Maísa Aparecida da Costa

EFEITO MODULATÓRIO DOS RECEPTORES A_1 E A_{2A} SOBRE A NEUROTRANSMISSÃO NITRÉRGICA EM CULTURAS DE CÉLULAS DA REGIÃO DORSOMEDIAL DO BULBO DE RATOS NORMOTENSOS E GENETICAMENTE HIPERTENSOS

Modulatory effect of A_1 and A_{2A} receptor on nitrergic neurotransmission in cell culture from the dorsomedial medulla oblongata of normotensive and spontaneously hypertensive rats.

São Paulo

2013

Maísa Aparecida da Costa

EFEITO MODULATÓRIO DOS RECEPTORES A_1 E A_{2A} SOBRE A NEUROTRANSMISSÃO NITRÉRGICA EM CULTURAS DE CÉLULAS DA REGIÃO DORSOMEDIAL DO BULBO DE RATOS NORMOTENSOS E GENETICAMENTE HIPERTENSOS

Modulatory effect of A_1 and A_{2A} receptor on nitrergic neurotransmission in cell culture from the dorsomedial medulla oblongata of normotensive and spontaneously hypertensive rats.

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

Orientador(a): Débora Rejane Fior-Chadi

São Paulo

2013

Ficha Catalográfica

Costa, Maísa Aparecida da
Efeito modulatório dos receptores A_1 e A_{2A} sobre a neurotransmissão nitrérgica em cultura de células da região dorsomedial do bulbo de ratos normotensos e geneticamente hipertensos.

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

1. Neuromodulação 2. Receptor A_1 3. Receptor A_{2A} 4. Óxido Nítrico. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Fisiologia Geral.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

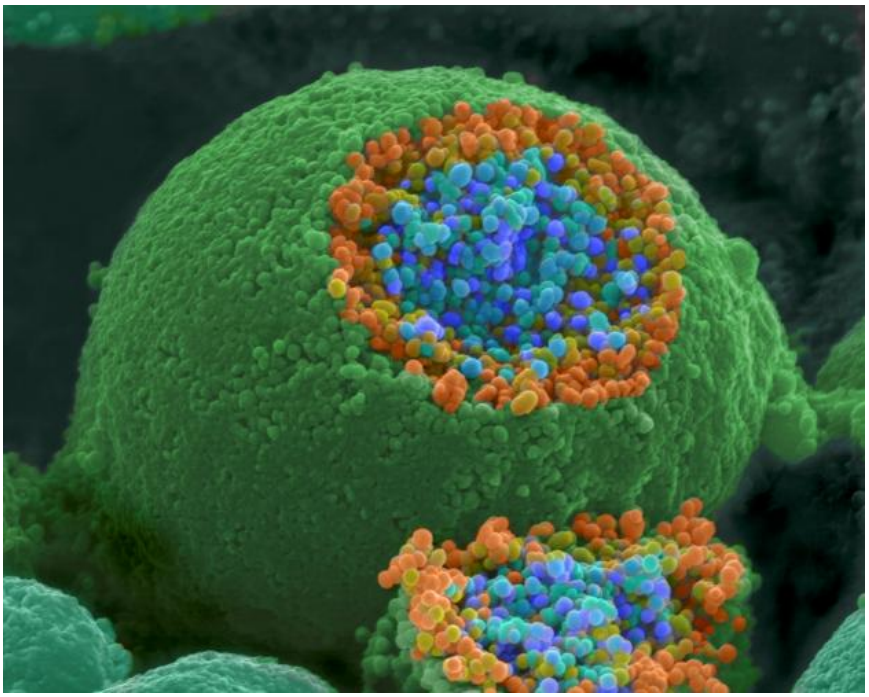
Prof(a). Dr(a).

Profa Dra Débora Rejane Fior-Chadi (Orientadora)

Dedicatória

Aos meus pais, Geraldo e Maria, aos meus irmãos,
Marciela e Gearlei e ao meu sobrinho, Gabriel.
Mais que uma dedicatória,
meu sincero pedido de perdão pela ausência
em suas vidas. Com todo meu amor.

Epígrafe



Micrografia eletrônica de varredura de uma terminação nervosa mostrando vesículas (laranja e azul) contendo mensageiros químicos prestes a serem liberados. Imagem de Tina Carvalho, Universidade do Havaí, Manoa.

Agradecimentos

À Deus...

À Dra Débora pela orientação, em seu mais amplo significado, por confiar tamanho trabalho a mim, por me acolher tão prontamente, pela amiga que, muito além do conhecimento científico, me ensinou muito sobre a vida, contribuindo assim para meu desenvolvimento pessoal e profissional.

Ao amigo e co-orientador Dr. Daniel Carrettiero pelas sugestões e discussões pertinentes, e pela sempre disponibilização de seu laboratório.

Às amigas de república, Cláudia, Lívia e Maria Nathália, pela paciência, compreensão, companheirismo e pela Abadia dos Dourados, 378.

Aos amigos de laboratório: Daniela, João Paulo, Karen, Karina, Marina, Murilo, Paulo Maciel, Sérgio, Thaís, pelo convívio diário, pela segunda família, pelos momentos tensos e descontraídos, indiscutivelmente necessários.

À todos os professores e pós-graduandos: Ana Maria de Lauro Castrucci: Leonardo, Maristela, Rafael; Lucile Maria Floeter-Winter: Maria Fernanda, Carolina, Ricardo, Sandra; Maria Aparecida Visconti: Flávia; Regina Pekelmman Markus: Eduardo Tamura, Eduardo, Pedro Augusto, Kelly, Érica, Daiane, Adriessa, Marco Antônio, Marina, Débora; Renata Guimarães Moreira: Thiago, Aline, Ananda; Zulma Felisbina da Silva Ferreira: Camila; Merari: Carol, Maycon, Rodrigo.

Às queridas Dilma e Susi, pelo café e momentos descontraídos na copa. Aos solícitos secretários e secretárias Gisele, Marcilene, Roseli, Érika, Eduardo e Helder.

E para todos aqueles cuja memória, desgastada neste momento, me falha, meus sinceros agradecimentos.

Este estudo foi financiado pelas seguintes agências de fomento: CAPES, CNPq e FAPESP 2007/08752-0 e 2010/19849-8, as quais agradeço imensamente o auxílio financeiro.

Índice

Resumo X

Abstract XII

1. Introdução 1

1.1. Neuromodulação 1

1.2. Aspectos históricos e clínicos relacionados à adenosina 3

1.3. Metabolismo da adenosina e sua regulação 4

1.4. Receptores adenosinérgicos 6

1.5. Papel neuromodulatório da adenosina 8

1.6. Óxido nítrico 11

1.7. Hipertensão essencial 15

1.8. Adenosina e óxido nítrico no NTS 17

2. Objetivos 24

2.1. Objetivo geral 24

2.2. Objetivos específicos 24

3. Materiais e Métodos 25

3.1. Animais 25

3.2. Cultura de células 25

3.3. Fármacos 27

3.4. Detecção de NO via mensuração de nitrito 27

3.5. Extração, quantificação de RNA e PCR em tempo real 29

3.6. RNA de interferência 31

3.7. Análise estatística 33

4. Resultados 34

4.1. Ativação dos A_1R e A_{2A}R modula a produção de nitrito em culturas de células da região dorsomedial do bulbo de WKY e SHR 34

4.2. PKA medeia as respostas evocadas pela estimulação do A_1R e do A_{2A}R 38

4.3. Ativação do A_{2A}R e A_1R modula os níveis de expressão da enzima nNOS 41

4.4. Inibição da nNOS pelo L-NAME modula os níveis de nitrito 45

4.5. Knockdown do A_{2A}R e A_1R modula os níveis de expressão da enzima nNOS. 46

5. Discussão 49

6. Conclusões 58

7. Referências Bibliográficas 59

Sattin A., Rall T.W. 1970. The effect of adenosine and adenine nucleotides on the cyclic adenosine 3', 5'-phosphate content of guinea pig cerebral cortex slices. Mol. Pharmacol. 6(1):13-23. 74

8. Anexos 78

Resumo e Abstract

Resumo

Adenosina e óxido nítrico, importantes neuromoduladores endógenos, atuam modulando finamente o controle neural cardiovascular no núcleo de trato solitário (NTS). Embora se tenha conhecimento sobre a relação entre adenosina e NO periférica e centralmente, em particular, no bulbo, os mecanismos pelos quais a adenosina interfere na dinâmica da neurotransmissão nitrérgica, ainda não são totalmente conhecidos. Logo, alterações na interação entre esses sistemas podem ser especialmente relevantes para indivíduos predispostos à hipertensão. Dessa forma, os objetivos do presente estudo foram estudar a interação entre o sistema adenosinérgico e nitrérgico em culturas de células da porção dorsomedial do bulbo de ratos normotenso Wistar Kyoto (WKY) e espontaneamente hipertensos (SHR). Para tal, utilizou-se técnicas para quantificação dos níveis de nitrito, PCR em tempo real e RNA de interferência. Foi observada uma redução e um aumento concentração-dependente nos níveis de nitrito e do mRNA da nNOS induzido pelos agonistas dos receptores A_1(A_1R) e A_{2A}(A_{2A}R), CPA e CGS21680, respectivamente. Os efeitos nos níveis de nitrito foram atenuados pela administração dos antagonistas seletivos dos A_1R e A_{2A}R, CPT e ZM241385. Knockdown dos A_1R e A_{2A}R mostraram que a redução da expressão desses receptores aumentaram e diminuíram os níveis de expressão da nNOS, respectivamente. Pré-tratamento com o inibidor não seletivo da nNOS, L-NAME, aboliu os níveis aumentados de nitrito desencadeados pelo CGS21680 em células de WKY e SHR. Por fim, é mostrado que a via cAMP-PKA está envolvida na sinalização que deflaga tantos os níveis reduzidos de nitrito, via A_1R, quantos os níveis aumentados de nitrito, via A_{2A}R, em culturas de WKY e SHR. Em síntese, nossos

resultados destacam a influência da adenosina sobre a síntese de NO em culturas de células da porção dorsomedial do bulbo de ratos WKY e SHR. Pelo menos em parte, o perfil modulatório é diferenciado em ratos SHR.

Abstract

Adenosine and nitric oxide, important endogenous neuromodulators, act on the fine tuning regulation of neural cardiovascular control in the nucleus tractus solitarius (NTS). Although the relationship between adenosine and NO peripheral and centrally, is well established, in particular, in the oblongata medulla, the mechanisms by which adenosine interferes in the dynamics of nitrergic neurotransmission, is not completely understood. Thus, changes in the interaction between these systems may be especially relevant for individuals predisposed to hypertension. The aim of this study was to evaluate the interaction between the adenosinergic and nitrergic systems in cell culture from the dorsomedial medulla oblongata of Wistar Kyoto (WKY) and spontaneously hypertensive rats (SHR). This purpose was performed the quantification of nitrite level, RT-PCR analysis and RNA interference. We observed a concentration-dependent decrease and increase of nitrite and nNOS mRNA levels in cultured cells of WKY and SHR rats induced by agonists of adenosine A_1 (A_1R) and A_{2A} receptor ($A_{2A}R$), CPA and CGS21680, respectively. These effects in nitrite level were attenuated by the administration of the A_1R and $A_{2A}R$ selective antagonist, CPT and ZM241385. Furthermore, knockdown of A_1R and $A_{2A}R$ showed an increase and decrease of nNOS mRNA levels, respectively. The pretreatment with nonselective inhibitor of NOS, L-NAME, abolished nitrite-increased levels triggered by CGS 21680 in WKY and SHR cells. Finally, it is shown that the cAMP-PKA pathway is involved in A_1R and $A_{2A}R$-mediated decrease and increase in nitrite levels in SHR and WKY cells. In summary, our results highlight the influence of adenosine on nitric oxide levels in cultured cells from dorsal medulla oblongata of WKY and SHR rats. In part, the modulatory profile is different in the SHR strain.

Abreviações e símbolos

A_1R – (do inglês: *Adenosine 1 Receptor*) = receptor A_1 da adenosina

$A_{2A}R$ – (do inglês: *Adenosine 2A Receptor*) = receptor 2A da adenosina

$A_{2B}R$ – (do inglês: *Adenosine 2B Receptor*) = receptor 2B da adenosina

A_3R – (do inglês: *Adenosine 3 Receptor*) = receptor 3 da adenosina

AC – (do inglês: *Adenilate Cyclase*) = adenilato ciclase

ADP – (do inglês: *Adenosine Diphosphate*) = adenosina difosfato

AMP – (do inglês: *Adenosine Monophosphate*) = adenosina monofosfato

AMPA – (do inglês: *alfa-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid*) = ácido alfa-amino-3-hidroxil-5-metil-4-isoxazolepropiônico.

ANOVA – (do inglês: *Analysis of variance*) = análise de variância

ATP – (do inglês: *Adenosine Triphosphate*) = adenosina trifosfato

AVP – (do inglês: A*rginine Vasopressin*) = vasopressina, argipressina

BDNF – (do inglês: *Brain Derived Neurotrophic Factor*) = fator neurotrófico derivado do cérebro

CVLM – (do inglês: C*audal Ventrolateral Medulla*) = medula ventrolateral caudal

DAN – (do inglês: *Diaminonaphthalene*) = diaminonaftaleno

DEPC – (do inglês: *Diethylpyrocarbonate*) = dietilpirocarbonato

DNA – (do inglês: *Deoxyribonucleic Acid*) = ácido desoxirribonucléico

dNTP – (do inglês: D*eoxyribonucleotide Triphosphates*) = deoxiribonucleotídeo trifosfato

FC – (do inglês: *Frequency Cardiac*) = frequência cardíaca

GABA – (do inglês: *gamma-aminobutyric acid*) = ácido gama-aminobutírico

GC – (do inglês: *Guanilate Cyclase*) = guanilato ciclase

GMP – (do inglês: *Guanosine Monophosphate*) = guanosina monofosfato

GPCR – (do inglês: *G-protein coupled receptor*) = receptor acoplado à proteína G

HIV – (do inglês: *Human Immunodeficiency Virus*) = vírus da imunodeficiência humana

LPS – (do inglês: *Lipopolysaccharide*) = lipopolissacarídeo

MAPK – (do inglês: *Mitogen-Activated Protein Kinase*) = protein cinase ativada mitógeno

NO – (do inglês: *Nitric Oxide*) = óxido nítrico

NOS – (do inglês: *Nitric Oxide Synthase*) = sintases do óxido nítrico

NPY – (do inglês: *Neuropeptide Y*) = neuropeptídeo Y

NTS – (do inglês: *Nucleus Tract Solitarii*) = núcleo do trato solitário

PAM – (do inglês: *Pulmonary Artery Mean*) = pressão média arterial

PCR – (do inglês: *Polymerase Chain Reaction*) = reação em cadeia da polimerase

PKA – (do inglês: *Protein Kinase A*) = proteína cinase dependente de AMP

PKG – (do inglês: *Protein Kinase G*) = proteína cinase dependente de GMP

PLC – (do inglês: *Phospholipase C*) = fosfolipase C

PVN – (do inglês: *Paraventricular Nucleus*) = núcleo paraventricular

RNA – (do inglês: *Ribonucleic Acid*) = ácido ribonucléico

RNAi – (do inglês: *RNA interference*) = interferência mediada por RNA

RVLM – (do inglês: *Rostral Ventrolateral Medulla*) = medula ventrolateral rostral

SHR – (do inglês: *Spontaneous Hypertensive Rats*) = ratos espontaneamente hipertensos

shRNA – (do inglês: *short harpin RNA*) = RNA na forma de pequeno "grampo de cabelo"

SNC – (do inglês: System Nervous Central) = sistema nervoso central

TrKB – (do inglês: *Tyrosine Kinases binding BDNF*) = proteína cinase ligada ao BDNF

TU – (do inglês: *Transfection Unit*) = unidade de transfecção

UV – (do inglês: *Ultraviolet*) = ultravioleta

VIP – (do inglês: *Vasoactive Intestinal Peptide*) = peptídeo vasoativo intestinal

WKY – (do inglês: *Wistar Kyoto*) = linhagem normotensa

1. Introdução

1.1. Neuromodulação

Neuromodulation is a bold and 'heady' concept. It is one thing to interact with the nervous system by making a lesion to mitigate the effects of a seizure focus, for example, or even to place an electrode with a stimulation effect that mimics a carefully placed lesion. It is another 'one thing' to give a drug that interacts with receptors throughout the brain, hoping that the beneficial effects (on a person's depressed mood, for example) outweigh the side effects (which might even include suicidal tendencies). One technique is an electrical sledgehammer, and the other is a pharmacological tsunami.

It is quite something else to persuade a suboptimally performing nervous system to abandon its counter-productive habits and resume the finely-orchestrated concert of electrochemical events that make for a productive, fully functional human being, physically and emotionally. Neuromodulation in its ideal form attempts just that.

For neuromodulation to succeed in that ambitious goal of electrochemical persuasion requires knowledge of all aspects of neuroscience. One must combine knowledge of both neurons and glia, in health and disease, in infancy and dotage. The nuances of nervous system communication (both electrical and chemical, both in the 'contact neighborhood' and many synapses away) must all be understood Neuromodulation is the pre-eminent multidisciplinary challenge.

(Parpura et al. 2012)

Todos os sistemas nervosos, desde suas expressões mais simples, estão sujeitos a neuromodulação. Substâncias neuromoduladoras reconfiguram circuitos neurais e alteram seus sinais de saída, uma vez que podem modificar as propriedades intrínsicas de disparo dos neurônios em um circuito e alterar a magnitude sináptica (Marder, 2012). Mais importante ainda é que a neuromodulação acrescenta extraordinária riqueza na dinâmica neural

obrigando-nos a abandonarmos o desejo por respostas simples e lineares a questões tão complexas como o funcionamento do cérebro.

O conceito de neuromodulação evoluiu do conceito de neurotransmissão, e foi inicialmente identificado como um mecanismo onde uma substância endógena, liberada pré ou pós-sinapticamente, influencia a liberação ou ação do neurotransmissor (Sebastião e Ribeiro, 2009). No entanto, este conceito vem ganhando complexidade, uma vez que a compreensão da estrutura e funcionamento das sinapses evoluiu enormemente. Atualmente, a existência de interações funcionais entre células nervosas sem qualquer contato morfológico (sináptico), a discrepância entre os sítios de liberação e a localização de receptores, bem como a ampla existência de receptores não sinápticos de alta afinidade, culminou numa importante forma de transmissão de sinais no sistema nervoso central, a comunicação não sináptica (Sykova e Vargová, 2008). Tal forma de comunicação pode ser alcançada pela difusão de transmissores, aminoácidos e neuropeptídeos pelo espaço extracelular, pela acumulação de íons (Syková, 2004b) ou pela liberação de sinais difusíveis (Kiss et al. 2004).

Sabemos que muitas substâncias moduladoras estão presentes em uma dada sinapse e ao longo do espaço extracelular, sendo liberadas não apenas por neurônios, mas também pelas células gliais. Astrócitos detectam e respondem à atividade neuronal e estão ativamente envolvidos na transmissão de sinais (Schipke e Kettenmann, 2004). Além disso, variações na gliotransmissão podem contribuir para disfunções na neurotransmissão e contribuir para desordens do sistema nervoso (Halassa et al. 2007). Assim, cada neuromodulador tem inúmeras possibilidades de ajustar finamente (*fine-tune)* a atividade neuronal. Entre a diversidade de neuromoduladores no cérebro, a adenosina e o óxido nítrico (NO) são fundamentais como *fine-tuners* porque, primeiro, eles estão entre os personagens mais importantes na comunicação neurônio-glia; segundo, afetam a liberação e a ação de muitos

neurotransmissores e neuromoduladores; terceiro, são liberados por quase todas as células e tem efeitos extrassinápticos (Sebastião e Ribeiro, 2009).

1.2. Aspectos históricos e clínicos relacionados à adenosina

Em 1927, Drury e Szent-Gyorgyi da Universidade de Cambridge, realizaram um experimento no qual injetaram extrato de tecido cardíaco por via intravenosa em um animal inteiro. Eles ficaram surpresos ao notar uma alteração transitória do ritmo cardíaco e uma diminuição da frequência cardíaca. Após várias etapas de purificação, os autores identificaram o composto biologicamente ativo do extrato como um "composto de adenina". A adenina é um nucleosídeo baseado em purina, semelhante à guanina, envolvido em várias funções biológicas, incluindo a respiração celular, a síntese de ácidos nucléicos, a síntese protéica e a modulação do estado metabólico das células. Sua natureza onipresente, ou seja, a sua presença e liberação a partir de quase todas as células, em conjunto com uma ampla distribuição de receptores de adenosina em todo o cérebro, a coloca numa posição privilegiada para se comportar como uma substância moduladora de outros neuromoduladores.

Passaram-se quase 50 anos desde as primeiras descobertas dos efeitos de redução da freqüência cardíaca proporcionado pela adenina até a utilização clínica da adenosina no tratamento de pacientes com taquicardia supraventricular (Belhassen e Pelleg, 1984). De fato, adenosina intravenosa está entre os medicamentos antiarrítmicos mais utilizado na prática clínica da anestesiologia (Delacretaz, 2006). Em adição ao seu papel clínico como agente antiarrítmico, a adenosina tem sido implicada em diversas áreas da medicina. Uma aplicação clínica importante para a sinalização extracelular de adenosina é seu potente efeito como vasodilatador arterial. Por exemplo, o inibidor da recaptação de adenosina, dipiridamol, é utilizado durante ecocardiografia de

estresse induzida farmacologicamente para aumentar os níveis vasculares de adenosina, causando vasodilatação coronária (Picano e Trivieri, 1999). Em adição, a adenosina funciona como inibidor da agregação plaquetária (Hart et al. 2008). Um estudo recente investigou diferentes inibidores plaquetários na prevenção de acidentes vasculares cerebrais recorrentes, e descobriram que a liberação prolongada de dipiridamol, em combinação com aspirina, é igualmente efetivo comparado ao antagonista do receptor de ATP, clopidogrel (Sacco et al. 2008). Além disso, o antagonista não específico do receptor da adenosina, a cafeína, tem sido sugerida para a prevenção e tratamento da cefaléia pós-dural (Halker et al. 2007). Embora esta indicação tenha sido desafiadora, a cafeína permanece como um importante agente terapêutico no tratamento e prevenção da dor de cabeça em pacientes (Hampl et al. 1995).

1.3. Metabolismo da adenosina e sua regulação

A adenosina pode ser formada intra ou extracelularmente, sendo continuamente produzida sob condições normais (Fredholm et al., 2001). Em condições basais, sua concentração intracelular é tipicamente cerca de 10-50 nM (Cunha, 2001). A adenosina intracelular é formada pela ação de uma endonuclease seletiva ao AMP e a taxa de formação da adenosina através deste mecanismo é controlado principalmente pela quantidade de AMP (Zimmermann et al. 1999). A adenosina também pode resultar da hidrólise da S-adenosil-homocisteína (Broch e Ueland, 1980) através de uma reação reversível catalisada pela S-adenosil-L-homocisteína hidrolase.

No sistema nervoso, a adenosina extracelular pode ser originada por três fontes principais (Figura 1): (1) através dos transportadores equilibrativos bi-direcionais de nucleosídeos, ENT1 e ENT2, após um aumento nos níveis intracelulares de adenosina (Fredholm et al. 2001); (2) conversão extracelular

da adenina em adenosina por ectonucleotidases (Cunha et al. 1996a) que incluem as ectonucleosídeo trifosfato difosfohidrolases (E-NTPDase), ectonucleosídeo pirofosfatase/fosfodiesterase (E-NPP) e ecto-5'-nucleotidases (Ecto-5'-NTase) (Fredholm et al. 2001); (3) a formação extracelular de adenosina após a liberação de cAMP (Rosenberg e Li. 1995).

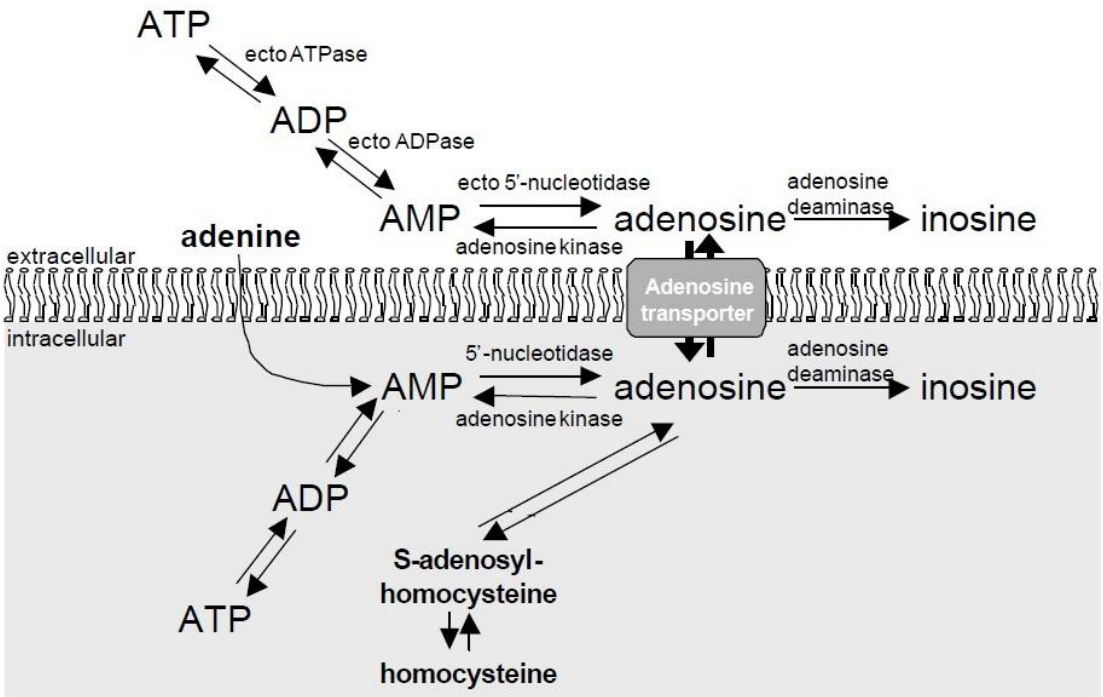


Figura 1. Sumário esquemático da regulação intra e extracelular da adenosina. ATP (adenosina trifosfato), ADP (adenosina difosfato), AMP (adenosina monofosfato). Metabolismo da adenosina por fosforilação ou degradação a inosina é catalisado pela adenosina cinase e deaminase, respectivamente. Modificado de Schulte, 2002.

Na sinapse, a adenosina extracelular pode ser formada a partir do catabolismo do ATP liberado das vesículas sinápticas o que faz com que pequenas alterações na concentração intracelular de ATP levem a alterações desproporcionais na concentração extracelular de adenosina (Cunha, 2001) ou a partir do ATP liberado dos astrócitos, como um gliotransmissor, estabelecendo um tonus inibitório global no cérebro (Cunha, 2008). A adenosina também pode ser liberada pós-sinapticamente como conseqüência

da ativação dos receptores ionotrópicos de glutamato (Dunwiddie e Diao, 1994).

A regulação das concentrações intra e extracelular da adenosina ocorre através da ação dos ENTs (Fredholm et al. 2005b; Dunwiddie e Masino, 2001). ENTs desempenham um papel duplo, porque bloqueio do transporte de adenosina pode inibir tanto a liberação quanto a recaptação da adenosina no hipocampo, dependendo de seus níveis intra e extracelulares (Gu et al. 1995). A importância do ENT1 na regulação dos níveis de adenosina também foi demonstrada em camundongos *knockout* para esta proteína (Choi et al. 2004). Existem duas enzimas que constituem as principais vias de remoção da adenosina: adenosina cinase e adenosina deaminase. A adenosina intracelular pode ser convertida em cAMP por fosforilação através da adenosina cinase ou em inosina pela degradação através da adenosina deaminase (Lloyd e Fredholm, 1995). A adenosina cinase é importante quando há baixos níveis de adenosina intracelular, enquanto a adenosina desaminase é crucial em altas concentrações de adenosina (Fredholm et al. 2005b).

1.4. Receptores adenosinérgicos

Os efeitos fisiológicos da adenosina são transduzidos através de quatro tipos de receptores de adenosina classificados farmacologicamente em: A_1R, $A_{2A}R$, $A_{2B}R$ e A_3R, com a seguinte afinidade pela adenosina: A_1R – 70 nM; $A_{2A}R$ – 150 nM; $A_{2B}R$ – 5100 nM and A_3R – 6500 nM (Fredholm et al. 2001; Dunwiddie and Masino, 2001). Como as funções biológicas mediadas pela sinalização adenosinérgica dependem das concentrações de adenosina na superfície da célula, vários fatores, incluindo a densidade do receptor e a funcionalidade das vias de sinalização intracelular acopladas aos receptores de adenosina, são determinantes importantes da sinalização (Hasko et al. 2008).

Alterações específicas no padrão de expressão dos receptores de adenosina durante condições fisiopatológicas como hipóxia, isquemia ou inflamação tem o potencial de alterar significativamente os eventos da sinalização dos receptores de adenosina (Eckle et al. 2008; Eltzschig et al. 2005).

Todos os quatro subtipos de receptores da adenosina são receptores acoplados à proteína G (GPCRs) com sete domínios transmembranares que sinalizam através de uma variedade de mecanismos de transdução. Classicamente, o efetor primário de todos os quatro receptores adenosinérgicos é a adenilciclase, cuja atividade é inibida ou estimulada, dependendo do subtipo principal presente numa célula (Van Calker et al. 1979). A_1R e A_3R medeiam inibição via G_i/G_o e G_i/G_q, respectivamente, resultando em diminuição dos níveis de cAMP, enquanto os subtipos $A_{2A}R$ e $A_{2B}R$ estimulam a adenilciclase pela ativação de G_S/G_{olf} e G_S, respectivamente, com consequente aumento de cAMP (Figura 2) (Fredholm et al. 2001; Abbracchio et al. 1995). No entanto, os receptores de adenosina também sinalizam através de outras vias de transdução, nomeadamente através da fosfolipase C (PLC), Ca^{2+} e proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPKs) (Schulte e Fredholm, 2003).

Exemplos para respostas fisiológicas típicas associadas com a ativação de receptores de adenosina específicos incluem bradicardia mediada pela adenosina através da ativação de A_1R (Prystowsky et al. 2003), vasodilatação arterial e inibição da agregação plaquetária através da ativação do $A_{2A}R$ (Hart et al. 2008; Ledent et al. 1997), isquemia dos diferentes órgãos através da ativação do $A_{2B}R$ (Eckle et al. 2008) ou degranulação de mastócitos através da inibição do A_3R dependente das concentrações intracelulares de AMPc (Jin et al. 1997).

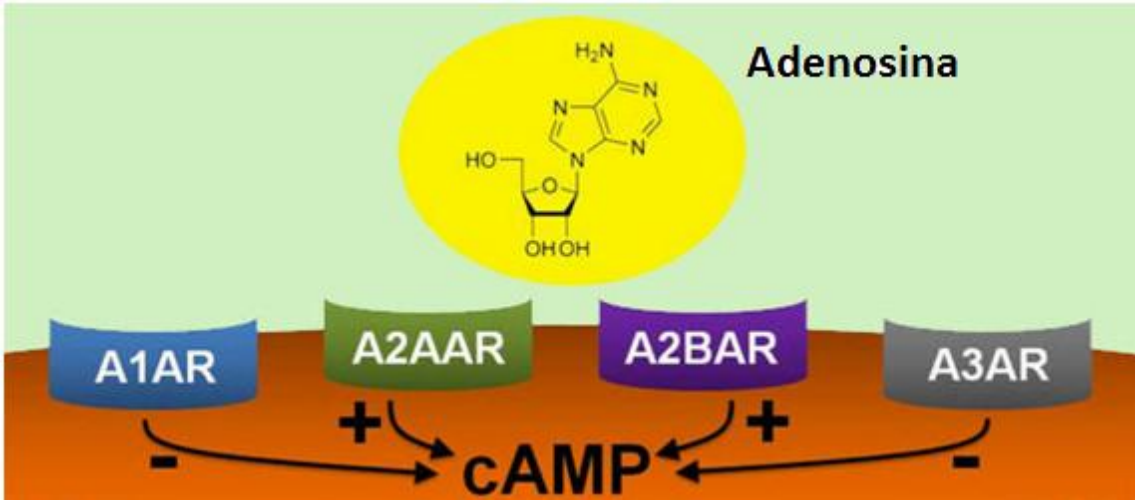


Figura 2. Sinalização extracelular da adenosina. A adenosina exerce seus efeitos biológicos através da ativação de seus receptores: A_1R, $A_{2A}R$, $A_{2B}R$ e A_3R. Os receptores de adenosina são acoplados à proteína G e utilizam AMPc como mensageiro secundário. Enquanto a sinalização através do A_1R ou A_3R reduzem os níveis de cAMP intracelular, a ativação do $A_{2A}R$ ou $A_{2B}R$ eleva os níveis de cAMP. Modificado de Eltzschig, 2009.

Trabalhos de Sattin e Rall (1970) sobre os efeitos da adenosina na acumulação de cAMP em fatias corticais, sugeriram a adenosina como um modulador da função cerebral, recrutada para integrar, de forma orquestrada, a neurotransmissão excitatória e inibitória. Desta forma, a adenosina poderia controlar várias funções do cérebro tanto em condições fisiológicas como fisiopatológicas. O acoplamento de seus receptores quer sejam inibitórios (A_1R, A_3R) ou facilitatórios ($A_{2A}R$, $A_{2B}R$) e a sua distribuição espacial diferencial no cérebro (Cunha, 2005) permite um grau elevado de complexidade dos efeitos da adenosina e permite a modulação de outros sistemas de neurotransmissores e de neuromoduladores (Sebastião, 2005).

1.5. Papel neuromodulatório da adenosina

Em nível celular, a adenosina tem um papel neuromodulatório sobre a atividade nervosa, modulando a liberação de neurotransmissores, a

responsividade pós-sináptica e a ação de outros sistemas de neurotransmissão (Cunha, 2001). Estudos eletrofisiológicos do papel da adenosina em fatias cerebrais concluíram que a adenosina inibe sobretudo a excitabilidade neuronal e a transmissão sináptica (Dunwiddie e Massino, 2001). Este efeito inibitório da adenosina é mediada pelo A_1R e, consequentemente, em fatias cerebrais de camundongos *knockout* para A_1R, a adenosina é quase destituída de efeitos na transmissão sináptica e na excitabilidade neuronal (Johansson et al. 2001). A_1R inibe a liberação da maior parte dos neurotransmissores clássicos: glutamato, a acetilcolina, a norepinefrina, serotonina, dopamina e outros transmissores (Ambrósio et al. 1997; Dunwiddie e Haas, 1985).

O papel neuromodulatório da adenosina não é restrito à inibição mediada pelo receptor A_1R. $A_{2A}R$ atua facilitando a liberação de vários neurotransmissores, como o glutamato (Lopes et al. 2002;. Cunha e Ribeiro, 2000a), a acetilcolina (Rebola et al. 2002) e serotonina (Okada et al. 2001), entre outros. Em várias áreas encefálicas, este efeito só é visto, se o A_1R estiver presente (Lopes et al. 2002). No entanto, $A_{2A}R$ pode facilitar a liberação de neurotransmissores, independentemente do A_1R, como exemplificado pelo controle da liberação de GABA (Cunha e Ribeiro, 2000a).

O papel neuromodulatório global da adenosina no sistema nervoso central é um balanço entre a ativação do A_1R e do $A_{2A}R$, uma vez que são os dois tipos principais de receptores da adenosina no cérebro, podendo estar localizados inclusive na mesma sinapse (Rebola et al. 2005d). O $A_{2A}R$ tem um papel importante no controle das ações mediadas pelo A_1R através de sistemas de transdução intracelular (Lopes et al. 1999) ou mesmo através da dimerização do receptor (Ciruela et al. 2006.).

Considerando que as pesquisas disponíveis oferecem um forte apoio para os efeitos dos $A_{2A}Rs$ no controle da liberação de neurotransmissores e dos A_1RS no controle tanto da liberação de neurotransmissores quanto da excitabilidade neuronal, é importante também considerar outros mecanismos

mais sutis e indiretos pelos quais os receptores de adenosina podem controlar a função neuronal. Um desses efeitos sutis da adenosina é o controle fino de outros sistemas de controle de liberação de neurotransmissores (Sebastião e Ribeiro, 2000). O trabalho de Correia-de-Sá foi fundamental para compreender o papel dos A_{2A}Rs na reconfiguração dos sistemas de modulação que se tomRNA ativos na junção neuromuscular. Assim, a ativação aumentada do A_{2A}R simultaneamente ao aumento da freqüência de estimulação nervosa, pode desligar o sistema autofacilitatório nicotínico pré-sináptico (Correia de Sá e Ribeiro, 1994), redefinir os receptores de acetilcolina muscarínicos (Oliveira et al. 2002) e permitir que os sistemas de modulação pré-sinápticos peptidérgicos passem a atuar (Correia de Sá et al. 2001; Correia de Sá e Ribeiro, 1994). Trabalhos realizados por Sebastião tem estendido essa idéia para o cérebro, onde a modulação peptidérgica da transmissão sináptica excitatória no hipocampo por receptores acoplados à proteína G, operados pela CGRP e VIP, é estritamente dependente da ativação de A_{2A}R (Diógenes et al. 2000; Cunha et al. 2000). Mais recentemente descobriu-se também que os efeitos do BDNF sobre a transmissão sináptica no hipocampo são abolidos pelo bloqueio dos receptores da adenosina e que os A_{2A}Rs são capazes de ativar receptores TrkB (Lee e Chao, 2001).

Os efeitos da ativação dos receptores de adenosina não se restringem ao controle direto da atividade neuronal, mas, em vez disso, eles interagem com receptores de outros neuromoduladores e neurotransmissores. Na verdade, os receptores de adenosina estão também localizados em outros tipos de células no sistema nervoso (astrócitos, micróglia, oligodendrócitos) e podem influenciar indiretamente a atividade neuronal. Os astrócitos, por exemplo, expressam os quatro tipos de receptores de adenosina (Ciccarelli et al. 2001) que controlam a astrogliose (Brambilla et al. 2003; Hindley et al. 1994) e a liberação de diferentes substâncias neuroativas que podem ter impacto sobre a atividade neuronal (Wittendorp et al. 2004; Li et al. 2001;

Brodie et al. 1998). Como ocorre para o controle pré-sináptico da liberação de neurotransmissores, receptores de adenosina em astrócitos também regulam finamente a ação de vários outros sistemas de receptores nos astrócitos, como receptores metabotrópicos de glutamato (Cormier et al. 2001), histamina (Pelkman e Hill, 1995), os receptores α1-adrenérgicos (El-Etr et al. 1992) e receptores de ATP, P2Y (Alloisio et al. 2004). Uma ação particular da ativação do receptor de adenosina em células gliais é o controle da expressão e liberação de citocinas (Schwaninger et al. 2000). Além disso, os receptores de adenosina também controlam a reatividade da microglia (Wollmer et al. 2001), o que reforça a hipótese de que a adenosina deve desempenhar um papel importante no controle da neuroinflamação (Schubert, 1996).

1.6. Óxido nítrico

Assim como a adenosina, a descoberta de que o NO age como um neuromodulador no sistema nervoso periférico e central desencadeou intensa pesquisa que, consideravelmente, aumentou nossa compreensão sobre o papel fisiológico do NO.

No início foi difícil para a comunidade científica aceitar que um membro de uma família de poluentes ambientais e carcinógeno em potencial pudesse ter alguma função biológica e, inclusive, ser produzido endogenamente. Todo o interesse pelas funções biológicas do NO foi consequência da convergência de três linhas de pesquisas independentes. A primeira foi a investigação do papel do endotélio vascular no processo de relaxamento da musculatura lisa dos vasos sanguíneos. Em 1980, Furchgott descobriu que a ação da acetilcolina como vasodilatadora era inteiramente dependente da presença do endotélio intacto e envolvia a liberação de uma substância essencial para o relaxamento muscular, o qual chamaram de fator relaxante derivado do endotélio. Curiosamente, dez anos antes, dois grupos de

pesquisadores, Katsuki et al. (1977) e Schultz et al. (1977), buscavam uma explicação científica para uma conduta terapêutica introduzida, empiricamente, pela medicina há mais de 100 anos. Tratava-se do uso de nitratos orgânicos e de nitroglicerina como tratamento da angina pectoris, da insuficiência cardíaca congestiva, da hipertensão pulmonar e de outras complicações vasculares. É sabido que a nitroglicerina é o composto ativo da dinamite e que seu inventor, Alfred Nobel, teve que autorizar seu médico a lhe administrar nitroglicerina quando foi acometido por uma crise de angina.

Outra linha de pesquisa questionava a produção de óxidos de nitrogênio pelos mamíferos uma vez que, no início do século, foi observado que a quantidade eliminada desses compostos excedia a quantidade ingerida (Schmidt e Walter, 1994). No entanto, apenas em 1981, Green e colaboradores demonstraram, inquestionavelmente, que mamíferos produziam endogenamente nitrato ao observar que camundongos e seres humanos alimentados com uma dieta pobre em nitrato excretavam quantidades substanciais destes compostos.

Finalmente, uma terceira linha de pesquisa envolvia o mecanismo de ação de neurotransmissores. Ferrendelli et al (1974) demonstraram que o glutamato provocava um aumento de GMPc no sistema nervoso central, enquanto Miki et al. (1977) demonstraram a ativação da guanilato ciclase cerebral pelo NO. Em 1982, Deguchi e Yoshioka identificaram em células de neuroblastoma o ativador endógeno da guanilato ciclase sem, contudo, haver ainda qualquer conhecimento do NO como molécula mensageira naquela época. Em 1989 foi confirmada a produção de NO no sistema nervoso central por Bredt e Snyder e demonstrado que o glutamato é o mediador da liberação de NO por Garthwaite e colaboradores. Nas últimas décadas, o NO tem sido alvo de uma infinidade de estudos e cada vez mais a comunidade científica certifica-se de sua importância devido à quantidade de processos biológicos no qual está envolvido.

A síntese do NO resulta da oxidação de um dos dois nitrogênios guanidino da L-arginina, que é convertida em L-citrulina (Figura 3). Esta reação é catalisada pela enzima óxido nítrico sintase (NOS) (Moncada et al. 1991). Uma variedade de isoformas da NOS foi purificada em diferentes tecidos de mamíferos. Estudos bioquímicos e de análise sequencial de aminoácidos revelaram que as isoformas representam uma família de proteínas e são produtos de três genes distintos. A isoforma NOS neuronal, nNOS ou do tipo I; NOS induzivel, iNOS ou do tipo II e NOS endotelial, eNOS ou do tipo III. As isoformas nNOS, presente normalmente nos neurônios (Bredt e Snyder, 1989), e a eNOS, presente normalmente nas células endoteliais vasculares (Moncada et al. 1991), são dependentes do complexo cálcio/calmodulina (Schmidt et al. 1992) e produzem pequenas quantidades de NO. Por outro lado, a iNOS não é expressa sobre condições normais, sendo induzida por citocinas e/ou endotoxinas nos macrófagos, linfócitos, hepatócitos, condrócitos e neutrófilos (Moncada et al. 1991). Sua ativação e funcionamento não depende da mobilização intracelular de íons cálcio e, uma vez sintetizada, libera grandes quantidades de NO.

O NO pode mediar seus efeitos intra e intercelulares basicamente por dois mecanismos: a via clássica do NO e a nitrosilação de proteínas. A via clássica é mediada pela ativação da guanilato ciclase solúvel (GCs), com aumento dos niveis de GMPc intracelular e ativação da proteína cinase G (Brenman e Bredt, 1997), conhecido como sistema NO/GCs/PKG.

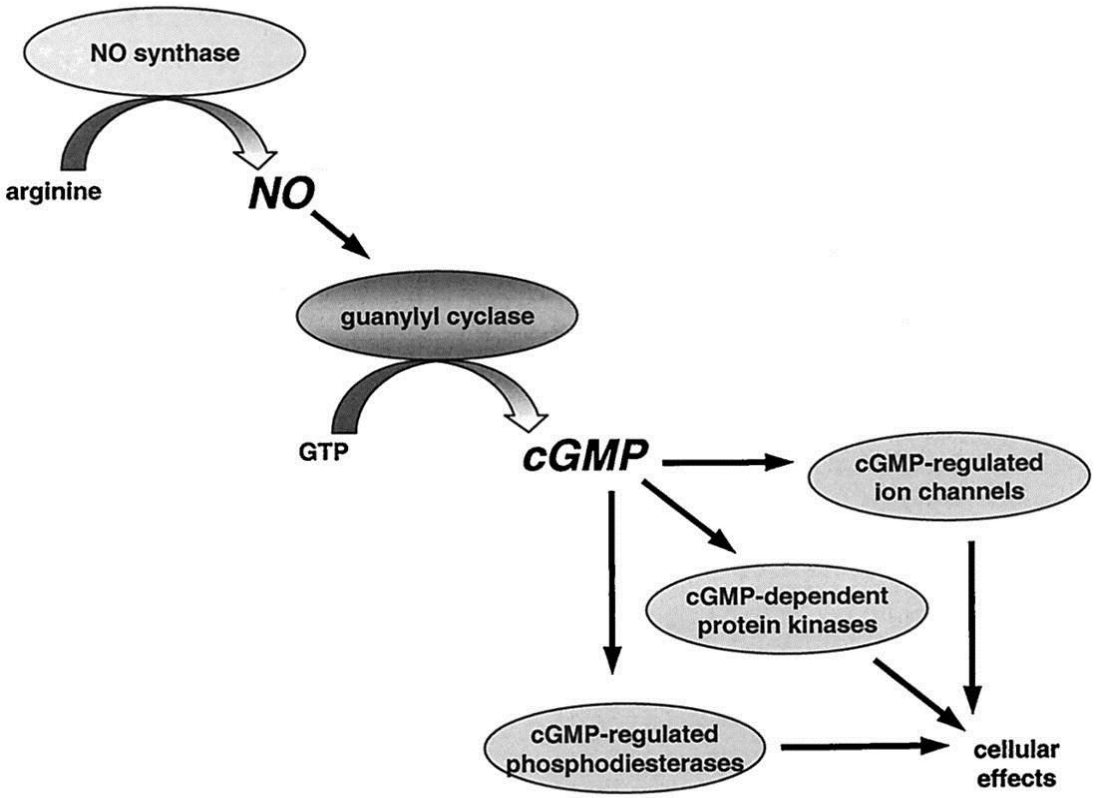


Figura 3. Cascata de sinalização NO/cGMP. NO produzido endogenamente pelas sintases de NO ativa guanilato ciclase leva ao aumento da síntese de cGMP. Este mensageiro intracelular, por sua vez, modula a atividade de cinases dependentes de cGMP, canais iônicos dependentes de cGMP, e fosfodiesterases reguladas pelo cGMP. Estes efetores estão envolvidos na regulação de várias funções fisiológicas nos sistemas nervoso e cardiovascular. Modificado de Friebe e Koesling, 2003.

Existem outros processos biológicos mediados por NO que se mostram, ao mesmo tempo, independentes de GMPc e PKG (Jaffrey et al. 2002). NO pode induzir modificações pós-traducionais nas proteínas, do mesmo modo que a transferência covalente de grupamentos fosforil por proteínas cinases. Este processo de modificação de proteínas mediado pelo NO e denominado de S-nitrosilação (Liu e Stamler, 1999).

Devido ao seu baixo peso molecular, à sua natureza gasosa e às suas propriedades lipofílicas, o NO penetra facilmente nas membranas celulares exercendo seus efeitos a distâncias consideráveis. Considerado como uma molécula de sinalização gasosa, NO atua como mensageiro intercelular

regulando várias funções fisiológicas, tais como o tônus vascular, a agregação plaquetária, a resposta imune e a neurotransmissão central e periférica em terminais não colinérgicos não adrenérgicos. Além disso, o NO, quando sintetizado em quantidades elevadas por macrófagos ativados, possui propriedades citotóxicas implicados na capacidade destas células em destruir bactérias, vírus e protozoários, bem como células tumorais. Embora esta função pareça ser um mecanismo importante na defesa do hospedeiro, é também uma ação prejudicial e destrutiva envolvida na patogênese de doenças auto-imunes e outras condições patológicas (Moncada e Higgs, 1995).

1.7. Hipertensão essencial

A regulação da pressão sanguínea é um processo altamente complexo, influenciado por muitos sistemas biológicos e que inclui vários aspectos do funcionamento renal, do transporte iônico, do funcionamento cardíaco e circulatório e de circuitos neuronais relacionados ao controle da pressão arterial. Basicamente, a pressão arterial é o resultado da resistência vascular e do débito cardíaco, duas variáveis que estão sob controle do sistema nervoso autônomo (Guynet, 2006).

Hipertensão, uma elevação crônica da pressão arterial, afeta aproximadamente 20 a 35% da população adulta (Stassen et al. 2003). É considerada o maior fator de risco para as doenças cardiovasculares incluindo doenças cardíacas, derrames e doenças renais. Devido a sua etiologia desconhecida em 90% dos casos, a hipertensão é classificada como "hipertensão essencial" (Bahr et al. 2003).

Estudos de correlação da pressão sanguínea dentro das famílias e estudos com gêmeos indicam que a herdabilidade pode chegar a 60% (Staessen et al. 2003). Estes dados sugerem que o fator ambiental seja uma importante causa para a variação na pressão aterial. Os fatores ambientais

mais importantes envolvidos no desenvolvimento da hipertensão incluem aumento na ingestão de sódio, álcool e café, obesidade, fumo, estresse e diminuição da atividade física (Chalmers et al. 1999).

A hipertensão essencial é provavelmente uma patologia que resulta da herança de um grande número de genes susceptíveis e envolve vários fatores ambientais, o que dificulta o estudo das variações da pressão arterial na população (Ruppert e Miasch, 2003). Para alguns estudiosos, esta patologia é conhecida como hipertensão neurogênica e está associada à alteração em circuitos neuronais responsáveis pelo controle da pressão arterial levando a um aumento crônico no tônus simpático (Julius, 1996). No entanto, para outros pesquisadores, a hipertensão essencial tem uma origem sistêmica (Schedl, 2007). Contudo, as causas específicas que levam ao aparecimento da hipertensão essencial ainda permanecem inconclusivas e incompletas.

Com relação ao componente neural, um aumento no tônus simpático tem sido associado ao desenvolvimento da hipertensão essencial em humanos (Julius, 1996) e em ratos SHR, um modelo animal usado para investigar os mecanismos fisiopatológicos primários associados à hipertensão (DeQuattro e Lee, 1991). É sabido que a remoção da eferência simpática previne o desenvolvimento da hipertensão em ratos (Lee et al. 1987), sugerindo a origem neurogênica da hipertensão essencial. Contudo, a causa desse aumento na atividade simpática ainda é desconhecida.

O envolvimento do SNC na manutenção da homeostase do sistema cardiovascular já era conhecido desde o século XIX quando os estudos clássicos realizados por Claude Bernard mostraram que a transecção da medula cervical produzia pronunciada queda da pressão aterial. No entanto, foram os estudos de Dittmar, em 1873, que primeiro demonstraram a participação do bulbo na manutenção da pressão arterial. O controle neural da pressão arterial é um mecanismo altamente complexo envolvendo diversos centros encefálicos, sendos os mais importantes o NTS, a medula

ventrolateral caudal (CVLM) e rostral (RVLM), a medula espinal e o hipotálamo (Guyenet, 2006). Assim, o estudo dessa circuitaria e dos neurotransmissores envolvidos na regulação neural da PA, in vivo e in vitro, é extremamente importante para desvendar os mecanismos responsáveis pelo desencadeamento e manutenção da hipertensão arterial.

1.8. Adenosina e óxido nítrico no NTS

O NTS, localizado na porção dorsal do bulbo, é um importante centro integrador das informações cardiovasculares (Reis et al. 1984). Este núcleo recebe aferências primárias dos baro e quimiorreceptores localizados no arco aórtico e no seio carotídeo possibilitando ajustes homeostáticos instantâneos nos níveis de pressão e acidez arterial, respectivamente. Do NTS partem projeções excitatórias para o CVLM que, por sua vez, projeta-se inibindo neurônios do RVLM (Dampney, 1994). Os neurônios deste núcleo são cruciais para o controle da pressão arterial, pois se auto-disparam originando o tônus simpático basal. A RVLM modula diretamente os neurônios pré-ganglionares simpáticos da coluna intermediolateral da medula espinal de acordo com os ajustes homeostáticos necessários (Amendt et al. 1979; Dampney, 1981). Este controle momento-a-momento da pressão arterial, que acaba por modular a atividade cardíaca, da adrenal e das arteríolas, é chamado de barorreflexo (Figura 4).

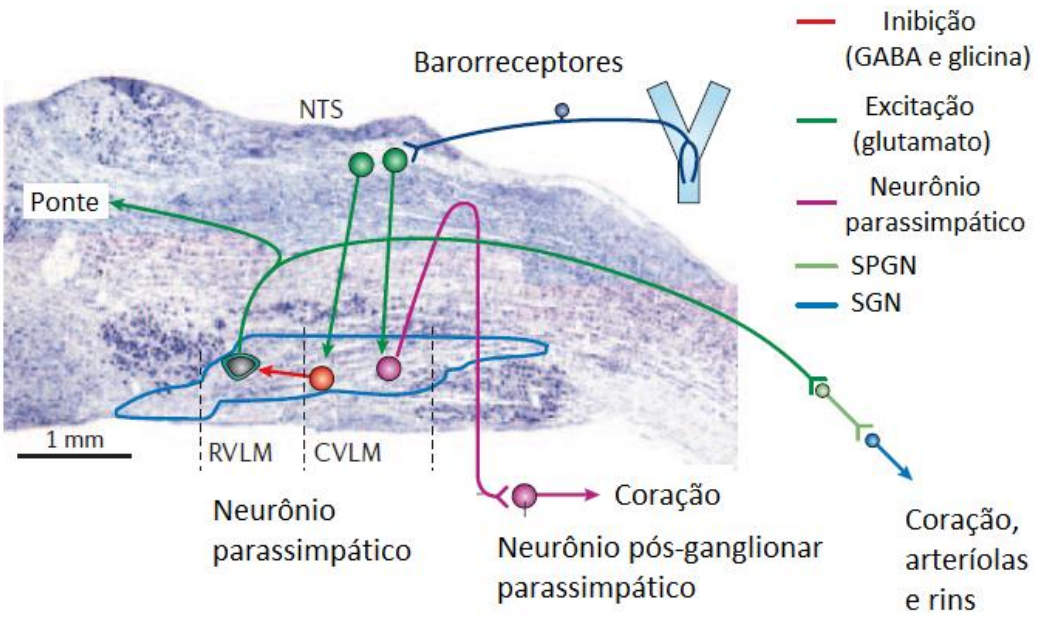


Figura 4. Localização anatômica do núcleo do trato solitário (NTS), da medula ventrolateral rostral (RVLM) e medula ventrolateral caudal (CVLM). Aferências primárias dos barorreceptores e quimiorreceptores chegam ao NTS. Essas aferências são redistribuídas para núcleos mais ventrais, como a CVLM e o RVLM de onde partem vias simpáticas e parassimpáticas para o coração e arteríolas e rins. Este controle momento-a-momento da pressão arterial é chamado de barorreflexo. Modificada de Guyenet, 2006.

Para integrar uma variedade de estímulos viscerosensoriais, em especial os cardiorrespiratórios, que necessitam de uma regulação precisa, as sinapses neste núcleo possuem um grau elevado de especificidade e plasticidade. O NTS apresenta várias populações neuronais que expressam uma enorme diversidade de substâncias neurotransmissoras (Palkovits, 1985) e neuromoduladoras, entre elas adenosina e óxido nítrico (Figura 5).

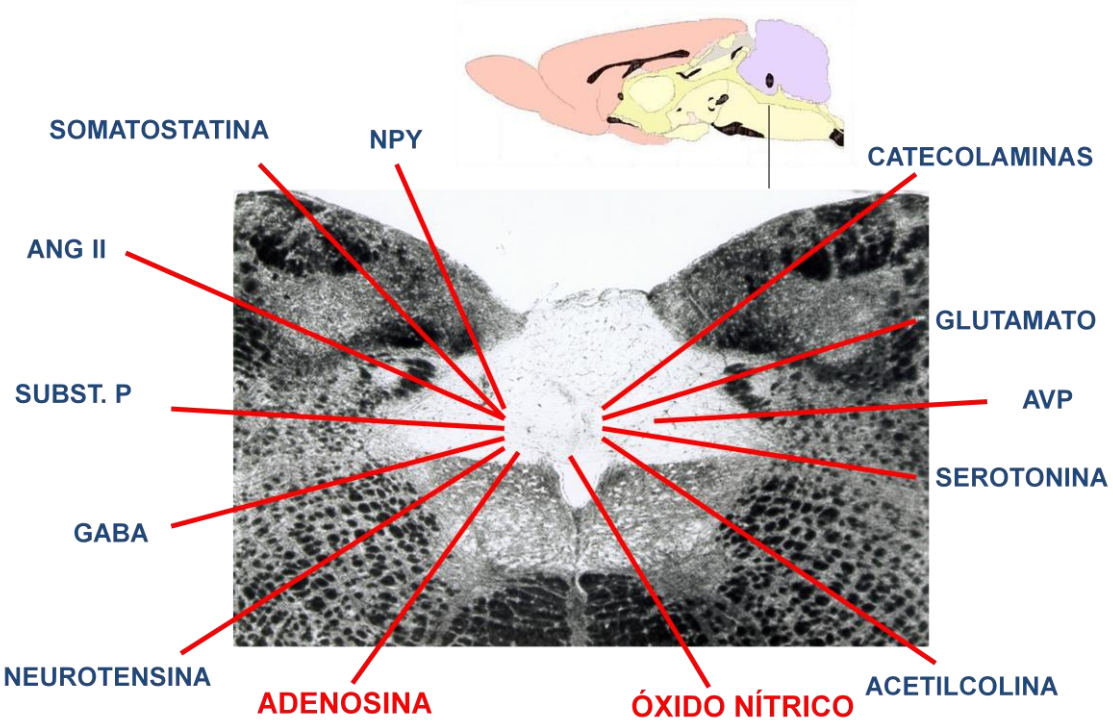


Figura 5. Neurotransmissores e neuromoduladores no NTS. Diversidade de substâncias neuroativas presentes no NTS. Adenosina e óxido nítrico são importantes neuromoduladores atuando dentro deste núcleo. NPY, neuropeptídeo Y; AVP, arginina vasopressina; ANG II, angiotensina II.

A adenosina é conhecida por ser um potente vasodilatador que atua tanto na musculatura lisa vascular como nas células endoteliais. Este nucleosídeo foi estudado por seu potencial papel como um neuromodulador em muitas funções autonômicas (Fredholm et al. 1987). Evidências mostram que a adenosina pode afetar a função cardiovascular dentro do SNC (Barraco et al. 1988 e Garcia et al. 1991). No NTS, a adenosina modula a ação do glutamato, catecolaminas (Barraco et al. 1996;. Carrettiero et al. 2008;. Carrettiero et al. 2009), serotonina (Helfman et al. 1996), GABA (Shirasaki et al. 1992) e NO (Scislo et al. 2005 e Lo et al. 1998). Neste núcleo, a ativação do $A_{2A}R$ parece promover uma redução dose-dependente na pressão arterial (Phillis et al. 1997). Além disso, o bloqueio seletivo do receptor $A_{2A}R$ no NTS

atenua a pressão arterial média (PAM) e freqüência cardíaca (FC) evocadas pela estimulação elétrica do nervo aórtico (Tomas et al. 2000). Já a estimulação do A_1R dentro do NTS provoca respostas pressoras uma vez que estas respostas foram seletivamente bloqueadas por DPCPX, um antagonista seletivo do A_1R (Barraco e Phillis, 1991). Estudos também mostraram que a ativação do A_1R evoca respostas predominantemente pressoras e simpatoexcitatórias no NTS (Scislo e O'Leary, 2002).

Por outro lado, o NO, também modula muitos processos fisiológicos, incluindo a regulação central da atividade cardiovascular. Tagawa e colaboradores (1994) demonstraram que o NO aumenta a atividade neuronal dos neurônios adjacentes no NTS. Além disso, o NO e aminoácidos excitatórios são liberados reciprocamente no NTS (Lin, 2009). A enzima responsável por sua síntese, a óxido nítrico sintase (NOS), é encontrada em neurônios intrínsecos do NTS (Vincent e Kimura, 1992) e nos terminais centrais e aferências primárias deste núcleo (Ruggiero et al. 1996). A isoforma neuronal, nNOS, é encontrada em altas concentrações em regiões do bulbo, especialmente no NTS e medula ventrolateral rostral. Microinjeção unilateral de L-arginina no NTS produziu efeitos depressores e bradicárdicos relacionados com a dose de destaque e redução da atividade nervosa simpática renal (Tseng et al. 1996). As evidências sugerem que os efeitos cardiovasculares produzidos pela L-arginina são inibidos por intervenções farmacológicas que bloqueiam a produção de NO (Tseng et al. 1996).

Estudos envolvendo a adenosina e o NO sugeriram que ambos têm efeitos cardiovasculares notavelmente semelhantes. Os efeitos depressores e bradicárdicos da adenosina no NTS são atenuadas pela inibição da NOS (Scislo et al. 2005). Além disso, a microinjeção de doadores de NO no NTS provoca respostas simpáticas que são semelhantes àquelas evocadas pela estimulação do $A_{2A}R$ no NTS (Scislo et al. 2005). Numerosos estudos demonstraram que o NO participa do efeito hipotensor induzida pela

estimulação do receptor $A_{2A}R$ (Scislo et al. 2005; Lo et al. 1998; Stella et al. 1995), e que os efeitos modulatórios cardiovasculares da adenosina no NTS devem ser acompanhados pela ativação da NOS e posterior liberação de NO (Lo et al. 2008; Scislo et al. 2005).

O estudo da neurotransmissão e da neuromodulação é a base para a compreensão do sistema nervoso. A descoberta da diversidade de neurotransmissores, da liberação de vários neurotransmissores por um mesmo neurônio e a grande variedade de subtipos de receptores, bem como o ajuste fino da neurotransmissão proporcionado pela neuromodulação, trouxe enorme contribuição para a elucidação do funcionamento do sistema nervoso e as possibilidades de manipulação deste em caso de doenças. Sabe-se que, além de um sistema de neurotransmissão ter sua ação específica, ele pode ser modulado ou modular outros sistemas de neurotransmissão.

A neuromodulação não apenas abrange uma série de observações que são incompatíveis do ponto-de-vista simples do fluxo de informação sináptico, mas também conduz a um grau de complexidade à comunicação neuronal, sendo um elemento essencial ao fluxo de informação neuronal. O conceito de neuromodulação representou uma modificação da teoria sináptica para acomodar algumas das evidências que foram surgindo a respeito da comunicação sináptica e não sináptica. Em contraste aos neurotransmissores, substâncias que transmitem informações entre as células nervosas, os neuromoduladores atuam amplificando ou atenuando a atividade neuronal.

Dentro deste contexto, a adenosina e o óxido nítrico foram os grandes responsáveis pela revolução conceitual de neurotransmissão e neurotransmissores, não se enquadrando nos critérios até então utilizados para definição como tais. O interesse pelo estudo dessas substâncias nada

convencionais é tão grande que, juntos, responderam por cerca de 13 133 publicações só em 2012 segundo a plataforma de busca Pubmed.

Nosso laboratório vem, há algum tempo, estudando a adenosina e o óxido nítrico, e tem percebido a importância desses neuromoduladores sobre os processos de regulação cardiovascular. Estes estudos mostraram que os receptores de adenosina, além de estarem distribuídos de forma heterogênea no NTS, estão aumentados em ratos hipertensos quando comparados a ratos normotensos (Carrettiero and Fior-Chadi, 2004) e que esta diferença parece preceder o desenvolvimento da hipertensão em ratos SHR (Carrettiero e Fior-Chadi, 2008). Foi demonstrado, ainda, que os receptores de adenosina são capazes de modular os receptores α_2-adrenérgicos no NTS e de forma diferenciada em ratos normotensos quando comparados a ratos hipertensos (Carrettiero et al. 2008; Carrettiero et al. 2009). Além disso, diferentes subnúcleos no NTS exibem mudanças na expressão da nNOS em diferentes fases da vida de ratos SHR, o que deve ser importante durante o desenvolvimento da hipertensão nestes animais (Ferrari e Fior-Chadi, 2005).

Sabendo que a adenosina modula a liberação de vários neurotransmissores (Scislo et al. 2006; Barraco et al. 1995), sua ação deve se estenter à modulação da síntese de NO, e essa ação modulatória pode ser importante para o desenvolvimento e controle da hipertensão, apontando a adenosina como um importante alvo farmacológico. Por esta razão, estudar o papel modulatório da adenosina também em ratos hipertensos seria interessante para se analisar possíveis alterações que possam contribuir para a gênese da hipertensão.

A elucidação dos mecanismos adenosinérgicos envolvidos na modulação da síntese de NO depende da capacidade de seletivamente e sensivelmente detectar e quantificar o NO e seus metabólitos em amostras biológicas. Ensaios como o diaminonaftaleno (DAN) é um método fluorimétrico altamente sensível para mensurar derivados do NO como o

nitrito e o nitrato (Bryan et al. 2007). Este ensaio oferece as vantagens adicionais de especificidade e versatilidade, capaz de detectar níveis extremamente baixos de naftotriazole (10-30nM), o produto formado da reação do DAN com os substratos de NO. Além desse tipo de abordagem, ferramentas moleculares, como é o caso da técnica de interferência mediada por RNA, são uma revolução no que se refere ao estudo da função gênica. Moléculas de RNAi estão sendo extensivamente utilizadas para diminuir a expressão de genes alvos em diversos organismo e células. Tal ferramenta é útil na manipulação experimental para estudo de genes específicos, função protéica e suas inter-relações com outros genes e proteínas, sendo potencialmente reconhecidas para uso clínicos. A ideia de reduzir os níveis de expressão dos receptores de adenosina e avaliar o impacto de tal manipulação na expressão da nNOS e, consequentemente, na síntese de NO poderá resultar em informações necessárias à compreensão da interação entre adenosina e NO.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Analisar a modulação do sistema nitrérgico pelo sistema adenosinérgico em culturas de células da região dorsomedial do bulbo de animais normotensos e hipertensos.

2.2. Objetivos específicos

1 – Analisar o efeito modulatório de agonistas seletivos para os A_1R e $A_{2A}R$ sobre a síntese de óxido nítrico em culturas de células da região dorsomedial do bulbo de ratos neonatos WKY e SHR através da dosagem fluorimétrica de nitrito.

2 – Analisar as vias intracelulares responsáveis pelo efeito modulatório observado no item 1 utilizando inibidores e ativadores das vias clássicas de sinalização celular.

3 – Analisar o efeito modulatório de agonistas seletivos para os A_1R e $A_{2A}R$ sobre os níveis do mRNA da enzima nNOS em culturas de células da região dorsomedial do bulbo de ratos neonatos WKY e SHR através da técnica de PCR em tempo real.

4 – Analisar o efeito modulatório do RNA de interferência para os A_1R ou $A_{2A}R$ sobre os níveis do mRNA da enzima nNOS em culturas de células da região dorsomedial do bulbo de ratos neonatos WKY e SHR através da técnica de PCR em tempo real.

3. Materiais e Métodos

3.1. *Animais*

Utilizou-se ratos (*Rattus norvegicus albinus*) neonatos das linhagens SHR, com predisposição genética à hipertensão, e WKY, normotensos, provenientes do biotério do Departamento de Fisiologia do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Os animais matrizes, em fase de reprodução, foram mantidos em número de três indivíduos da mesma linhagem por gaiola, sendo um macho e duas fêmeas, recebendo ração apropriada e água sem restrição. Todos os procedimentos foram devidamente aprovados (Protocolo 065/2008) pelo Comitê de Ética Animal do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (CEUA-IB-USP). Todos os esforços foram feitos para minimizar o número de animais utilizados e para evitar sua dor ou sofrimento.

3.2. *Cultura de células*

Para a cultura de células, a metodologia empregada foi uma modificação da descrita por Kivell e coautores (2001). Aproximadamente 12 ratos com idade de 1 dia foram sacrificados por decapitação e seus encéfalos rapidamente retirados da caixa craniana e colocados em uma placa de Petri contendo solução tampão gelada estéril constituída de NaCl (120mmol/l), KCl (5mmol/l), KH2PO4 (1,2mmol/l), MgSO4.7H2O(1,2mmol/l), NaHCO3 (25mmol/l) e glicose (13mmol/l), pH 7,2. A área contendo o NTS (porção dorsomedial do tronco encefálico) foi dissecada e transferida para um tubo falcon contendo a mesma solução tampão usada anteriormente. Foi então adicionada tripsina (0,05%) à solução contendo o tecido, seguida de

incubação por 40 min a 37% sob agitação. Após este período, foi adicionado inibidor de tripsina (0,006%), seguido de dissociação mecânica utilizando uma pipeta Pasteur. Após cerca de 5 min para que o tecido decantasse, o sobrenadante contendo as células dissociadas foi transferido para outro falcon e o decantado ressuspendido em solução tampão gelada e dissociado novamente. Este procedimento foi repetido aproximadamente 3 vezes até a completa dissociação do tecido. Os tubos contendo as células em suspensão foram centrifugados a 300 x g durante 5 minutos para que as células precipitassem.

A solução aquosa foi descartada vertendo-se o tubo e as células ressuspensas em meio de cultura Neurobasal A (Gibco, E.U.A.) suplementado com l-glutamina (250µmol/l; Sigma, E.U.A.), glutamax (250µmol/l; Gibco, E.U.A.), B27 (2%; Gibco, E.U.A.) e gentamicina (40mg/l; Gibco, E.U.A.). Células viáveis foram identificadas através da exclusão com trypan blue (0,4%; Gibco, E.U.A.) na proporção de 19:1 (190µl de solução das células e 10µl do corante) e contadas em Câmara de Neubauer a fim de plaquear 1800 células por milímetro quadrado.

Para a melhor adesão celular, as placas de cultura foram tratadas com poli-D-lisina (10mg/L, Sigma, E.U.A.) durante 40 minutos, sendo lavada 3 vezes com água destilada estéril seguida de incubação por 2 horas com soro fetal bovino (10%; Gibco, E.U.A.) momentos antes do plaqueamento das células. Após o plaqueamento, as células foram incubadas à 37ºC com uma PCO_2 em 5%, sendo que o meio de cultura foi trocado após 3 horas para remoção de células débeis e/ou não aderidas e depois a cada 48 horas para melhor desenvolvimento da cultura.

3.3. Fármacos

CGS21680 – 2-[4-(2-*P*-carboxietil)fenilamino]-5'-N-tilcarboxamidoadenosina (Sigma)

CPA – N6-ciclopentiladenosina (Sigma)

ZM241385 – 4-(-(2-{7-amino-2(2-furyl)[1,2,4]triazolo[2,3-a][1,3,5]triazin-5-ylamino]ethyl)phenol (Tocris)

CPT – 8-ciclopentil-1,3- dimetil xantina (Sigma)

H89 – dicloridrato hidratado (Sigma)

6Bnz – 6-Bnz-cAMP sodium salt (BioLog)

SQ22536 – 9-(Tetrahydro-2-furanyl)-9H-purin-6-amine (Tocris)

DAN - 2,3-diaminonaftaleno (Sigma)

L-NAME - N-Nitro-L-arginina metil ester (Sigma)

3.4. Detecção de NO via mensuração de nitrito

Diversos métodos utilizando as mais variadas tecnologias têm sido propostos na literatura para determinação de NO, tanto direta quanto indiretamente, por meio de ensaios que reflitam sua presença. Neste trabalho, a formação de NO foi detectada indiretamente pela acumulação de nitrito no sobrenadante usando a determinação fluorimétrica de DAN, 2,3-diaminonaftaleno (Misko et al. 1993). Misko e coautores, na tentativa de aumentar a sensibilidade, especificidade e versatilidade da mensuração do nitrito derivado do NO, empregaram o composto aromático não fluorescente DAN como um indicador de formação de NO. O DAN reage rapidamente com N_2O_3, gerado do nitrito acidificado (a reação ocorre em meio ácido), ou da interação do NO com o O_2 para produzir um composto altamente fluorescente, o 2,3-naftotriazole, NAT (Figura 6).

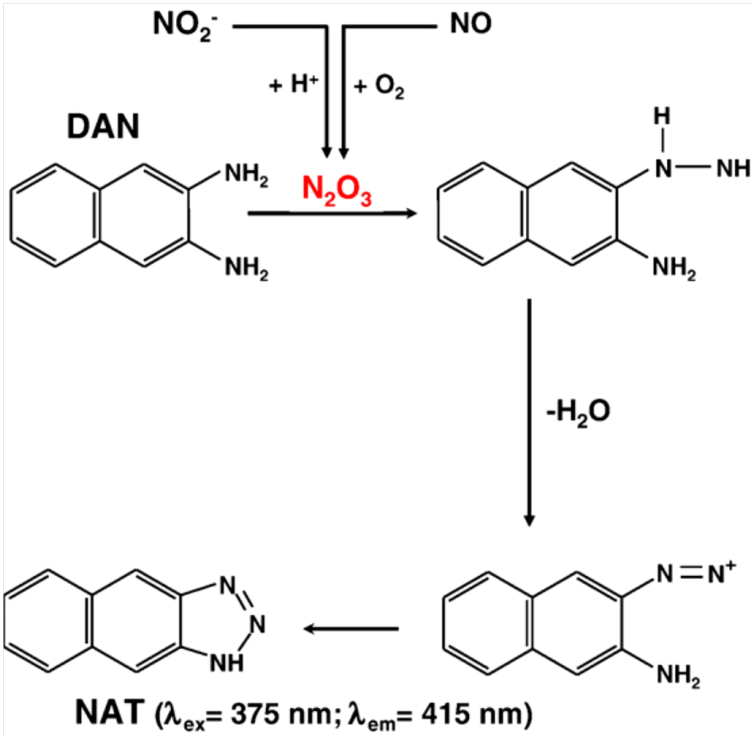


Figura 6. Detecção fluorimétrica de nitrito usando diaminonaftaleno, DAN. O agente nitrosante N_2O_3 gerado do nitrito acidificado ou da autooxidação do NO reage com DAN para formar o produto fluorescente naftotriazole, NAT. Modificado de Bryan e Grisham, 2007.

Assim, após os devidos tratamentos, alíquotas de 100µl de sobrenadante foram transferidas para placas de 96 poços e incubadas com 10µl de DAN preparado minutos antes do experimento (0,05mg/ml em 0,62M HCl). Após 10 minutos de incubação, a reação do nitrito com o DAN foi finalizada com 10µl de 2,8M NaOH. A formação do composto 2,3-diaminonaftotriazole foi mensurada através da densidade óptica (D.O.) usando um leitor de microplacas (Varian Cary Eclipse Fluorescence and Spectophoton) configurado com excitação a 375nm e emissão a 415nm. A concentração de nitrito foi quantificada usando uma curva padrão de $NaNO_2$.

3.5. Extração, quantificação de RNA e PCR em tempo real

Após limpeza do ambiente de trabalho com solução descontaminante de RNAse (RNAse ZAP, Ambion), procedeu-se à extração de RNA das células cultivadas de WKY e SHR para análise da curva concentração-resposta e temporal mediante tratamento com o agonista do $A_{2A}R$, CGS21680 e do agonista do A_1R, CPA. Para a extração de RNA, utilizou-se o kit Invisorb Spin Cell RNA Mini kit 250 (GE Healthcare, Alemanha). Removido o meio de cultura, as células foram lisadas com 350µl de tampão de lise e 3,5µl de β-mercaptoetanol por placa de 24 poços. O lisado foi transferido para um tubo contendo um filtro para retenção do DNA (DNA-binding Spin Filter) e submetido à centrifugação (11.000g por 1 minuto). O filtro foi então descartado e o filtrado contendo o RNA transferido para um segundo tubo ao qual foi adicionado 350µl de etanol a 70% para ajuste das condições de ligação do RNA. Depois de homogeneizada, a solução foi transferida para um tubo contendo um outro filtro, agora para a retenção do RNA (RNA-RTA Spin Filter) e submetida à centrifugação (9300g por 1 min. seg.). Para remoção de possíveis contaminantes, o filtro contendo o RNA foi submetido a várias etapas de lavagem (Wash Buffer R1 e Wash Buffer R2) seguidas de centrifugações a 9300g por 1 min. Ao término das lavagens, a membrana do filtro foi submetida à centrifugação a 13.400g por 5 min. para sua secagem. Para eluição do RNA purificado, adicionou-se 20µl de tampão de eluição (Elution Buffer R) à membrana do filtro e, após incubação por 2 min., o filtrado foi obtido por centrifugação a 9300g por 1 min.

Para quantificação e análise da qualidade do RNA extraído, o volume de 1µl de cada amostra foi submetido ao espectrofotômetro para obtenção da absorbância à UV determinada, refletindo assim sua qualidade e concentração. Amostras com uma razão A260:A280 menor que 1.8 foram descartadas, uma vez que valores abaixo de 1.8 são indicativos de contaminação por proteínas.

Após a quantificação, foi realizada a transformação do RNA em cDNA, através da transcrição reversa, a fim de amplificar e tornar a molécula mais estável. Para tal, 1µg de RNA total de cada amostra foi adicionado aos seguintes reagentes da reação de transcrição reversa: 5µl de tampão RT (10X), 11µl MgCl2 (25mM), 10µl nucleotídeos dNTPs (10mM), 2,5µl de hexâmeros randômicos (2,5µmol/L), 1µl inibidor de RNAse (0,4U/µl) e 1,25µl da enzima transcriptase reversa (1,25U/µl, MultiScribe Reverse Transcriptase). Com o cDNA disponível foram utilizados primers específicos para o MRNA das seguintes proteínas para amplificação das seqüências através da técnica de PCR em tempo real obtidos da Applied Biosystems.

TABELA 1. Protocolo utilizado para o preparo das amostras que foram submetidas à análise por PCR em tempo real.

18S	**Volume por reação (25µL)**
2x Master Mix	12,5µL
Probe	0,156µL
Primers	0,25µL
cDNA (diluído 1:100)	5µL
Água DEPC	6,84µL
A_1R / A_2aR/ nNOS	
2x Master Mix	12,5µL
Probe/primers A_1R – Rn00567668 – m1 $A_{2a}R$ – Rn00583935 – m1 nNOS – Rn00583793 – a1	1,25µL
cDNA	5µL
Água DEPC	6,25µL

As probes e primers utilizados contêm FAMTM como repórter fluorescente e são comercialmente disponíveis. Como controles da amplificação foram utilizados primers e probes para RNA ribossômico 18S que continham o reporter VIC™, também comercialmente disponível (Applied Biosystem). Os dados referentes aos MRNA de estudo foram normalizados através da subtração dos valores referentes ao 18S e comparados entre si por normalização logarítmica.

3.6. RNA de interferência

Nos últimos anos, além das análises de cunho farmacológico para estudos sobre interação entre sistemas de neurotransmissão, a aplicação de ferramentas de investigação no campo da genética molecular, tal como a interferência por RNA, RNAi, melhorou nossa compreensão acerca dessas interações, possibilitando a obtenção de um profundo conhecimento das funções celulares em sistemas específicos dentro do sistema nervoso central. No entanto, um passo limitante no uso dessas ferramentas, inclusive do processo de silenciamento por RNAi é a transfectabilidade das células. Culturas primárias neuronais são notórias por apresentarem baixa eficiência de transfecção. Vectores lentivirais, diferentemente dos adenovírus, oferecem uma possibilidade de expressão permanente em células alvo através de sua integração no genoma de células que não se dividem. Além disso, vetores lentivirais integram transgenes, de forma estável, nestas células, inclusive células neuronais, sem gerar resposta imune ou causar toxicidade. O recente desenvolvimento de vírus da imunodeficiência humana (HIV-1) baseados em vetores lentivirais ampliou ainda mais os potenciais alvos de terapia gênica humana.

Neste estudo, foi utilizado o vetor lentiviral pGIPZ com o shRNAmir (microRNA-adapted shRNA) mostrado na figura abaixo, contendo o transgene para o $A_{2A}R$ (VGH5518-10112715, Open Biosystems) e para o A_1R (VGM5520-99214894, Open Biosystems).

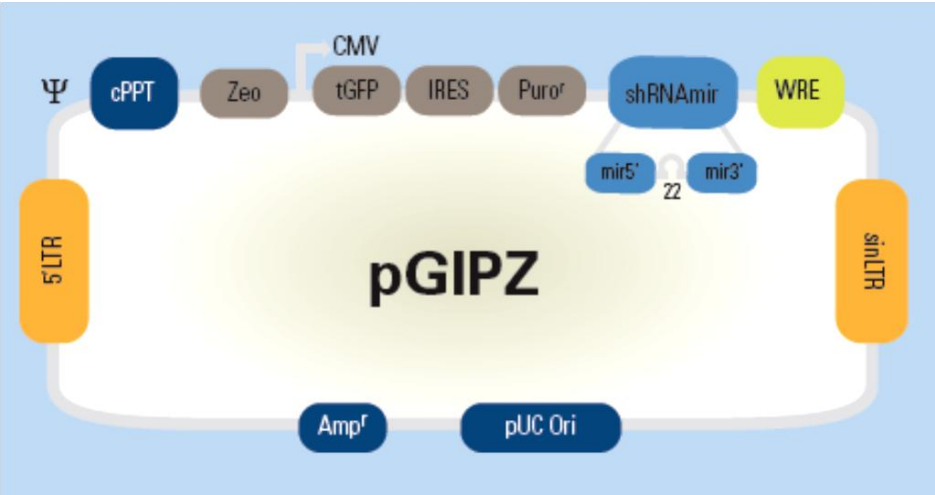


Figura 7. Mapa do vetor lentiviral pGIPZ. Algumas de suas características que o fazem uma ferramenta versátil para estudos de interferência por RNA são mostradas: CMV, promotor da RNA polimerase II; tGFP, marcador para controle da expressão do shRNAmir; cPPT, auxilia na translocação do shRNAmir para o núcleo de células que não se dividem; WRE, aumenta a estabilidade do transcrito.

Após três dias em cultura, as células dos animais WKY e SHR foram expostas ao vetor pGIPZ contendo o plasmídeo shRNAmir contra A_1R ou A_{2a} em concentração aproximada de 1 x 10^8 unidades de transfecção por ml (TU/ml) diluídas em meio de cultura sem soro e sem antibiótico. Decorridas 5 horas, o sobrenadante foi removido e substituído por meio de cultura completo. Como controle negativo foram realizados, em paralelo, o non-silence (RHS4348, Open Biosystems). Três dias após a infecção, o RNA foi extraído e imediatamente congelado para análise por PCR dos níveis de expressão do A_1R, do $A_{2A}R$ e da enzima nNOS.

3.7. Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados através do teste *t* de Student ou análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias, dependendo do caso, o que será relatado no momento da apresentação de cada resultado. A análise estatística foi feita utilizando-se o programa GraphPad Prism, versão 5.00 de 25 de março de 1999, para Windows (GraphPad Software, San Diego California USA). Foram aceitas como variações significativas aquelas em que a diferença entre os grupos resultou em um *p* menor ou igual a 0,05.

4. Resultados

4.1. Ativação dos A_1R e A_{2A}R modula a produção de nitrito em culturas de células da região dorsomedial do bulbo de WKY e SHR

A análise fluorimétrica através do método de DAN mostrou que ambas as linhagens respondem ao tratamento com o agonista do A_{2A}R, CGS21680, e que uma menor concentração basal de nitrito foi observada em culturas de SHR comparado às culturas de WKY (Figura 8). A resposta ao tratamento nas primeiras 6 horas é similar em WKY e SHR, com um aumento significativo na produção de nitrito à concentração máxima de 10 μM do agonista. Decorridas 12 horas de tratamento, as culturas de WKY continuaram respondendo apenas à concentração máxima do agonista, enquanto em culturas de SHR a produção de nitrito é significativa à concentração mínima de 0,1 μM. Após 24 horas de tratamento, a curva concentração-resposta não se altera entre as linhagens; nas culturas de WKY o aumento de nitrito foi significativo à 10 μM e em SHR as células produziram níveis aumentados de nitrito em todas as concentrações. Para se certificar de que os níveis aumentados de nitrito foram mediados pelo CGS21680, experimentos com o antagonista do receptor A_{2A}R, ZM241385 foram realizados. De fato, o agonista parece estar envolvido na produção de nitrito uma vez que o antagonista foi capaz de reverter os efeitos mediados pelo CGS21680 (Figura 10).

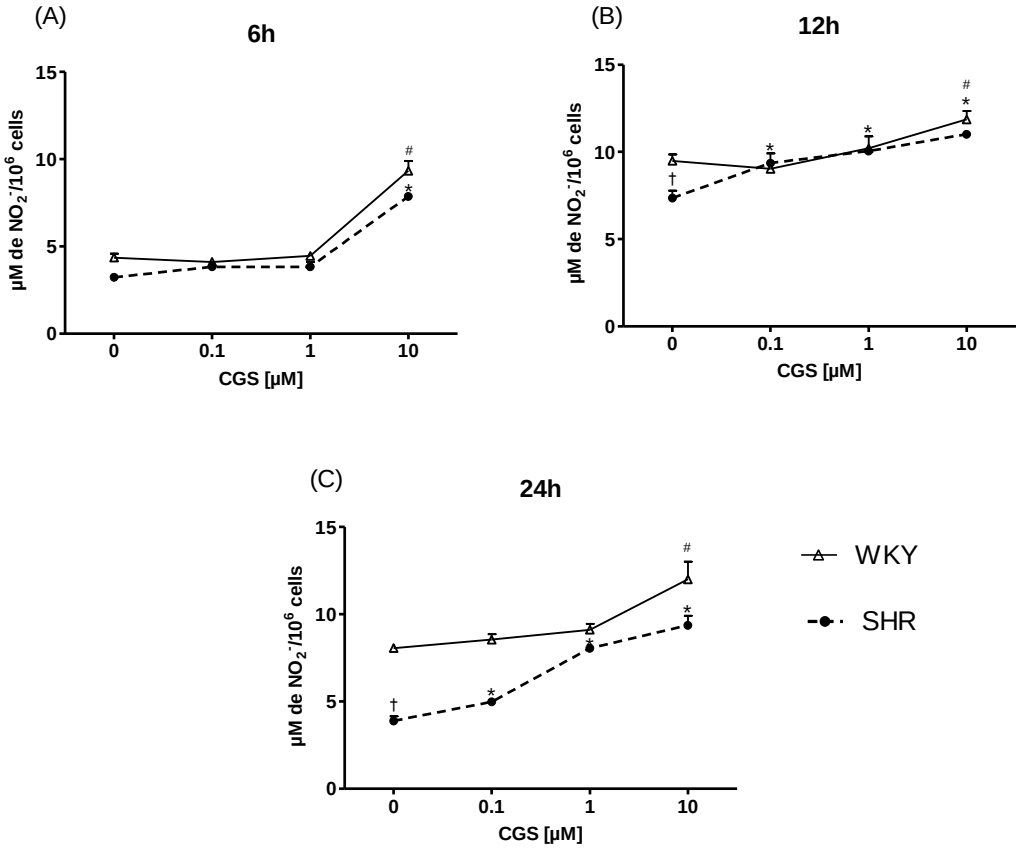


Figura 8. Efeito do tratamento com o agonista do $A_{2A}R$, CGS21680, sobre a produção de nitrito em culturas de células da porção dorsomedial do bulbo de ratos WKY e SHR. (A), curva concentração-resposta após 6 horas de tratamento com CGS21680. Maiores níveis de nitrito foram observados à concentração de 10 µM tanto em WKY quanto em SHR. (B), curva concentração-resposta após 12 horas de tratamento com CGS21680. À concentração de 0,1µM, as culturas de células de SHR já mostram um aumento nos níveis de nitrito. (C), curva concentração-resposta após 24 horas de tratamento com CGS21680. Observa-se que as células de SHR são responsivas em todas as concentrações de CGS21680. Em condições basais, os níveis de nitrito estão diminuídos em culturas de células de SHR quando comparado às culturas de WKY. Os níveis de nitrito foram determinados no sobrenadante das culturas usando o ensaio de DAN. Os dados são expressos como média ± SEM (n=3), † $p<0,05$ comparado ao controle WKY, # $p<0,05$ comparado aos níveis basais de WKY e * $p<0,05$ comparado aos níveis basais de SHR. Na análise estatística, utilizou-se ANOVA de duas vias seguido pelo pós-teste de Bonferroni.

De modo contrário ao $A_{2A}R$, a ativação do A_1R, preferencialmente, inibe a liberação de neurotransmissores em muitos sistemas (Ralevic e Burnstock, 1998). Assim, avaliamos se a ativação do mesmo alteraria os níveis de nitrito em nosso modelo. Os efeitos do tratamento com o agonista do A_1R, CPA, sobre os níveis de nitritos em culturas de células da região dorsomedial do bulbo de ratos SHR e WKY são apresentados na figura 10. A ativação do A_1R induziu uma redução significativa nos níveis de nitrito em todas as concentrações e tempo avaliados quando comparados com os seus respectivos controles. Após 6 horas de tratamento, as culturas de células de WKY mostraram uma redução abrupta nos níveis de nitrito já na concentração de 0,1 μM do agonista A_1R, enquanto que nas culturas de células de SHR esta concentração do agonista CPA não afetou os níveis de nitrito. Por outro lado, as respostas ao tratamento com as concentrações de 1 μM e 10 μM do agonista foram semelhantes em culturas de células de SHR e WKY. Às 12 horas de tratamento, os níveis de nitrito foram significativamente reduzidos em todas as concentrações testadas em culturas de células SHR e WKY, quando comparados com o controle. Após 24 horas, ambas as linhagens apresentaram redução acentuada nos níveis de nitrito à concentração de 0,1 μM em relação aos seus respectivos controles. Após esta redução, os níveis de nitrito foram mantidos constantes à 1 μM e à 10 μM do agonista A_1R em culturas de células de ambas linhagens. Quando as células foram tratadas com o antagonista A_1R, CPT, o efeito promovido pelo agonista foi completamente abolido. O tratamento com o antagonista CPT não alterou os níveis de nitrito (Figura 11).

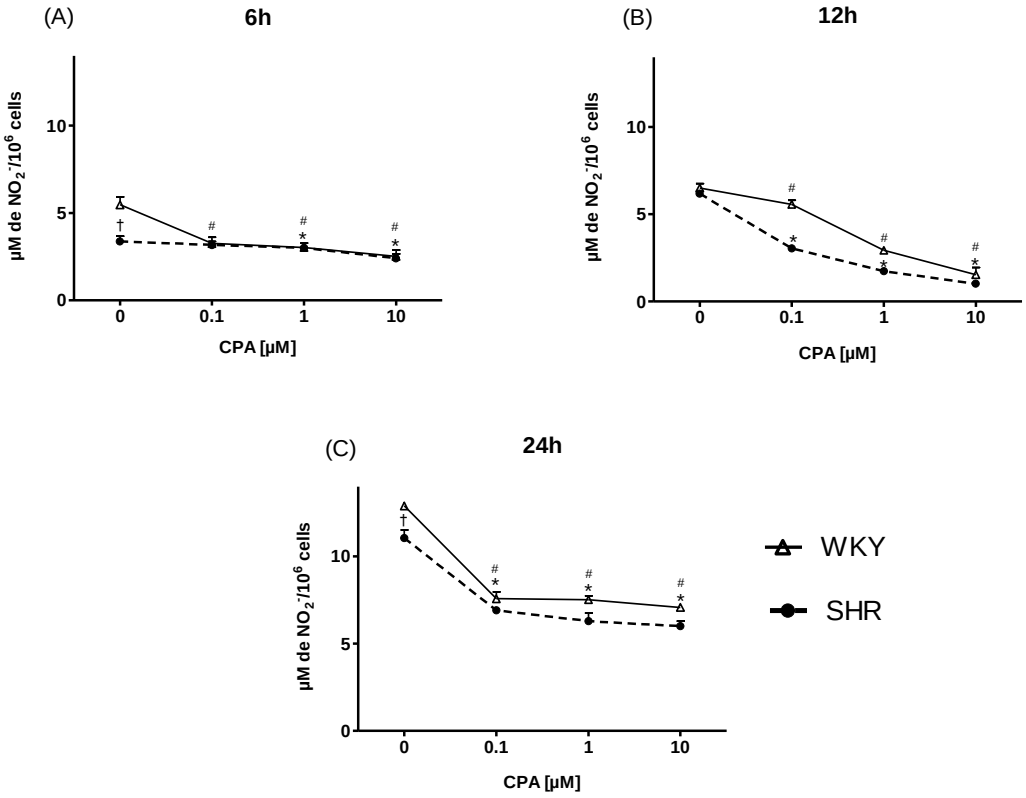


Figura 9. Efeito do tratamento com o agonista CPA na produção de nitrito em culturas de células da região dorsomedial do bulbo de ratos WKY e SHR. (A), curva concentração-resposta mostrando a produção de nitrito após 6 horas de tratamento com CPA. (B), curva concentração-resposta após 12 horas de tratamento com CPA e (C), curva concentração-resposta após 24 horas de tratamento com CPA. Observa-se que as linhagens WKY e SHR são responsivas em todas as concentrações após 12 e 24 horas de tratamento. Em condições basais, os níveis de nitrito estão diminuídos em culturas de células de SHR quando comparado às culturas de WKY. Os níveis de nitrito foram determinados no sobrenadante das culturas utilizando o ensaio de DAN. Os dados são expressos como média ± SEM (n=3), † $p<0,05$ comparado ao controle WKY, # $p<0,05$ quando comparado com os níveis basais WKY e * $p<0,05$ quando comparado aos níveis basais do SHR. Na análise estatística, utilizou-se ANOVA de duas vias seguido pelo pós-teste de Bonferroni.

4.2. PKA medeia as respostas evocadas pela estimulação do A_1R e do A_{2A}R

A via clássica de sinalização intracelular amplamente conhecida dos A_1R e A_{2A}R é a inibição da adenilil ciclase, provocando um decréscimo e um aumento nos níveis do segundo mensageiro cAMP (Van Calker et al. 1978). A PKA é uma proteína efetora do cAMP e está envolvida na modulação da liberação de neurotransmissores em muitas áreas do sistema nervoso (Kang et al. 2003; Kaneko e Takahashi, 2004). Tendo em vista que a ativação dos A_1R e A_{2A}R modula os níveis de nitrito, nos perguntamos se a sinalização via PKA está envolvida na diminuição e aumento dos níveis de nitrito após estimulação do A_1R e A_{2A}R, respectivamente, em culturas de células da região dorsomedial do bulbo. Para tal avaliação, tratamentos farmacológicos foram realizados utilizando inibidores e ativadores das moléculas envolvidas na sinalização da PKA associados ao tratamento com os agonistas CGS21680 e CPA.

Nas células tratadas simultaneamente com CGS21680 (10 μM) e o inibidor da PKA, H89 (5 μM), durante 6 horas, observou-se uma diminuição nos níveis de nitrito comparado com as culturas tratadas somente com CGS21680. Por outro lado, as culturas, tanto de WKY quanto de SHR, tratadas com CGS21680 e o ativador da PKA, 6Bnz (5 μM) apresentaram um aumento nos níveis de nitrito comparado com as tratadas somente com CGS21680. Esse perfil de resposta sugere a PKA como a proteína efetora do cAMP envolvida no aumento dos níveis de nitrito evocada pela ativação A_{2A}R (Figura 10).

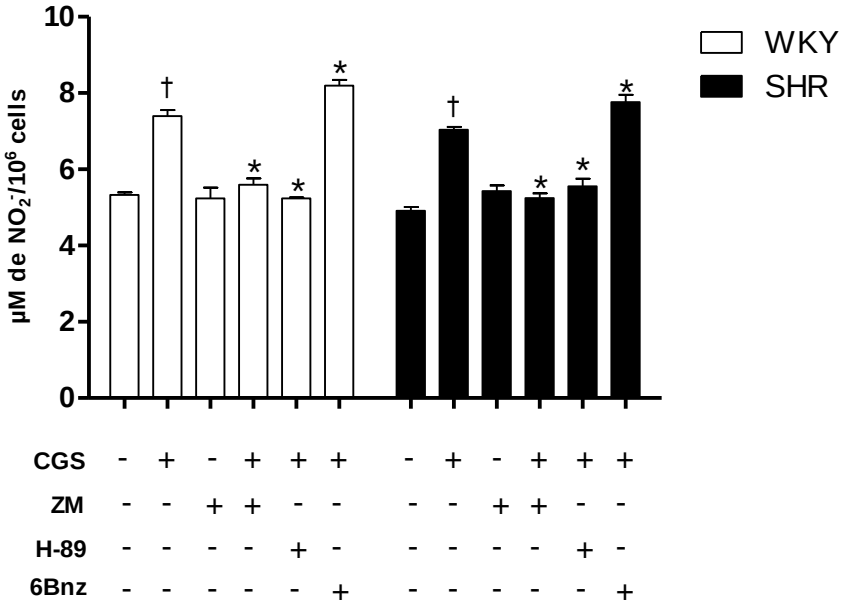


Figura 10. Ativação da PKA está associada aos níveis aumentados de nitrito em culturas de células da porção dorsomedial do bulbo de ratos WKY e SHR. Níveis de nitrito em resposta ao tratamento com o agonista CGS21680 (10 µM) e com o antagonista ZM241385 do $A_{2A}R$, bem como com ativador 6Bnz (5 µM) e inibidor H89 (5 µM) da PKA em culturas de células de WKY e SHR após 6 horas de tratamento. ZM241385 foi adicionado 10 minutos antes do CGS21860, e foi capaz de abolir os níveis aumentados de nitrito promovido pelo CGS21680. Quando o ativador da PKA, 6Bnz, foi adicionado com CGS21680, um pronunciado aumento nos níveis de nitrito foi observado. H89 inibiu os efeitos do CGS21680 sobre a produção de nitrito. Dados são mostrados como média ± SEM (n=3). † $p<0,05$ comparado com os respectivos controles de cada linhagem. * $p<0,05$ comparado com o tratamento com CGS21680. Na análise estatística, utilizou-se ANOVA de duas vias seguida pelo pós-teste de Bonferroni.

Já para o tratamento com os inibidores e ativadores da PKA e o agonista do A_1R foi utilizada a concentração de 1 µM do CPA durante 12 horas. O padrão de resposta à estimulação A_1R foi semelhante tanto na linhagem normotensa quanto na hipertensa (Figura 11). SQ22536, um inibidor da AC, exacerbou o efeito do CPA sobre a produção de nitrito em comparação com CPA sozinho. Por outro lado, 6Bnz, um ativador de PKA,

inverteu o efeito induzido pelo CPA nos níveis de nitrito. SQ22536 e 6Bnz sozinhos não induziram alterações na concentração de nitrito (dados não mostrados).

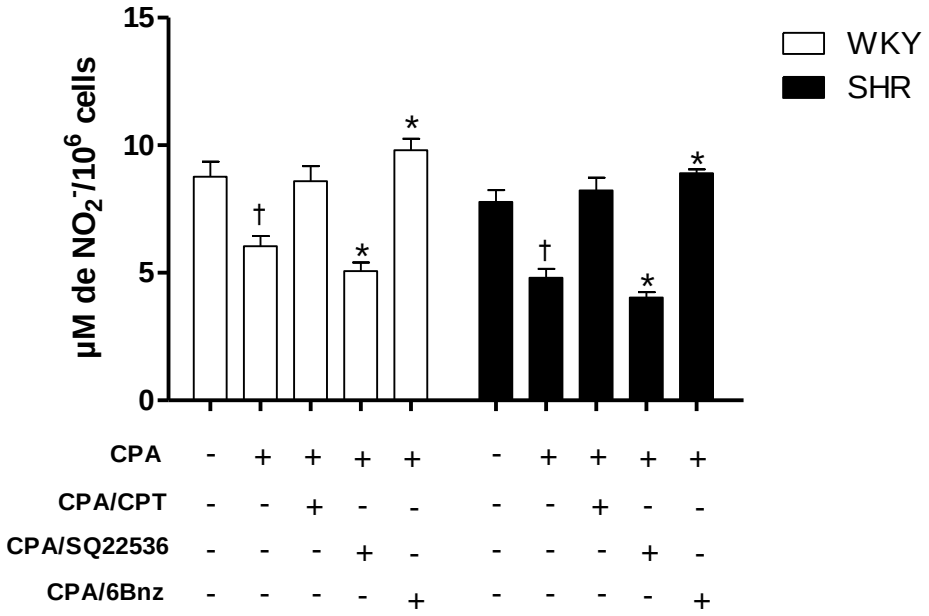


Figura 11. PKA está associada aos níveis reduzidos de nitrito mediados pelo A_1R em culturas de células da região dorsomedial do bulbo de animais normotensos e hipertensos. Níveis de nitrito em resposta ao tratamento com o agonista CPA (0,1 µM) e com o antagonista CPT do A_1R, bem como com o ativador 6Bnz (5µM) e inibidor H-89 (5 µM) da PKA em culturas de células de WKY e SHR após 12 horas. O antagonista, CPT, foi adicionado 10 min antes do agonista CPA, e aboliu a redução mediada pelo CPA dos níveis de nitrito. SQ22536, inibidor AC, exacerbou o efeito do agonista, enquanto 6Bnz reverteu os níveis reduzidos de nitrito induzido por CPA. Dados são mostrados como média ± SEM (n=3). † $p < 0,05$ comparado com os respectivos controles de cada linhagem. * $p<0,05$ comparado com o tratamento com CPA. Na análise estatística, utilizou-se ANOVA de duas vias seguido pelo pós-teste de Bonferroni.

4.3. Ativação do A_{2A}R e A_1R modula os níveis de expressão da enzima nNOS

Em ambas as linhagens, os níveis de expressão do mRNA da enzima nNOS mostraram um aumento concentração-dependente 6 horas após o tratamento com CGS21680. Por outro lado, após 12 horas os níveis de expressão do mRNA da nNOS diminuíram em WKY e SHR quando comparado aos seus respectivos controles. No entanto, somente as células de WKY exibiram níveis aumentados de mRNA para a nNOS após 24 horas de exposição ao CGS21680. Olhando para a curva temporal, um rearranjo da curva concentração resposta, mostra que WKY e SHR tem seus níveis aumentados de expressão da nNOS nas seis primeiras horas de tratamento com o CGS21680 em todas as concentrações, com um efeito pronunciado na concentração de 10 μM (Figura 13). Entretanto, nenhuma alteração visível foi observada na expressão do mRNA da nNOS com 12 horas de tratamento em nenhuma das linhagens. Contudo, após 24 horas de tratamento com CGS21680, culturas de WKY tiveram seus níveis de expressão do mRNA da nNOS aumentados em todas as concentrações. Por outro lado, culturas de SHR exibiram uma redução na expressão do mRNA para a nNOS na concentração de 0,1 μM de CGS21680, embora permanecesse próximo ao controle nas concentrações de 1 e 10 μM de CGS21680 (Figura 12).

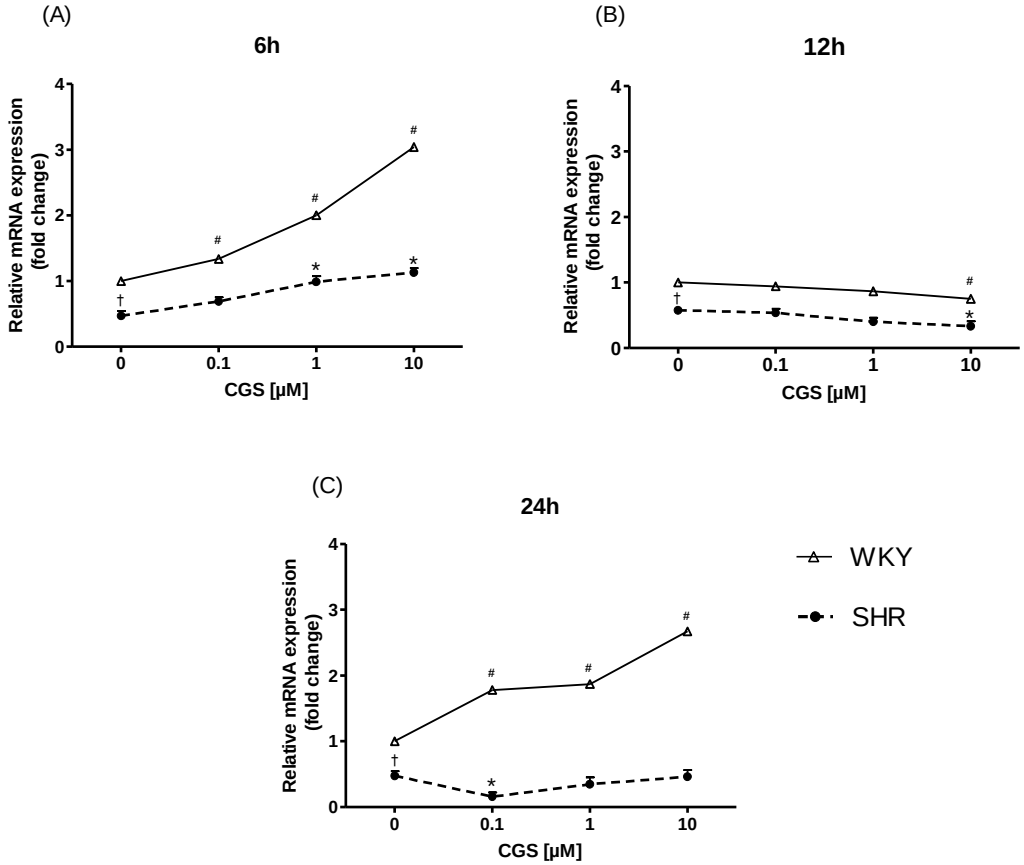


Figura 12. Curva concentração-resposta ilustrando a modulação do CGS21680 nos níveis de expressão do mRNA da nNOS em culturas de células da porção dorsomedial do bulbo de ratos WKY e SHR. (A), exposição ao CGS21680 durante 6 horas induziu um aumento concentração dependente na expressão do mRNA da nNOS em ambas as linhagens. (B), após 12 horas de tratamento com CGS21680 ocorreu um efeito oposto nos níveis do mRNA da nNOS comparado às primeiras 6 horas, com uma diminuição significativa na concentração de 10 μM em ambas as linhagens. (C), após 24 horas de tratamento com o agonista, os níveis de mRNA da nNOS aumentaram apenas em culturas de células de WKY. Diferentemente da linhagem SHR, onde os níveis de expressão do mRNA da nNOS permaneceram próximos ao basal, os níveis de mRNA da nNOS voltaram a aumentar em ratos WKY. Os dados estão representados por média ± SEM (n=3), † $p < 0,05$ quando comparado com o controle WKY, # $p < 0,05$ quando comparado com a situação basal em WKY e * $p < 0,05$ quando comparado com os níveis basais em SHR. ANOVA de duas vias seguido do pós-teste Bonferroni foi utilizado na análise estatística.

Contrariamente aos efeitos da ativação do $A_{2A}R$ sobre os níveis de expressão do mRNA da nNOS, onde o agonista CGS21680 promoveu efeitos mais pronunciados em todas as concentrações e tempos realizados, a estimulação do A_1R pelo agonista CPA promoveu respostas mais restritas. Em ambas as linhagens, os níveis de expressão do mRNA da enzima nNOS diminuíram apenas na concentração de 10 μM em todos os tempos de exposição ao tratamento pelo agonista comparado com seus respectivos controles (Figura 13). Pode-se observar que a expressão de nNOS nas culturas de SHR está muito diminuída em comparação com a da linhagem normotensa.

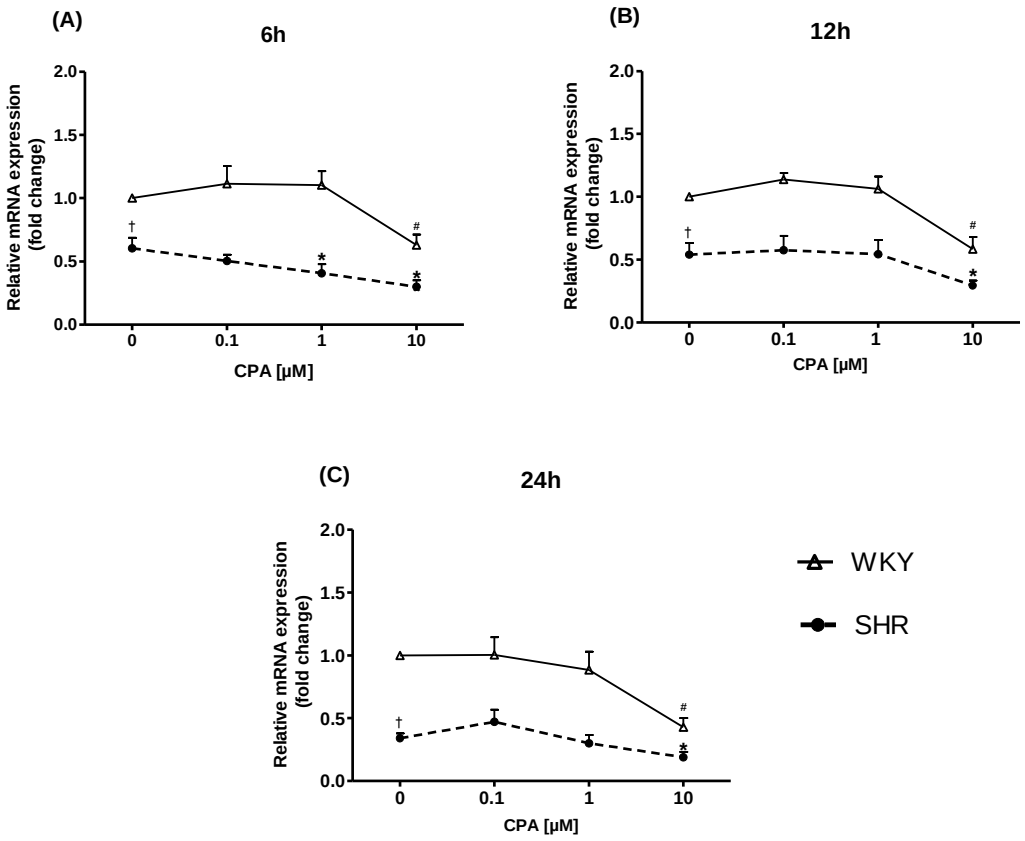


Figura 13. Curva concentração-resposta ilustrando a modulação exercida pelo agonista CPA nos níveis de expressão do mRNA da nNOS em culturas de células da porção dorsomedial do bulbo de SHR e WKY. (A) a exposição ao CPA durante 6 horas induziu uma diminuição da expressão do mRNA da nNOS apenas na concentração de 10 µM em WKY e SHR. Durante 12 (B) e 24 horas (C) de tratamento com o agonista CPA ambas as linhagens apresentaram o mesmo perfil de resposta na expressão do mRNA da nNOS. Os dados estão representados por média ± SEM (n=3), # $p<0,05$ comparado aos níveis basais de WKY e * $p<0,05$ quando comparado aos níveis basais de SHR. ANOVA de duas vias seguido pelo pós-teste de Bonferroni foi utilizado na análise estatística.

4.4. *Inibição da nNOS pelo L-NAME modula os níveis de nitrito*

A enzima nNOS é encontrada em altas concentrações em muitas áreas do cérebro, particularmente no NTS (Sapoval et al. 2004). Para determinar se a mesma está envolvida no níveis de nitrito pelo CGS21680, foi avaliado o efeito do tratamento com L-NAME, um inibidor não seletivo da nNOS, em culturas de células de WKY e SHR. Em ambas as linhagens, o L-NAME, reverteu o efeito do CGS21680 nos níveis de nitrito (Figura 14). Embora não seja estatisticamente significativo, parece que o L-NAME sozinho diminuiu os níveis de nitrito em ambas as culturas.

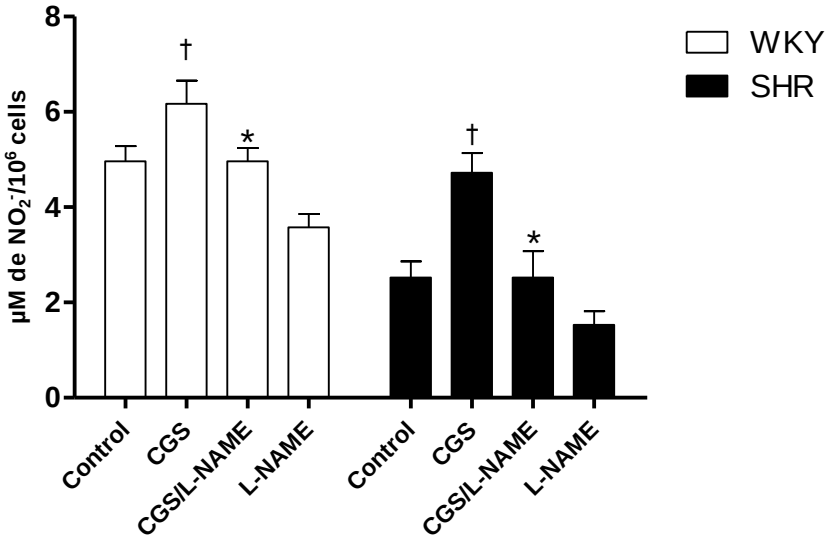


Figura 14. Inibição da enzima nNOS diminui os níveis de nitrito em culturas de células da região dorsomedial do bulbo. Em WKY e SHR, o inibidor da nNOS, L-NAME (5 µM), aboliu o aumento de nitrito mediado pelo CGS21680 (10 µM). L-NAME foi adicionado 10 minutos antes do CGS21680. Os dados estão representados como média ± SEM (n=3). † $p<0,05$ comparado com seus respectivos controles e * $p<0.05$ comparado com o tratamento com CGS21680 na linhagem. Na análise estatística, utilizou-se o teste ANOVA de duas vias seguido pelo pós-teste de Bonferroni.

4.5. Knockdown do A_{2A}R e A_1R modula os níveis de expressão da enzima nNOS.

Uma vez observadas mudanças nos níveis de expressão do mRNA da nNOS após estimulação dos A_{2A}R e A_1R em culturas de células da porção dorsomedial do bulbo das duas linhagens, e que os antagonistas ZM e CPT, reverteram os níveis de nitrito desencadeados pelos agonistas CGS21680 e CPA, respectivamente, avaliou-se também os efeitos do *knockdown* do A_{2A}R e do A_1R sobre os níveis de expressão do mRNA da nNOS.

As células que expressaram GFP foram observadas após a infecção dos neurônios, em bom estado de multiplicidade de infecção (m.o.i.) de 15. O shRNA para o A_{2A}R significativamente diminuiu os níveis deste receptor em ambas as culturas (27,8% em WKY e 39,0% em SHR) quando comparado com o controle negativo *non-silence* (Figura 15). Paralelamente, esta redução na expressão do mRNA do A_{2A}R foi acompanhada por uma diminuição nos níveis do mRNA da proteína nNOS, 22,5% em WKY e 30,9% em SHR como mostrado na figura 16.

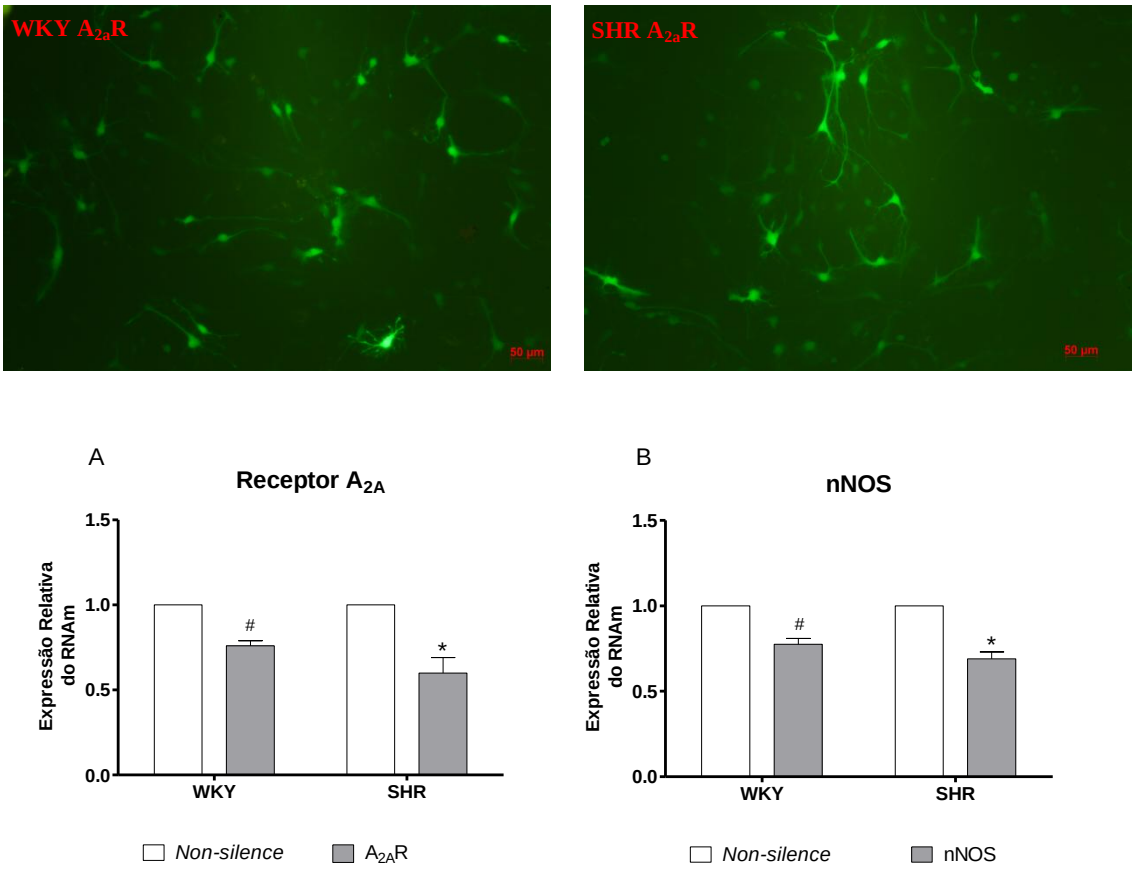


Figura 15. Knockdown do $A_{2A}R$ diminui os níveis de expressão do mRNA da nNOS em culturas de células da região dorsomedial do bulbo de ratos WKY e SHR. O knockdown do $A_{2A}R$ foi confirmado analisando os níveis do mRNA do após infecção com o vetor antiviral pGIPZ contendo o shRNAmir para o $A_{2A}R$. As imagens foram obtidas 5 dias após a infecção com o lentivírus (m.o.i. = 15). Em ambas as linhagens, os níveis de expressão do $A_{2A}R$ foram reduzidos comparado ao controle *non-silence* (A). Concomitante, os níveis de expressão do mRNA da nNOS também diminuíram em culturas de células infectadas com shRNAmir para o $A_{2A}R$ comparado ao controle *non-silence* (B). Dados são apresentados como mean ± SEM (n=3), # $p<0,05$ em comparação ao controle *non-silence* da linhagem WKY e * $p<0,05$ comparado ao controle *non-silence* da linhagem SHR. O teste t de Student foi empregado na análise estatística.

Por outro lado, vetores lentivirais contendo o shRNA para o A_1R foram também incubados nas culturas das linhagens normotensa e hipertensa. O shRNA para o A_1R produziu uma significativa redução nos níveis de expressão do A_1R em ambas as linhagens, 39,2% em WKY e 24,5% em SHR,

comparado ao controle negativo *non-silence* (Figura 16A). Concomitante, a *downregulation* do A_1R foi acompanhada por um aumento nos níveis do mRNA da nNOS, 29,5% em WKY e 59,0% em SHR, em comparação também com o controle negativo *non-silence* (Figura 16B).

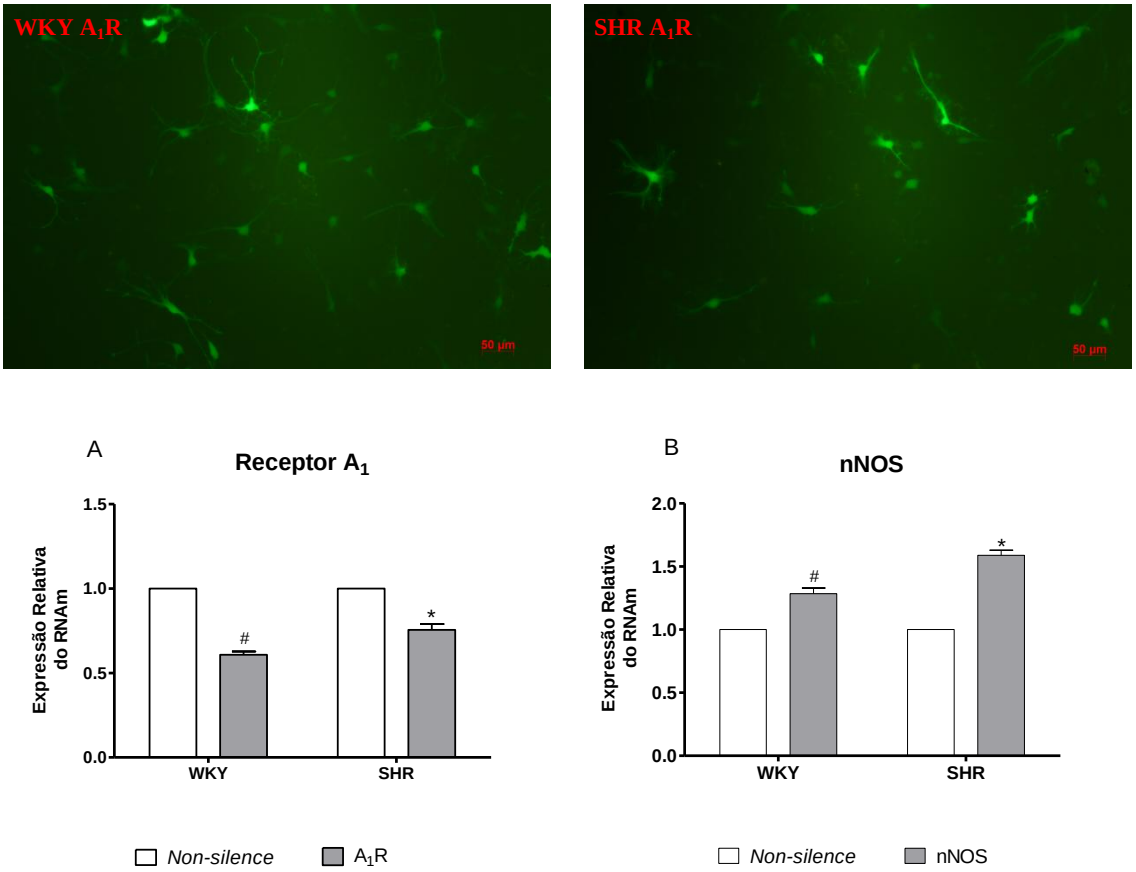


Figura 16. knockdown do A_1R aumenta os níveis de expressão do mRNA da enzima nNOS em culturas de células da porção dorsomedial do bulbo de WKY e SHR. O knockdown do A_1R foi confirmado analisando os níveis do MRNA do receptor após infecção com o vetor antiviral pGIPZ contendo o shRNAmir para o A_1R. As imagens foram obtidas 5 dias após a infecção com o lentivírus (m.o.i. = 15). Em ambas as linhagens, os níveis de expressão do A_1R reduziram comparado ao controle *non-silence* (A). Concomitante, os níveis de expressão do mRNA da nNOS aumentaram em culturas de células infectadas com shRNAmir para o A_1R comparado ao controle non-silence (B). Dados são apresentados como mean ± SEM (n=3), # $p<0,05$ comparado ao controle *non-silence* da linhagem WKY e * $p<0,05$ comparado ao controle *non-silence* da linhagem SHR. O teste t de Student foi empregado na análise estatística.

5. Discussão

A adenosina assim como o óxido nítrico são moléculas neuromoduladoras clássicas que, além de ativam diretamente respostas neurais, promovem um ajuste fino na transmissão sináptica. O ajuste da transmissão sináptica pela adenosina ocorre por sua ação direta sobre os receptores adenosinérgicos pré-sinápticos regulando a liberação de diversos neurotransmisssores. O NO, contudo, apesar de não possuir receptores específicos, sua alta difusibilidade e natureza onipresente permite que ele opere como um mensageiro intercelular dentro de limites espaciais de 0,3-0,4 mm modulando a liberação neuronal de mensageiros químicos.

A adenosina como neuromoduladora diminui a liberação de neurotransmissores via ativação do A_1R e aumenta através da estimulação do $A_{2A}R$ (Quata et al. 2004). Sendo assim, dependendo do receptor ativado, a adenosina pode aumentar ou diminuir a liberação de mensageiros químicos em uma mesma terminação sináptica. Em condições basais, baixas concentrações de adenosina preferencialmente estimulam o A_1R e, consequentemente, se observa um efeito inibitório sobre a transmissão sináptica (Fredholm et al. 2001). Por outro lado, também em condições basais, o aumento da concentração de adenosina favorece a ativação dos $A_{2A}R$ em terminais sinápticos que possuem ambos receptores, tanto na forma monomérica (Cunha e Ribeiro, 2000a) quanto na forma de heterodímeros (Ciruela et al. 2006). Isso sugere que a concentração da adenosina numa dada sinapse está envolvida diretamente com sua ação depressora ou facilitadora da transmissão sináptica.

Adenosina e NO, com suas características intrínsecas, estão envolvidos em diversos processos fisiológicos no SNC, de forma que o desequilíbrio em suas vias de sinalização pode contribuir para o surgimento de diversas fisiopatologias como, por exemplo, a hipertensão neurogênica. Assim, a

modulação da liberação de neurotransmissores por estas substâncias vem sendo extensamente estudada devido a sua relevância fisiopatológica no SNC.

A adenosina tem sido descrita como um importante metamodulador no SNC, além de sua função moduladora (Sebastião e Ribeiro, 2009), inclusive em áreas de controle cardiovascular, como é o caso do NTS (Thomas et al. 2000). O NO também tem um papel importante no controle neural da função cardiovascular (Zanzinger, 1999, Hojná et al. 2006), uma vez que suas atuações no sistema cardiovascular não são restritas a seus efeitos diretos nos vasos e células sanguíneas, mas abrange efeitos em todos os substratos neurais que contribuem para a geração das respostas autonômicas centrais e periféricas. Os efeitos cardiovasculares da adenosina e do NO no NTS são notavelmente semelhantes e ambos, no NTS, participam do efeito hipotensor, o que sugere algum grau de interação dentro deste núcleo.

Estudos realizados em 1995 pelo grupo de Luigi Stella na Universidade de Nápoli revelaram a participação do NO no efeito hipotensor induzido pela ativação purinérgica no sistema nervoso periférico e central. Seus resultados mostraram que a hipotensão mediada pelo NO é específica à ativação do $A_{2A}R$, uma vez que nem o L-NAME nem a L-arginina, nas mesmas condições experimentais, não modificaram a resposta do agonista do A_1R. Mais tarde, em 1998, o grupo de Chen Lo também obteve resultados similares, onde tanto a injeção de adenosina quanto de L-arginina diminuíram a pressão arterial e a frequência cardíaca. Aqui, nosso trabalho dialoga com os resultados destes pesquisadores, uma vez que investigamos o papel modulatório dos A_1R e $A_{2A}R$ sobre a liberação de NO levando em conta a produção de nitrito, a sinalização desencadeada por estes receptores e a potencial contribuição da enzima nNOS em culturas de células da região dorsomedial do bulbo de neonatos normotensos e hipertensos. Os principais achados enfatizam a importante relação entre NO e adenosina, mediante seus receptores específicos A_1R e $A_{2A}R$, em cultura de células do bulbo dorsal, o que pode

auxiliar na compreensão dos mecanismos envolvidos no controle cardiovascular: i) a ativação do $A_{2A}R$ aumenta os níveis de nitrito, enquanto a estimulação do A_1R diminui; ii) a via de sinalização cAMP-PKA está envolvida na modulação dos níveis de nitrito desencadeada pela ativação dos receptores adenosinérgicos A_1R e $A_{2A}R$; iii) a isoforma nNOS parece mediar a produção de nitrito e, consequentemente, de NO e iv) *knockdown* de A_1R e de $A_{2A}R$ alteram os níveis de expressão do mRNA da enzima nNOS.

Nós observamos que o tratamento com o agonista do $A_{2A}R$, CGS21680, induz um aumento concentração-dependente nos níveis de nitrito tanto na linhagem WKY quanto na linhagem SHR. Notadamente, este efeito foi atenuado pela administração do antagonista seletivo do receptor $A_{2A}R$, ZM241385. Por outro lado, ativação do receptor A_1R usando o agonista CPA induziu um decréscimo nos níveis de nitrito em todas as concentrações e tempos experimentais, dimimuição esta que foi abolida pelo tratamento com o antagonista CPT. Estes dados sugerem que os receptores A_1R e $A_{2A}R$ modulam diferencialmente os níveis de nitrito em células cultivadas da região dorsomedial do NTS. É importante ressaltar que em células vasculares lisas o agonista CPA atua inibindo a acumulação de nitrito em baixas concentrações (10^{-8} e 10^{-7}M), mas significativamente aumenta os níveis de nitrito em concentrações mais altas (10^{-5} M) (Ikeda et al. 1997). Em nosso modelo, a curva parece deslocar para a direita uma vez que a inibição exercida pelo CPA ocorreu até uma concentração de 10^{-5} M. Nossos resultados corroboram o trabalho de Stella et al. (1995) onde se observou a modulação do NO pela estimulação do receptor $A_{2A}R$ *in vivo*. Em outro modelo, Saura et al. (2005) também ressalta a capacidade do agonista específico do receptor $A_{2A}R$, CGS21680, o mesmo usado neste estudo, em potencializar a liberação de NO induzida por LPS em culturas gliais mistas. Nossos dados parecem consistentes com o papel desempenhado pelo NO na hipotensão mediada pela ativação do $A_{2A}R$. Já a ativação do A_1R e sua influência direta sobre os

níveis de NO parece pouco retratada no NTS. Em outros modelos, como é o caso de membranas atriais de rato, a estimulação do A_1R pelo agonista CPA leva à ativação da NOS dependente de cálcio-calmodulina e à síntese de NO (Sterin-Borba et al. 2002). Contudo, a inibição de vias ligadas ao barorreflexo e, por conseguinte, respostas pressoras e simpatoexcitatórias mediadas pela estimulação do A_1R é bem estudada (Scislo e O'Leary, 2002; Ichinose e Scislo, 2012). Estes mesmos pesquisadores sugerem que a adenosina atuando via A_1R no NTS deve inibir o barorreflexo através da inibição da transmissão glutamatérgica. Desde que o NO facilita a transmissão glutamatérgica no NTS (Ichinose e Scislo, 2012), a inibição da produção de NO através da ativação do A_1R deve contribuir para as respostas pressoras e simpatoexcitatórias promovidas por este receptor.

A produção de NO e, consequentemente, de nitrito é mediada pelas enzimas sintases de NO. Das 3 isoformas existentes, a nNOS tem uma ampla distribuição no bulbo (Gao et al. 2008). Em nosso modelo, o inibidor não seletivo desta isoforma, L-NAME, foi capaz de abolir os níveis aumentados de nitrito desencadeados pelo CGS21680 em culturas de WKY e SHR. Este resultado corrobora os achados de Scislo e colaboradores (2005) onde o antagonista seletivo da nNOS, TRIM, e o L-NAME aboliram ou reverteram a resposta simpatoinibitória mediada pela estimulação do $A_{2A}R$ no NTS. Embora o L-NAME, iniba as isoformas eNOS e nNOS, a produção de NO em células nervosas é mais comumente catalisada pela nNOS (Sapoval et al. 2004). Este argumento é sustentado pelo fato de que, no trabalho de Scislo, os efeitos do L-NAME foram ligeiramente maiores do que os efeitos do TRIM, de forma que é possível inferir que as respostas hemodinâmicas e simpatoinibitórias decorrentes da estimulação do $A_{2A}R$ sejam mediadas predominantemente pela nNOS com uma pequena, ou nenhuma, contribuição da eNOS. Diante desses dados e baseado em nossos resultados,

é admissível sugerir uma potencial contribuição da isoforma nNOS ao aumento de NO evocado pela estimulação do $A_{2A}R$ em nosso modelo.

Dados obtidos anteriormente por nosso grupo (Ferrari e Fior-Chadi 2005) e mesmo por Plochocka-Zulinska and Krukoff em 1997 mostram uma *upregulation* do MRNA da nNOS em áreas específicas de animais SHR. Entretanto, nós encontramos uma *downregulation* desta isoforma em SHR em comparação com WKY. No entanto, é impraticável qualquer tipo de comparação devido à diferença de idade entre os animais utilizados nos experimentos, uma vez que usamos ratos neonatos para a cultura, enquanto aqueles usaram ratos pré-hipertensos ou mesmo ratos com hipertensão já estabelecida. Outro fato a se considerar é que empregamos culturas de células da região dorsomedial do bulbo e nos estudos de Ferrari foi analisado seções do NTS, enquanto Plochocka-Zulinska trabalhou com homogeinado de tecido.

No presente estudo também avaliamos o papel modulatório dos A_1R e $A_{2A}R$ sobre os níveis de mRNA da enzima nNOS. Primeiramente, o tratamento com CGS21680 mostrou um aumento, concentração-dependente, nos níveis de mRNA da NOS nas primeiras 6 horas tanto em WKY quanto em SHR. Entretanto, esta resposta foi revertida dentro das 12 horas de tratamento em ambas as linhagens. Uma explicação plausível para o ocorrido leva em conta a dessensibilização do sistema adenosinérgico. Dessensibilização induzida pelo agonista é uma característica universal dos receptores acoplados à proteína G, incluindo o $A_{2A}R$ (Klaasse et al. 2008; Ferguson 2001). Embasamento para o observado vem de estudos realizados por Barraco e colaboradores (1996), onde os $A_{2A}Rs$ no NTS mostraram-se dessensibilizados, uma vez que a liberação de serotonina diminuiu após longa exposição ao CGS21680. Ainda, um trabalho anterior de Barraco e colaboradores (1995) revelou que a dessensibilização do $A_{2A}R$ foi associada a uma menor liberação de noradrenalina no NTS. Outros pesquisadores

(Palmer et al. 1994; Mayfield et al. 1993) também reportaram uma liberação reduzida de neurotransmissores após tratamento com CGS21680 em altas concentrações e, especialmente, por longos períodos de exposição. De acordo com Palmer, tratamento a longo prazo com CGS21680 levou a uma *downregulation* do $A_{2A}R$ já nas primeiras 8 h de exposição. Interessantemente, os dados levantados aqui mostram que mecanismos intrínsecos de controle parecem ser desencadeados para restaurar o sistema dentro de 24 horas na linhagem normotensa, mas não na linhagem SHR.

Por outro lado, o efeito da ativação do A_1R na expressão do mRNA da nNOS parece ocorrer em altas concentrações de CPA (10^{-5} M), uma vez que nas concentrações de 10^{-7} e 10^{-6} M, mínima ou nehuma alteração nos níveis da nNOS foi observado. Dado que estudos relatam o envolvimento da isoforma nNOS em respostas simpatoexcitatórias (Guo et al. 2009), nós hipotetizamos que o NO sintetizado pela nNOS deve atuar de forma excitatória sobre a transmissão do barorreflexo no NTS após estimulação do $A_{2A}R$, enquanto a redução da expressão da nNOS no NTS através da ativação do A_1R atenuaria a função do barorreflexo.

Embora agonistas e antagonistas dos A_1R e $A_{2A}R$ forneçam informações importantes sobre as funções destes receptores, a incerteza sobre sua seletividade pode levantar questões a respeito de seus efeitos. Assim sendo, para elucidar a função de muitos receptores com uma maior especificidade, novas ferramentas genéticas têm sido desenvolvidas, tal como a interferência mediada por RNA. Quando a expressão do A_1R e do $A_{2A}R$ foi diminuída em cultura de células de WKY e SHR usando tal técnica, observamos uma redução de aproximadamente 32,65% nos níveis do MRNA desses receptores. Concomitantemente, os níveis de expressão da enzima nNOS tiveram um aumento e uma redução de cerca de 30% após o *knockdown* do A_1R e $A_{2A}R$.

Embora uma taxa de transdução em torno de 30% possa não ser considerada eficiente, Zhang e colaboradores (2006) também encontraram uma maior porcentagem de células expressando GFP, cerca de 45%, em cultura primária cortical 4 dias após infeção a um m.o.i. de 20. Aqui nós obtivemos cerca de 30% de eficiência em culturas do bulbo, 5 dias após a infeção e a um m.o.i. de 15, utilizando vetores lentivirais como os mesmos. Mochizuki et al. (1998) relataram que cerca de 30% das células granulares do cerebelo foram transduzidas por vetores lentivirais. Nosso resultado também está de acordo com o estudo de Cisterni et al. (2000) no qual 39,7% dos motoneurônios foram transduzidos utilizando o promotor do citomegalovírus humano (CMV). Além disso, Ralph et al. (2004) atingiram, aproximadamente, 50% de eficácia de transdução usando vetores baseados no vírus da anemia equina (EIAV) na infecção de culturas primárias de neurônios corticais.

É oportuno discutir que um dos principais obstáculos à entrega de genes em neurônios é o fato de que são células altamente diferenciadas e, por exemplo, quando se compara culturas primárias do córtex com culturas do bulbo, aquelas são menos diferenciadas que estas. Os métodos que têm sido utilizados para entregar um gene a neurônios são comumente divididos em métodos não virais e métodos virais, sendo estes últimos os que apresentam maior eficiência de transdução (Zhang et al. 2006). Porém, mesmo métodos virais, e estes incluem adenovírus, vírus associado a adenovírus (AAV), vírus herpes simplex (HSV), e vetores retrovirais, têm suas desvantagens em contrapartida à taxa elevada de transdução (During e Ashenden, 1998). Os vetores lentivirais são os ideais para transduzir neurônios, não obstante foram os vetores de escolha da maioria dos pesquisadores citados anterioremente. O motivo de sua escolha deve-se à grande capacidade de clonagem, perto de 10 kb, e de se integrar no cromossomo das células alvo, um pré-requisito para a expressão a longo prazo. O interessante é que, em contraste com retrovírus simples, os lentivírus, evoluíram a capacidade de infectar células que não se

dividem como os neurônios, porque o seu complexo de pré-integração, uma estrutura macromolecular composta do genoma viral, de algumas proteínas estruturais e das enzimas responsáveis pela transcrição reversa e integração, utiliza a maquinaria nuclear da célula para sua transcrição (Trono, 2000).

Nosso trabalho com tal metodologia é o pioneiro no que concerne este tipo de avaliação e reforça hipóteses que abordam a interação entre o sistema adenosinérgico e nitrérgico, principalmente com vistas à compreensão do controle neural da pressão arterial. Ledent e colaboradores (1997), trabalhando com camundongos nocautes para o $A_{2A}R$, observaram que a pressão arterial e a frequência cardíaca estavam aumentadas neste modelo e ainda, que o agonista específico para o $A_{2A}R$ perde sua atividade biológica nestes animais nocautes. Interessantemente, Brown et al. (2001) mostraram que a pressão arterial também está elevada em camundongos nocautes para o A_1R. No entanto, Brown também observou níveis elevados de renina no plasma desses camundongos nocautes. Uma explicação possível é que a elevação da pressão do sangue seja devido à angiotensina. É conhecido que o agonista CPA atenua a pressão arterial através da redução dos níveis de angiotensina II (Tan et al. 2012).

Se a ativação dos A_1R e $A_{2A}R$ modula os níveis de nitrito em nosso modelo, nos perguntamos qual via de sinalização estaria envolvida nesta modulação. Preferencialmente, A_1R e $A_{2A}R$ são acoplado à proteína G inibitória e estimulatória, respetivamente, e à via do cAMP-PKA (Burstock, 2007; Freedholm et al. 2001). Nós mostramos que o aumento de nitrito promovido pela ativação do $A_{2A}R$ é um mecanismo dependente da ativação da via cAMP-PKA, uma vez que o CGS21680 e o ativador da PKA, 6Bnz, facilitaram os níveis aumentados de nitrito. Efeito este que foi inibido pelo inibidor seletivo da PKA, H-89. Dados similares foram observados por Rebola e colaboradores (2002) quando a inibição da PKA com H-89 atenuou a liberação de acetilcolina induzida pelo CGS21680. Entretanto, é interessante

investigar se os mecanismos dependentes da PKA agem diretamente fosforilando ou desfosforilando a nNOS. Tanto a fosforilação a Ser1614 (Chiang et al. 2009) como a desfosforilação a Ser847 (Xu e Krukoff, 2007) podem ativar a enzima nNOS. Nós mostramos ainda que a estimulação do $A_{2A}R$ induziu um aumento nos níveis do MRNA da nNOS, o que pode ser um mecanismo dependente da PKA uma vez que Yoo e colaboradores (2012) demonstraram que a injeção intracerebroventricular do ativador de cAMP-PKA permeável à membrana, sp-cAMP, aumentou os níveis de expressão da nNOS no núcleo paraventricular (PVN).

Por outro lado, nossos dados sugerem que o A_1R exerce seu efeito inibitório sobre os níveis de nitrito através da inibição da via da AMPc-PKA, desde que a inibição da adenilato ciclase pelo SQ22536 exacerbou os níveis reduzidos de nitrito promovido pelo agonista CPA. O ativador da PKA, 6Bnz, atenuou a habilidade do CPA em reduzir os níveis de nitrito. A inibição da adenilato ciclase tem efeito direto nos níveis de AMPc provocando um decréscimo deste segundo mensageiro. Isto, por sua vez, modularia a atividade de proteínas quinases dependente de AMPc, que fosforila diversos alvos como é o caso da nNOS.

Estudos realizados por Lin e Talman (2001) relatam que os receptores de glutamato do subtipo AMPA participam na regulação cardiovascular dentro do NTS e que a resposta à ativação do receptor AMPA deve estar ligado ao NO. Na verdade, GluR1 e nNOS são colocalizados em neurônios do NTS e esta relação anatômica deve contribuir para a regulação cardiovascular (Lin et al. 2004; Lin et al. 2000b). Desde que as respostas pressoras e presumivelmente simpatoexcitatórias tem sido associadas à inibição da liberação de glutamato mediada pelo A_1R no NTS (Scislo e O'Leary, 2002), especula-se se esta resposta seja decorrente da diminuição dos níveis de óxido nítrico pela estimulação do A_1R. Contudo, mais estudos serão necessários para explorar essa possibilidade.

6. Conclusões

Em culturas de células da região dorsomedial do NTS de WKY e SHR:

i) A ativação do A_1R diminui os níveis de nitrito, enquanto a ativação do $A_{2A}R$ da adenosina aumenta de maneira tempo e concentração dependentes;

ii) A ativação da via da PKA pelos receptores A_1R e $A_{2A}R$ está envolvida na redução e no aumento dos níveis de nitrito, respectivamente.

iii) A ativação do A_1R diminui a expressão do mRNA da nNOS numa estreita faixa de concentração,

iv) A ativação do $A_{2A}R$ aumenta a expressão do mRNA da nNOS de forma tempo e concentração dependentes e de maneira diferenciada nas linhagens normotensa e hipertensa,

v) O *knockdown* do A_1R promove um aumento na expressão do mRNA da nNOS, enquanto os níveis diminuídos do $A_{2A}R$ reduzem a expressão do mRNA da nNOS.

vi) O perfil modulatório do $A_{2A}R$ sobre os níveis de nitrito é parcialmente diferenciado na linhagem hipertensa, o que deve sugerir uma contribuição destes receptores na gênese da hipertensão.

7. Referências Bibliográficas

Abbracchio M.P., Brambilla S., Ceruti H.O., Kim D.K. von Lubitz, K.A. Jacobson, and F. Cattabeni. 1995. G protein-dependent activation of phospholipase C by adenosine A3 receptors in rat brain. Mol Pharmacol. 48:1038-45

Alloisio S., Cugnoli C., Ferroni S., Nobile M. 2004. Differential modulation of ATP-induced calcium signalling by A1 and A2 adenosine receptors in cultured cortical astrocytes. Br. J. Pharmacol. 141:935Y42.

Ambrosio A.F., Malva J.O., Carvalho A.P., Carvalho C.M. 1997. Inhibition of N, P, Q and other types of Ca^{+2} channels in rat hippocampal nerve terminals by the adenosine A_1 receptor. Eur. J. Pharmacol. 340:301–310.

Baraldi P.G., Romagnoli R., Preti D., Fruttarolo F., Carrion M.D., Tabrizi M.A. 2006. Ligands for A2B adenosine receptor subtype. Curr. Med. Chem. 13:3467–3482.

Barraco R.A., Clough-Helfman C., Goodwin B.P., Anderson G.F. 1995. Evidence for presynaptic adenosine A_{2A} receptors associated with norepinephrine release and their desensitization in the rat nucleus tractus solitarius. J. Neurochem. 4: 1604-1611.

Barraco, R.A., O'Leary, D.S., Ergene, E, Scislo, T.J., 1996. Activation of purinergic receptor subtypes in the nucleus tractus solitarius elicits specific regional vascular response patterns. J. Auton. Nerv. Syst. 59, 113 - 24.

Belhassen B. & Pelleg A. 1984. Electrophysiologic effects of adenosine triphosphate and adenosine on the mammalian heart: Clinical and experimental aspects. J. Am. Coll. Cardiol. 4:414–424.

Brambilla R., Cottini L., Fumagalli M. 2003. Blockade of A_{2A} adenosine receptors prevents basic fibroblast growth factor-induced reactive astrogliosis in rat striatal primary astrocytes. Glia. 43:190Y4.

Bredt, D.S. & Snyder, S.H. 1989. Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum. Proc. Natl. Acad. Sci. 86: 9030-3.

Brenman, J. E. & D. S. Bredt. 1997. Synaptic signaling by nitric oxide. Curr. Opin. Neurobiol. 7(3)374-8.

Broch O.J., Ueland P.M. 1980. Regional and subcellular distribution of S-adenosylhomocysteine hydrolase in the adult rat brain. J. Neurochem. 35(2):484-8.

Brodie C., Blumberg P.M., Jacobson K.A. 1998. Activation of the A_{2A} adenosine receptor inhibits nitric oxide production in glial cells. FEBS Lett. 429: 139Y42.

Brown R., Ollerstam A., Johansson B., Skott O., Fredholm B.B., Persson A.E.G. 2001. Abolished tubuloglomerular feedback and increased renin release in adenosine A_1 receptor deficient mice. Am. J. Physiol. 281:R1362–R1367.

Bruns R.F., Lu G.H., Pugsley T.A. 1986. Characterization of the A_2 adenosine receptor labeled by [3H]NECA in rat striatal membranes. Mol. Pharmacol. 29:331–346.

Bryan N.S., Grisham M.B. 2007. Methods to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples. Free Radical Biology & Medicine 43:645-657.

Burnstock J. 2007. Physiology and Pathophysiology of Purinergic Neurotransmission. Physiol. Rev. 87:659-797.

Carrettiero D.C. and Fior-Chadi D.R. 2004. Adenosine A_1 receptor distribution in the nucleus tractus solitarii of normotensive and spontaneously hypertensive rats. J Neural Transm. 111:465-73.

Carrettiero D.C., Almeida R.S., Fior-Chadi D.R. 2008. Adenosine modulates alpha2-adrenergic receptors within the nucleus tractus solitarii of

normotensive and spontaneously hypertensive rats. Hypertension Research. 31(12):2177-86.

Carrettiero D.C. and D.R. Fior-Chadi. 2008. Age-dependent changes in adenosine A_1 receptor distribution and density within the nucleus tractus solitarii of normotensive and hypertensive rats. J. Neural Transm.115(8):1109-18.

Carrettiero D.C., da Silva S.M., Fior-Chadi D.R. 2009. Adenosine modulates alpha2-adrenergic receptors through phospholipase C in brainstem cell culture of rats. Auton Neuroscience. 151(2):174-7.

Chen H., Yang D., Carroll S.H., Eltzschig H.K., Ravid K. 2009. Activation of the macrophage A_{2B} adenosine receptor regulates tumor necrosis factor-alpha levels following vascular injury. Exp. Hematol. 37:533–538.

Chen Lo W., Jan C.R., Wu S.N., Tseng C.J. 1998. Cardiovascular effects of nitric oxide and adenosine in the nucleus tractus solitarii of rats. Hypertension. 32:1034-1038.

Chiang H.T., Cheng W.H., Lu P.J., Huang H.N., Lo W.C., Tseng Y.C., Wang J.L., Hsiao M., Tseng C.J. 2009. Neuronal nitric oxide synthase activation is involved in insulin-mediated cardiovascular effects in the nucleus tractus solitarii of rats. Neuroscience. 159:727-734.

Choi D.S., Cascini M.G., Mailliard W., Young H., Paredes P., McMahon T., Diamond I., Bonci A., Messing R.O. 2004. The type 1 equilibrative nucleoside transporter regulates ethanol intoxication and preference. Nat. Neuroscience. 7(8):855-61.

Ciccarelli R., Ballerini P., Sabatino G. 2001. Involvement of astrocytes in purine-mediated reparative processes in the brain. J. Dev. Neuroscience. 19: 395Y414.

Ciruela F., Casadó V., Rodrigues R.J., Lujan R., Burguenõ J., Canals M., Borycz J., Rebola N., Goldberg S.R., Mallol J., Cortés A., Canela E.I.,

Lopez-Gimenez J.F., Milligan G., Lluis C., Cunha R.A., Ferré S., Franco R. 2006. Presynaptic control of striatal glutamatergic neurotransmission by adenosine A1–A_{2A} receptor heteromers. J. Neuroscience. 26:2080–2087.

Cisterni C., Henderson C.E., Aebischer P., Pettmann B, Deglon N. 2000. Efficient gene transfer and expression of biologically active glial cell line-derived neurotrophic factor in rat motoneurons transduced with lentiviral vectors. J. Neurochem. 74(5):1820-28.

Cormier R.J., Mennerick S., Melbostad H., Zorumski C.F. 2001. Basal levels of adenosine modulate mGluR5 on rat hippocampal astrocytes. Glia. 33: 24Y35.

Correia-de-Sá P., Ribeiro J.A. 1994. Tonic adenosine A_{2A} receptor activation modulates nicotinic autoreceptor function at the rat neuromuscular junction. Eur. J. Pharmacol. 271: 349Y55.

Correia-de-Sá P., Ribeiro J.A. 1994. Potentiation by tonic A_{2A} adenosine receptor activation of CGRP-facilitated [3H]-ACh release from rat motor nerve endings. Br. J. Pharmacol. 111: 582Y8.

Correia-de-Sá P., Timóteo M.A., Ribeiro J.A. 2001. Synergism between A_{2A} adenosine receptor activation and vasoactive intestinal peptide to facilitate [3H]-acetylcholine release from the rat motor nerve terminals. Neuroscience Lett. 309: 101Y4.

Cunha R.A., Correia-de-Sá P., Sebastiao A.M., Ribeiro J.A. 1996. Preferential activation of excitatory adenosine receptors at rat hippocampal and neuromuscular synapses by adenosine formed from released adenine nucleotides. Br. J. Pharmacol. 119: 253Y60.

Cunha R. A, Sebastião A.M., Ribeiro J.A. 2000. Adenosine modulation and transduction mechanisms involved in the action of VIP on [3H]-GABA release from hippocampal synaptosomes. Drug Dev. Res. 50: 83.

Cunha R.A., Ribeiro J.A. 2000a. Adenosine A_{2A} receptor facilitation of synaptic transmission in the CA1 area of the rat hippocampus requires protein kinase C but not protein kinase A activation. Neuroscience Lett. 289: 127-130.

Cunha, R.A. 2001. Adenosine as a neuromodulator and as a homeostatic regulator in the nervous system: different roles, different sources and different receptors. Neurochem. Int. 38:107-125.

Cunha R.A. 2005. Neuroprotection by adenosine in the brain: From A_1 receptor activation to A_{2A} receptor blockade. Purinergic Sign. 1: 111-134.

Cunha R.A. 2008. Different cellular sources and different roles of adenosine: A_1 receptor-mediated inhibition through astrocytic-driven volume transmission and synapse-restricted A_{2A} receptor-mediated facilitation of plasticity. Neurochem Int. 52(1-2):65-72.

de Mendonça A., Sebastião AM, Ribeiro JA. 1995. Inhibition of NMDA receptor-mediated currents in isolated rat hippocampal neurones by adenosine A1 receptor activation. Neuro Report. 6: 1097Y100.

de Mendonça A. & Ribeiro J.A. 1997. Adenosine and neuronal plasticity. Life Science. 60: 245Y51.

Deguchi T. & Yoshioka M. 1982. Arginine identified as an endogenous activator for soluble guanylate cyclase from neuroblastoma cells. J. Biol. Chem. 257:10147-52.

Delacretaz E. 2006. Clinical practice. Supraventricular tachycardia. Engl. J. Med. 354:1039–1051.

Diógenes M.J., Fernandes C.C., Sebastião A.M., Ribeiro J.A. 2004. Activation of adenosine A_{2A} receptor facilitates brain-derived neurotrophic factor modulation of synaptic transmission in hippocampal slices. J. Neuroscience. 24:2905Y13.

Drury AN, Szent-Gyorgyi A. 1929. The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart. J. Physiol. 68:213–237.

Dunwiddie TV, Haas HL. 1985. Adenosine increases synaptic facilitation in the in vitro rat hippocampus: evidence for a presynaptic site of action. J Physiol. 369:365-77.

Dunwiddie T.V., Masino S.A. 2001. The role and regulation of adenosine in the central nervous system. Annual Rev. Neuroscience. 24: 31Y55.

During M.J., Ashenden L.M. 1998. Towards gene therapy for the central nervous system. Mol. Med. Today. 4(11):485-93.

Eckle T., Grenz A., Laucher S., Eltzschig H.K. 2008. A_{2B} adenosine receptor signaling attenuates acute lung injury by enhancing alveolar fluid clearance in mice. J. Clin. Invest. 118:3301–3315.

Eckle T., Kohler D., Lehmann R., El Kasmi K.C., Eltzschig H.K. 2008. Hypoxia-inducible factor-1 is central to cardioprotection: A new paradigm for ischemic preconditioning. Circulation. 118:166–175.

El-Etr M., Lombes M., Baulieu E.E., Erlanger B.F. 1992. A monoclonal anti-idiotypic 'internal image' antibody that recognizes the A1 adenosine receptor potentiates the alpha 1-adrenergic activation of phospholipase C in primary cultures of mouse striatal astrocytes. Neurosci Lett. 145(1):15-8.

Eltzschig H.K., Thompson L.F., Karhausen J., Cotta R.J., Ibla J.C., Robson S.C., Colgan S.P. 2004. Endogenous adenosine produced during hypoxia attenuates neutrophil accumulation: Coordination by extracellular nucleotide metabolism. Blood. 104:3986–3992.

Eltzschig H.K., Abdulla P., Hoffman E., Hamilton K.E., Daniels D., Schonfeld C., Loffler M., Reyes G., Duszenko M., Karhausen J., Robinson A., Westerman K.A., Coe I.R., Colgan S.P. 2005. HIF-1-dependent repression of equilibrative nucleoside transporter (ENT) in hypoxia. J. Exp. Med. 202:1493–1505.

Eltzschig H.K. 2009. Adenosine: An old drug newly discovered. Anesthesiology. 111(4): 904–915.

Ferguson, S.S.G. 2001. Evolving concepts in G-protein-coupled receptor endocytosis: The role in receptor desensitization and signaling. Pharmacol. Rev. 53:1–24.

Ferrari, M.F.R., Fior-Chadi, D.R. 2005. Differential expression of nNOS mRNA and protein in the nucleus tractus solitarii of young and aged Wistar–Kyoto and spontaneously hypertensive rats. J. Hypertension. 23: 1683–1690.

Ferrendelli, J.A. 1974. Elevation of cyclic GMP levels in central nervous system by excitatory and inhibitory amino acids. J. Neurochem. 22: 535-40.

Fredholm B.B., IJzerman A.P., Jacobson K.A., Klotz K.N., Linden J. 2001. International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. Pharmacol. Rev. 53:527–552.

Fredholm B.B., Irenius E., Kull B., Schulte G. 2001. Comparison of the potency of adenosine as an agonist at human adenosine receptors expressed in Chinese hamster ovary cells. Biochem. Pharmacol. 61:443–448.

Fredholm B.B., Chen J.F., Cunha R.A., Svenningsson P., Vaugeois J.M. 2005. Adenosine and brain function. Int. Rev. Neurobiol. 63:191-270.

Fredholm B.B., Chen J.F., Masino S.A., Vaugeois J.M. 2005b. Actions of adenosine at its receptors in the CNS: insights from knockouts and drugs. Annual Rev. Pharmacol. Toxicol. 45:385-412.

Fredholm B.B. 2007. Adenosine, an endogenous distress signal, modulates tissue damage and repair. Cell Death Differ. 14:1315–1323.

Furchgott R.F., Zawadzki J.V. 1980. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. Nature. 288:373–6.

Gao Z.G. & Jacobson K.A. 2007. Emerging adenosine receptor agonists. Expert Opin. Emerg. Drugs. 12:479-92.

Garthwaite J., Garthwaite G., Palmer R.M., Moncada S. 1989. NMDA receptor activation induces nitric oxide synthesis from arginine in rat brain slices. Eur. J. Pharmacol. 172: 413-6.

Green L.C., Tannenbaum S.R., Goldman P. 1981. Nitrate synthesis in the germfree and conventional rat. Science. 212: 56-8.

Greene R.W. & Haas H.L. 1991. The electrophysiology of adenosine in the mammalian central nervous system. . Neurobiol. 36:329Y41.

Gu J.G., Foga I.O., Parkinson F.E., Geiger J.D. 1995. Involvement of bidirectional adenosine transporters in the release of L-[3H]adenosine from rat brain synaptosomal preparations. J. Neurochem. 64(5):2105-10.

Guo Z.L., Tjen-A-Looi S.C., Fu L.W., Longhurst J.C. 2009. Nitric oxide in rostral ventrolateral medulla regulates cardiac-sympathetic reflexes: role of synthase isoforms. Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 297:H1478-H1486.

Haberg A., Qu H., Haraldseth O., Unsgard G, Sonnewald U. 2000. In vivo effects of adenosine A1 receptor agonist and antagonist on neuronal and astrocytic intermediary metabolism studied with ex vivo 13C NMR spectroscopy. J. Neurochem. 74: 327Y33.

Halassa M.M., Fellin T., Haydon P.G. 2007. The tripartite synapse: roles for gliotransmission in health and disease. Trends Mol. Med. 13:54-63.

Halker R.B., Demaerschalk B.M., Wellik K.E., Wingerchuk D.M., Rubin D.I., Crum B.A., Dodick D.W. 2007. Caffeine for the prevention and treatment of postdural puncture headache: debunking the myth. Neurologist 13:323–327.

Hammer J., Qu H, Haberg A, Sonnewald U. 2001. In vivo effects of adenosine A_2 receptor agonist and antagonist on neuronal and astrocytic intermediary metabolism studied with ex vivo 13C MR spectroscopy. J. Neurochem. 79: 885Y92.

Hampl K.F., Schneider M.C., Ruttimann U., Ummenhofer W., Drewe J. 1995. Perioperative administration of caffeine tablets for prevention of postoperative headaches. Can. J. Anaesth. 42:789–7892.

Hart M.L., Kohler D., Eckle T., Kloor D., Stahl G.L., Eltzschig H.K. 2008. Direct treatment of mouse or human blood with soluble 5'-nucleotidase inhibits platelet aggregation. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 28:1477–1483.

Hasko G., Linden J., Cronstein B., Pacher P. 2008. Therapeutic aspects for inflammatory and immune diseases. Nat. Rev. Drug Discov. 7:759–770.

Hindley S., Herman M.A., Rathbone M.P. 1994. Stimulation of reactive astrogliosis in vivo by extracellular adenosine diphosphate or an adenosine A_2 receptor agonist. J. Neuroscience Res. 38: 399Y406.

Hojná S., Kadlecová M., Dobesová Z., Valousková V., Zicha J., Kunes J. 2006. The participation of brain NO synthase in blood pressure control of spontaneously hypertensive rats. Molecular and Cellular Biochemistry. 297:21-29.

Hosli E. & Hosli L. 1988. Autoradiographic studies on the uptake of adenosine and on binding of adenosine analogues in neurons and astrocytes of cultured rat cerebellum and spinal cord. Neuroscience. 24: 621Y8.

Ichinose T.K., Minic Z., Li C., O'Leary D.S, Scislo T.J. 2012. Activation of NTS A_1 adenosine receptors inhibits regional sympathetic responses evoked by activation of cardiopulmonary chemoreflex. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 303(5):R539-50.

Ikeda U., Kurosaki K., Ohya K., Shimada K. 1997. Adenosine stimulates nitric oxide synthesis in vascular smooth muscle cells. Cardiovasc. Res. 35(1):168-74.

Jaffrey S.R., Erdjument-Bromage H., Ferris C.D., Tempst P., Snyder S.H. 2002. Protein S-nitrosylation: a physiological signal for neuronal nitric oxide. Nat Cell Biol. 2001:193-7.

Jin X., Shepherd R.K., Duling B.R., Linden J. 1997. Inosine binds to A3 adenosine receptors and stimulates mast cell degranulation. J. Clin. Invest. 100:2849–2857.

Johansson B., Halldner L., Dunwiddie T.V. Masino S.A., Poelchen W., Giménez-Llort L., Escorihuela R.M., Fernández-Teruel A., Wiesenfeld-Hallin Z., Xu X.J., Hardemark A., Betsholtz C., Herlenius E., Fredholm B.B. 2001. Hyperalgesia, anxiety, and decreased hypoxic neuroprotection in mice lacking the adenosine A1 receptor. Proc. Natl. Acad. Sci. 98:9407Y12.

Kaneko M., Takahashi T. 2004. Presynaptic mechanism underlying cAMP-dependent synaptic potentiation. J. Neuroscience. 24:5202-5208.

Kang G., Joseph J.W., Chepurny O.G., Monaco M., Wheeler M.B., Bos J.L., Schwede F., Genieser H.G., Holz G.G. 2003. Epac-selective cAMP analog 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP as a stimulus for Ca2+-induced Ca2+ release and exocytosis in pancreatic beta-cells. J. Biol. Chem. 27: 8279-8285.

Khan G.M., Smolders I., Ebinger G., Michotte Y. 2001. 2-Chloro-N6-cyclopentyladenosine-elicited attenuation of evoked glutamate release is not sufficient to give complete protection against pilocarpine-induced seizures in rats. Neuropharmacology. 40:657Y 67.

Kiss J.P., Zsilla G., Vizi E.S. 2004. Inhibitory effect of nitric oxide on dopamine transporters: interneuronal communication without receptors. Neurochem. Int. 45:485-489.

Kivell B.M., Mcdonald F.J., Miller J.H. 2001. Method for serum-free culture of late fetal and early postnatal rat brainstem neurons. Brain Res. Protoc. 6:91-99.

Klaasse E.C., Ijzerman A.P., Grip W.J., Beukers M.W. 2008. Internalization and desensitization of adenosine receptors. Purinergic Signalling. 4:21–37

Ledent C., Vaugeois J.M., Schiffmann S.N., Pedrazzini T., El Yacoubi M., Vanderhaeghen J.J., Costentin J., Heath J.K., Vassart G., Parmentier M.

1997. Aggressiveness, hypoalgesia and high blood pressure in mice lacking the adenosine A_{2A} receptor. Nature. 388:674-678.

Lee F.S. & Chao M.V. 2001. Activation of Trk neurotrophin receptors in the absence of neurotrophins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 98:3555Y60.

Li H. & Henry J.L. 1998. Adenosine A_2 receptor mediation of pre- and postsynaptic excitatory effects of adenosine in rat hippocampus in vitro. Eur. J. Pharmacol. 347:173Y82.

Li X.X., Nomura T., Aihara H., Nishizaki T. 2001. Adenosine enhances glial glutamate efflux via A_{2A} adenosine receptors. Life Sci. 68:1343Y50.

Lin L.H., Emson P.C., Talman W.T. 2000b. Apposition of neuronal elements containing nitric oxide synthase and glutamate in the nucleus tractus solitarii of rat: a confocal microscopic analysis. Neuroscience. 96:341–350.

Lin L.H., Talman W.T. 2001. Colocalization of GluR1 and neuronal nitric oxide synthase in rat nucleus tractus solitarii neurons. Neuroscience.106:801–809.

Lin L.H., Edwards R.H., Fremeau R.T., Fujiyama F., Kaneko T., Talman W.T. 2004. Localization of vesicular glutamate transporters and neuronal nitric oxide synthase in rat nucleus tractus solitarii. Neuroscience. 123:247–255.

Lin L.H., Dragon D.N., Jin J., Tian X., Chu Y., Sigmund C., Talman W.T. 2012. Decreased expression of neuronal nitric oxide synthase in the nucleus tractus solitarii inhibits sympathetically mediated baroreflex responses in rat. Physiol. 590(15): 3545–59.

Liu L. & Stamler J. S. 1999. NO: an inhibitor of cell death. Cell Death Differ. 6(10):937-942.

Lloyd H.G., Fredholm B.B. 1995. Involvement of adenosine deaminase and adenosine kinase in regulating extracellular adenosine concentration in rat hippocampal slices. Neurochem. Int. 26:387–395.

Lopes L.V., Cunha R.A., Ribeiro J.A. 1999. Cross talk between A_1 and A_{2A} adenosine receptors in the hippocampus and cortex of young adult and old rats. J. Neurophysiol. 82:3196-3203.

Lopes L.V., Cunha R.A., Kull B., Fredholm B.B., Ribeiro J.A. 2002. Adenosine A_{2A} receptor facilitation of hippocampal synaptic transmission is dependent on the tonic A_1 receptor inhibition. Neuroscience. 112: 319–29.

Magistretti P.J., Hof P.R., Martin J.L. 1986. Adenosine stimulates glycogenolysis in mouse cerebral cortex: A possible coupling mechanism between neuronal activity and energy metabolism. J. Neuroscience. 6: 2558Y62.

Marder E. 2012. Modulation of neuronal circuits: back to the future. Neuron. 76(1):1-11.

Mayfield R.D., Suzuki F., Zahniser N.R. 1993. Adenosine A_{2A} receptor modulation of electrically evoked endogenous GABA release from slices of rat globus pallidus. J. Neurochem. 60(6):2334-7.

Miki N., Kawabe Y., Kuriyama K. 1977. Activation of cerebral guanylate cyclase by nitric oxide. Biochem. Biophys. Res. Commun. 75: 851-6.

Misko T.P., Schilling R.J., Salvemini D., Moore W., Currie M.G. 1993. A fluorometric assay for the measurement of nitrite in biological samples. Anal Biochem. 214:11-16.

Mochizuki H., Schwartz J.P., Tanaka K., Brady R.O., Reiser J. (1998). High-titer human immunodeficiency virus type 1-based vector systems for gene delivery into nondividing cells. J. Virol. 72(11):8873-83.

Moncada S., Palmer R.M., Higgs E.A. 1991. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. Pharmacol. Reviews. 43(2): 109-42.

Moore KA, Nicoll RA, Schmitz D. Adenosine gates synapticplasticity at hippocampal mossy fiber synapses. Proc Natl Acad SciUSA 2003; 24: 14397Y402.

Ohta A. & Sitkovsky M. 2001. Role of G-protein-coupled adenosine receptors in downregulation of inflammation and protection from tissue damage. Nature. 414:916–920.

Okada M., Nutt D. J., Mrakami T., Zhu G., Kamata A., Kawata Y., Kanenko S. 2001. Adenosine receptor subtypes modulate two major functional pathways for hippocampal serotonin release. J. Neuroscience. 21(2):628–640

Oliveira L., Timoteo M.A., Correia-de-Sá P. 2002. Modulation by adenosine of both muscarinic M1-facilitation and M2-inhibition of [3H]-acetylcholine release from the rat motor nerve terminals. Eur. J. Neuroscience. 15:1728Y36.

Palmer R.M., Ferrige A.G., Moncada S. 1987. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. Nature. 327:524–6.

Palmer T.M., Gettys T.W., Jacobson K.A., Stiles G.L. 1994. Desensitization of the canine A_{2A} adenosine receptor: delineation of multiple processes. Mol. Pharmacol. 45(6):1082-94.

Parpura V., Silva G.A., Tass P.A., Bennet K.E., Meyyappan M., Koehne J., Lee K.H., Andrews R.J. 2012. Neuromodulation: selected approaches and challenges. J. Neurochem. 124(4):436-53.

Peakman M.C. & Hill S.J. 1994. Adenosine A_{2B} receptor-mediated cyclic AMP accumulation in primary rat astrocytes. Br. J. Pharmacol. 111(1):191-8.

Peakman M.C. & Hill S.J. 1995. Adenosine A_1 receptor-mediated changes in basal and histamine-stimulated levels of intracellular calcium in primary rat astrocytes. Br. J. Pharmacol. 115: 801Y10.

Phillis J.W. & Wu P.H. 1981. The role of adenosine and its nucleotides in central synaptic transmission. Prog. Neurobiol. 16:187Y239.

Picano E. & Trivieri M.G. 1999. Pharmacologic stress echocardiography in the assessment of coronary artery disease. Curr. Opin. Cardiol. 14:464–470.

Plochocka-Zulinska D. & Krukoff T.L. 1997. Increased gene expression of neuronal nitric oxide synthase in brain of adult spontaneously hypertensive rats. Brain Res. Mol. Brain Res. 48:291–297.

Proctor W.R. & Dunwiddie T.V. 1987. Pre- and postsynaptic actions of adenosine in the in vitro rat hippocampus. Brain Res. 426:187Y90.

Prystowsky E.N., Niazi I., Curtis A.B., Wilber D.J., Bahnson T., Ellenbogen K., Dhala A., Bloomfield D.M., Gold M., Kadish A., Fogel R.I., Gonzalez M.D., Belardinelli L., Shreeniwas R., Wolff A.A. 2003. Termination of paroxysmal supraventricular tachycardia by tecadenoson (CVT-510): a novel A_1 adenosine receptor agonist. J. Am. Coll. Cardiol. 42:1098–1102.

Quata D., Ferré S., Solinas M., You Z.B., Hockemeyer J., Popoli P., Goldberg S.R. 2004. Opposite modulatory roles for adenosine A_1 and A_{2A} receptors on glutamate and dopamine release in the Shell of the nucleus accumbens. Effects of chronic caffeine exposure. J. Neurochem. 88: 1151-1158.

Queiroz G., Talaia C., Goncalves J. 2003. Adenosine A_{2A} receptor mediated facilitation of noradrenaline release involves protein kinase C activation and attenuation of presynaptic inhibitory receptor-mediated effects in the rat vas deferens. J. Neurochem. 85:740Y8.

Ralevic V. & Burnstock G. 1998. Receptors for purines and pyrimidines. Pharmacol. Rev. 50:413–492.

Ralph G.S., Parham S., Lee S.R., Beard G.L., Craigon M.H., Ward N. 2004. Identification of potential stroke targets by lentiviral vectors mediated overexpression of a HIF-1 and a HIF-2 in a primary neuronal model of hypoxia. J. Cereb. Blood Flow Metab. 24(2):245-58.

Rebola N., Oliveira C.R., Cunha R.A. 2002. Transducing system operated by adenosine A_{2A} receptor to facilitate acetylcholine release in the rat hippocampus. Eur. J. Pharmacol. 452:31-38.

Rebola N., Canas P., Oliveira C.R., Cunha G.M.A. 2005. Different synaptic and subsynaptic localization of adenosine A_{2A} receptors in the hippocampus and striatum of the rat. Neuroscience. 132(4):893-903.

Rebola N., Rodrigues R.J., Lopes L.V., Richardson P.J., Oliveira C.R., Cunha R.A. 2005d. Adenosine A_1 and A_{2A} receptors are co-expressed in pyramidal neurons and co-localized in glutamatergic nerve terminals of the rat hippocampus. Neuroscience. 133:79-83.

Reis D.J. 1984. The brain and hypertension: reflections on 35 years of inquiry into the neurobiology of the circulation. Circulation. 70(suppl III):III-3–III-45.

Rosenberg P.A., Li Y. 1995. Adenylyl cyclase activation underlies intracellular cyclic AMP accumulation, cyclic AMP transport, and extracellular adenosine accumulation evoked by beta-adrenergic receptor stimulation in mixed cultures of neurons and astrocytes derived from rat cerebral cortex. Brain Res. 692:227–32.

Ruggiero D.A., Pickel V.M., Milner T.A., Anwar M., Otake K., Mtui E.P., Park D. 1994. Viscerosensory processing in the nucleus tractus solitarii; structural and neurochemical subtrates. In: Barraco IRA, ed. Nucleos of solitary tract. Boca Raton: CRC Press. p. 3-34.

Sacco R.L., Diener H.C., Yusuf S., Cotton D., Ounpuu S., Lawton W.A., Palesch Y., Martin R.H., Albers G.W., Bath P., Bornstein N., Chan B.P., Chen S.T., Cunha L., Dahlof B., De Keyser J., Donnan G.A., Estol C., Gorelick P., Gu V., Hermansson K., Hilbrich L., Kaste M., Lu C., Machnig T., Pais P., Roberts R., Schmidt, H.H.H.W. & Walter, U. 1994. NO at work. Cell. 78:919-25.

Sapoval L.N. 2004. Oxide Nitric: Involvement in the nervous control of cardiovascular function. Neurophysiology. 36, 466-478.

Sattin A., Rall T.W. 1970. The effect of adenosine and adenine nucleotides on the cyclic adenosine 3', 5'-phosphate content of guinea pig cerebral cortex slices. Mol. Pharmacol. 6(1):13-23.

Saura J., Angulo E., Ejarque A., Casadó V., Tusell J.M., Moratalla R., Chen J.F., Schwarzschild M.A., Lluis C., Franco R., Serratosa J. 2005. Adenosine A_{2A} receptor stimulation potentiates nitric oxide release by activated microglia. J. Neurochemistry. 95:919-929.

Schipke C.G. & Kettenmann H. 2004. Astrocyte responses to neuronal activity. Glia. 47:226-32.

Schubert P., Ogata T., Ferroni S., McRae A., Nakamura Y., Rudolphi K. 1996. Modulation of glial cell signaling by adenosine and pharmacological reinforcement. A neuroprotective strategy? Mol. Chem. Neuropathol. 28:185Y 90.

Schulte G. 2002. Adenosine receptor signaling and the activation of mitogen-activated protein kinase. Repro Print. Stocholm. ISBN 91-7349-299X.

Schulte G. & Fredholm B.B. 2003. Signalling from adenosine receptors to mitogen-activated protein kinases. Cell Signal. 15:813-27

Schwaninger M., Neher M., Viegas E., Schneider A., Spranger M. 1997. Stimulation of interleukin-6 secretion and gene transcription in primary astrocytes by adenosine. J. Neurochem. 69:1145Y50.

Schwaninger M., Petersen N., Prinz S., Sallmann S., Neher M., Spranger M. 2000. Adenosine-induced expression of interleukin-6 in astrocytes through protein kinase A and NF-IL-6. Glia. 31:51Y8.

Scislo J.T. & O'Leary D.S. 2002. Mechanisms mediating regional sympathoactivatory responses to stimulation of NTS A_1 adenosine receptors. Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 283:H1588-H1599.

Scislo T.J., Tan N., O'Leary D.S. 2005. Differential role of nitric oxide in regional sympathetic responses to stimulation of NTS A_{2A} adenosine receptors. Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol. 288:H638–H649.

Sebastião A.M., Ribeiro J.A. 2005. Fine-tuning neuromodulation by adenosine. Trends Pharmacol. Science. 21:341Y6.

Sebastião A.M., Ribeiro J.A. 2009. Tuning and fine-tuning of synapses with adenosine. Curr. Neuropharm. 7:180-194.

Sitkovsky M. & Lukashev D. 2005. Regulation of immune cells by local-tissue oxygen tension: HIF1 alpha and adenosine receptors. Nat. Rev. Immunol. 5:712–721.

Sitkovsky M.V., Lukashev D., Apasov S., Kojima H., Koshiba M., Caldwell C., Ohta A., Thiel M. 2004. Physiological control of immune response and inflammatory tissue damage by hypoxia-inducible factors and adenosine A_{2A} receptors. Annual Rev. Immunol. 22:657–682.

Skvortsova V., Teal P., Toni D., Vandermaelen C., Voigt T., Weber M., Yoon B.W. 2008. Aspirin and extended release dipyridamole versus clopidogrel for recurrent stroke. Engl. J. Med. 359:1238–1251.

Stella L., Berrino L., Filippelli A., Novellis V., Rossi F. 1995. Nitric oxide participates in the hypotensive effect induced by adenosine A_2 subtype receptor stimulation. J. Cardiovasc. Pharmacol. 25:1001-5.

Sterin-Borda L., Gómez R.M., Borda E. 2002. Role of nitric oxide/cyclic GMP im myocardial adenosine A_1 receptor-inotropic response. British J. Pharmacology. 135:444-450.

Syková E. 2004b. Extrasynaptic volume transmission and diffusion parameters of the extracellular space. Neuroscience. 129:861-876.

Syková E. & Vargová L. 2008. Extrasynaptic transmission and the diffusion parameters of the extracellular space. Neurochemistry International. 52:5-13

Tan J.X., Huang X.L., Wang B., Fang X., Huang D.N. 2012. Adenosine receptors agonists mitigated PAH of rats induced by chronic hypoxia through reduction of renin activity/angiotensin II levels and increase of inducible nitric oxide synthase-nitric oxide levels. Zhonghua Er Ke Za Zhi. 50(10):782-7.

Thomas T., St Lambert J.H., Dashwood M.R., Spier K.M. 2000. Localization and action of adenosine A_{2A} receptor in regions of the brainstem important cardiovascular control. Neuroscience. 95(2):513–518.

Thompson S.M., Haas H.L., Gahwiler B.H. 1992. Comparison of the actions of adenosine at pre- and postsynaptic receptors in the rat hippocampus in vitro. J. Physiol. 451:347Y63.

Trono D. 2000. Lentiviral vectors: turning a deadly foe into a therapeutic agent. Gene Ther. 7:20-23.

Van Calker D., Muller M., Hamprecht B. 1979. Adenosine regulates via two different types of receptors, the accumulation of cyclic AMP in cultured brain cells. J. Neurochem. 33:999–1005.

Wittendorp M.C., Boddeke H.W., Biber K. 2004. Adenosine A3 receptorinduced CCL2 synthesis in cultured mouse astrocytes. Glia. 46:410Y8.

Wollmer M.A., Lucius R., Wilms H., Held-Feindt J., Sievers J., Mentlein R. 2001. ATP and adenosine induce ramification of microglia in vitro. J. Neuroimmunol. 115:19Y27.

Xu Y. & Krukoff T.L. 2007. Adrenomedullin stimulates nitric oxide production from primary rat hypothalamic neurons. Mol. Pharmacol. 72:112-120.

Yoo S.B., Lee S., Lee J.Y., Kim B.T., Lee J.H., Jahng J.W. 2012. cAMP/PKA Agonist restores the fasting-induced down-regulation of nNOS expression in the paraventricular nucleus. Korean J. Physiol. Pharmacol. 16: 333-337.

Zanzinger J. 1999. Role of nitric oxide in the neural control of cardiovascular function. Cardiovascular Research. 43:639-649.

Zhang Y., Wang H., Pan H., Bao X., Li M., Jin J., Wu X. 2006. Gene delivery into primary cerebral cortical neurons by lentiviral vector. Cell Biology International. 30:777-783.

Zimmermann H. & Braun N. 1999. Ecto-nucleotidases molecular structures, catalytic properties, and functional roles in the nervous system. Brain Res. 120:371-85.

8. Anexos

Costa M.A., Matsumoto J.P.P., Carrettiero D.C. and Fior-Chadi D.R. 2013. Adenosine A_{2A} receptor modulates the nitrergic system in cell culture from dorsomedial medulla oblongata. Brain Research. Em análise.

Matsumoto J.P.P., Almeida M.A., Castilho-Martins, E.A., **Costa M.A.** and Fior-Chadi D.R. 2013. Protein kinase A mediates adenosine A_{2A} receptor modulation of neurotransmitter release via synapsin I phosphorylation in medulla oblongata cultured cells. Neuroscience Research. Em análise.

Costa M.A., Carrettiero D.C. and Fior-Chadi D.R. 2013. Adenosine modulates nitric oxide levels though activation of adenosine A_1 receptor in cell culture from dorsomedial medulla oblongata. Em preparação.