscience*, v. 78, n. 3, p. 803-813, 1997.

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.