João Paulo de Pontes Matsumoto

**EFEITO MODULATÓRIO DA NICOTINA SOBRE O
RECEPTOR DE ADENOSINA A_{2a} EM CULTURA DE
CÉLULAS DO BULBO DE RATOS GENETICAMENTE
HIPERTENSOS E NORMOTENSOS.**

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

Orientadora: Profa. Dra. Débora Rejane Fior Chadi

**São Paulo
2008**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS/USP

M434e

Matsumoto, João Paulo de Pontes

Efeito modulatório da nicotina sobre o receptor de adenosina A2a em culturas de células do bulbo de ratos geneticamente hipertensos e normotensos / João Paulo de Pontes Matsumoto. - São Paulo: J.P.P.M., 2008. 98p.: il.

Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Fisiologia, 2008.

1. Receptor de adenosina A2a 2. Nicotina 3-
Hipertensão I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Fisiologia. II Título

LC QC625.A27

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a). Débora Rejane Fior-Chadi
Orientadora

“Timing is everything..”
(James T. Kadonaga)

DEDICATÓRIA

Para minha mãe EDEUZA e minha avó YOSHI, duas pessoas sensacionais, que me deram muito carinho, incentivo, suporte emocional para alcançar meus objetivos. Sem as duas certamente este trabalho não teria acontecido. E ao meu pai PAULO (*in memoriam*). Com todo o meu amor e respeito.

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

A Profa. Débora pela orientação, por ter me acolhido em seu laboratório, por ter acreditado em minha capacidade, pelas oportunidades que me foram dadas, e o incentivo ao qual foi essencial para a realização desse trabalho.

A Merari em especial por ter sido também minha orientadora, me auxiliando experimentalmente e intelectualmente durante a realização desse trabalho, em quem eu me inspiro profissionalmente, e principalmente pela amizade que levarei pelo resto da vida.

Aos meus amigos de laboratório: Andreas, Beatriz, Daniel, Jéssica, Karen, Paulo e Sergio, sem esquecer do Renato, que estiveram muito presentes durante o desenvolvimento deste projeto, seja ajudando nos experimentos e discussões científicas, como também pelas conversas informais que são extremamente necessárias durante os momentos de descontração, e principalmente por manter o nosso ambiente de trabalho sempre em harmonia.

Aos meus colegas, funcionários e professores do departamento aos quais não citarei os nomes, pois são muitos e não gostaria cometer a injustiça de deixar algum de fora, pela contribuição na minha formação como cientista e cidadão.

Especialmente a minha família: minha mãe querida Edeuza, minha vovozinha Yoshi, meus irmãos José e Pedro, as minhas tias Teruko e Nobuko, minha cunhada Aline, minha namorada Roseli e a mais nova integrante minha sobrinha Letícia, aos quais eu agradeço todos os dias por poder fazer parte dessa família tão feliz e harmoniosa.

Muito Obrigado!!

ÍNDICE

ÍNDICE

Abstract	XII
Resumo	XIII
INTRODUÇÃO	1
<i>Sistemas adenosinérgico e colinérgico.</i>	<i>2</i>
<i>Mecanismos envolvidos na regulação da pressão arterial.</i>	<i>7</i>
OBJETIVOS	17
<i>Objetivos Gerais</i>	<i>18</i>
<i>Objetivos Específicos</i>	<i>18</i>
MATERIAL E MÉTODOS.....	20
<i>Animais</i>	<i>21</i>
<i>Cultura de Células</i>	<i>21</i>
<i>Tecido</i>	<i>22</i>
<i>Tratamento</i>	<i>23</i>
<i>Extração e Quantificação de RNA</i>	<i>23</i>
<i>PCR em Tempo Real</i>	<i>25</i>
<i>Extração de Proteína</i>	<i>26</i>
<i>Western Blotting</i>	<i>27</i>
<i>Ensaio de Ligação do Receptor</i>	<i>30</i>
<i>Análise Estatística</i>	<i>31</i>
RESULTADOS.....	32
<i>Análise da Ligação do Receptor de Adenosina A_{2a}</i>	<i>33</i>
<i>Quantificação do receptor de adenosina A_{2a} (proteína) através de Western Blot... ..</i>	<i>38</i>
<i>Avaliação do RNAm do receptor de adenosina A_{2a} por PCR em Tempo Real.</i>	<i>43</i>
DISCUSSÃO	48
<i>Modelo Experimental</i>	<i>49</i>
<i>Perfil basal do rA_{2a} em células do bulbo de ratos SHR e WKY</i>	<i>53</i>
<i>Efeito modulatório da nicotina</i>	<i>56</i>
<i>Efeito modulatório da nicotina sobre o receptor de adenosina A_{2a}</i>	<i>58</i>
CONCLUSÕES	63
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65
APÊNDICE	84

ABSTRACT E RESUMO

Abstract

Hypertension is one of the most common worldwide diseases afflicting humans. Because of the associated with morbidity and mortality and the cost to the society, it became an important public health challenge in Brazil. The mechanisms involved in development of hypertension still remain unclear. However, hypertension can result from neuronal network imbalance in areas of the central nervous system that control blood pressure. The nucleus tractus solitarius (NTS) plays an important role in cardiovascular control. Within the NTS there are several neurotransmitters and neuromodulatory substances, such as adenosine, which acts on purinoreceptors A_{2a} ($A_{2a}R$). The $A_{2a}R$ modulates neurotransmission in the NTS and its activation may induce decrease in blood pressure by different mechanisms. Nicotine is a molecule that crosses the blood-brain barrier and acts in several areas of central nervous system including the NTS. In this nucleus, nicotine is able to interact with some neurotransmitter systems and contributes for the development of hypertension in subjects with genetic predisposition to this disease. The goal of this study was to analyze the modulatory effects of nicotine on $A_{2a}R$ in cultured neurons and glial cells from medulla oblongata of normotensive (WKY) and spontaneously hypertensive rats (SHR). By means of real time PCR, Western Blotting and binding receptor assay. We have demonstrated that in basal condition cells of WKY presents increased binding of $A_{2a}R$ than the cells of SHR. Nicotine treatment induced a decrease in the binding of $A_{2a}R$ in both strains, however, this response was more pronounced in cells of WKY than SHR. Changes in mRNA and protein levels of $A_{2a}R$ was also observed in response to nicotine treatment. The strains and treatment separately, as well as the interaction between them influenced mRNA expression, protein level and binding of $A_{2a}R$ in NTS cells of WKY and SHR rats. Finally, these results show for the first time changes in $A_{2a}R$ mRNA expression, protein level and binding in cells from the medulla oblongata of WKY and SHR rats, as well as, the nicotine modulation upon this system, which might influence cardiovascular control. These data open up new approaches for the study of intracellular mechanisms involved in the modulation of adenosine A_{2a} receptor by nicotine, as well as the importance of this interaction in the development of hypertension.

Resumo

A hipertensão arterial é um problema de saúde pública no Brasil, pois aproximadamente 20 % da população adulta desenvolve hipertensão essencial, cujas causas ainda não são conhecidas. No entanto, sua gênese pode estar relacionada com disfunção nas áreas do sistema nervoso central (SNC) que regulam o sistema cardiovascular. O núcleo do trato solitário (NTS) e o bulbo ventrolateral são áreas importantes no controle neural da pressão arterial. Os receptores de adenosina A_{2a} (rA_{2a}) são encontrados em todo o SNC e estão relacionados com estudos terapêuticos de diversas doenças. No NTS a estimulação dos rA_{2a} provoca ajustes pontuais em outros sistemas de neurotransmissão, além de diminuir a pressão arterial. A nicotina é uma molécula com uma vasta faixa de efeitos modulatórios em nosso organismo. Entre esses efeitos se destacam a capacidade de interagir com diversos sistemas de neurotransmissão nas áreas do bulbo relacionadas com a regulação da pressão arterial e de antecipar e/ou intensificar o desenvolvimento da hipertensão em sujeitos com pré-disposição genética. Desta forma, o objetivo do presente trabalho é avaliar o efeito modulatório da nicotina sobre o rA_{2a} em cultura mista de neurônios e células gliais da porção dorso-medial do bulbo de ratos geneticamente hipertensos (SHR) e normotensos (WKY). Para isso, utilizaram-se técnicas como a de PCR em tempo real, *Western Blotting* e análise de ligação do receptor. Nossos resultados demonstraram que: 1) em condição basal células de ratos normotensos apresentam maior ligação do rA_{2a} do que células de ratos hipertensos; 2) tratamento com nicotina resultou na diminuição da ligação do receptor em ambas as cepas, com um efeito de maior magnitude em células de ratos WKY; 3) nas duas linhagens o tratamento com nicotina alterou os níveis protéicos do rA_{2a} , assim como o RNAm do receptor; 4) a linhagem e o tratamento separadamente, como a interação entre ambos influenciaram na expressão do RNAm, níveis protéicos e ligação do rA_{2a} nas células dos ratos WKY e SHR. Por fim, os resultados apresentados aqui indicam que o rA_{2a} em células de ratos hipertensos tem sua função deprimida em comparação com as células de ratos normotensos; e que a nicotina foi capaz de modular o funcionamento do rA_{2a} , o qual pode influenciar no controle da pressão arterial. Esses dados são bastante interessantes, pois abrem novas perspectivas de análise dos mecanismos intracelulares envolvidos na modulação dos rA_{2a} pela nicotina, assim como a importância desse sistema no desenvolvimento da hipertensão.

INTRODUÇÃO

Introdução

Sistemas adenosinérgico e colinérgico.

Desde que Drury e SzentGyörgyi em 1929 destacaram a influência da adenosina em muitas funções fisiológicas (Drury & SzentGyörgyi, 1999 apud, Burnstock, 2006, p.166), que seu papel vem sendo bastante estudado, inclusive tornando-se alvo de diversas terapias farmacológicas para tratamentos de algumas doenças, como na doença de Parkinson (Xu *et al.*, 2005), desordens imunológicas (Haschemi *et al.*, 2007), isquemia e neuroproteção (Chen *et al.*, 1999; Monopoli *et al.*, 1998). A adenosina é um nucleosídeo formado por uma molécula de adenina ligada a uma molécula de ribose via ligação β -Ng-Glicosídica. Em condições normais, a adenosina é continuamente formada no meio intracelular e extracelular. A produção intracelular é mediada por uma 5'-nucleotidase, a qual desfosforila o AMP (Schubert *et al.*, 1979; Zimmermann *et al.*, 1998), ou por hidrólise da S-adenosil-homocistéina em uma menor proporção (Broch e Ueland, 1980). Uma ecto-5'-nucleotidase é responsável no meio extracelular pelo último passo na cadeia enzimática que catalisa a quebra do ATP em adenosina. Esse processo catalítico não leva mais que algumas centenas de milisegundos e a razão limitante desse passo parece ser a desfosforilação do AMP em adenosina pela ecto-5'-nucleotidase (Dunwiddie *et al.*, 1997).

A adenosina é transportada entre os meios intra e extracelular principalmente via transportadores bi-direcionais através de difusão facilitada que eficientemente equilibra os níveis do nucleosídeo. Essas proteínas transportadoras são chamadas de transportador sensível ao equilíbrio de nucleosídios (ENT1 e ENT2) (Anderson *et al.*, 1996; Baldwin *et al.*, 1999; Williams e Jarvis, 1991). Sabe-se que em resposta ao estresse oxidativo e/ou isquêmico há um grande aumento na concentração de adenosina, podendo esta,

e elevar sua concentração em até 100 vezes (Latini *et al.*, 1999; Rudolphi *et al.*, 1992). Outro fator que está diretamente relacionado com o equilíbrio na concentração de adenosina nos meios intra e extracelular é a enzima adenosina deaminase que converte a adenosina em inosina pela remoção de um grupo amina da molécula (Yegutkin, 2008).

A adenosina age nos receptores purinérgicos do tipo P₁, os quais são divididos em quatro diferentes subtipos A₁, A_{2a}, A_{2b}, A₃. Essa terminologia está bem estabelecida, baseando-se nos princípios da nomenclatura adotada pela NC-IUPHAR (*International Union of Basic and Clinical Pharmacology Committee on Receptor Nomenclature and Drugs Classification*) (Fredholm *et al.*, 2001).

Os quatro subtipos de receptores de adenosina são proteínas com sete domínios transmembrânicos, acoplados à proteína G, do tipo glicoproteínas ligadas a asparagina, exceto o receptor de adenosina A_{2a} (rA_{2a}) que possui sítios para palmitoilação próximo ao terminal carboxila (Armstrong *et al.*, 2001; Linden, 2001). Os receptores A₁ e A₃ são acoplados à proteína G do tipo G_{i/o}, enquanto os receptores A_{2a} e A_{2b} são acoplados à proteína G do tipo G_s.

Os rA_{2a} são encontrados nos diversos sistemas fisiológicos e em seres humanos, seu gene foi localizado no cromossomo 22q11.23 (Deckert *et al.*, 1997; Dubey *et al.*, 1996; Maccollin *et al.*, 1994) e no rato foi localizado no cromossomo 20p12 (LocusLink; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/LocusLink/LocRpt.cgi?l=11541>). No humano o rA_{2a} possui uma sequência de 410 aminoácidos, enquanto que no rato e camundongo são 409 aminoácidos, o que o torna, o maior dos subtipos de receptores de adenosina. Outra característica importante é que ele possui uma longa alça C-terminal intracelular (122 resíduos de aminoácidos no ser humano comparado com 34 resíduos de aminoácidos do rA₁) (Zezula e Freissmuth, 2008).

Os rA_{2a} ativam o complexo da proteína G_s que desencadeia uma cascata de eventos intracelulares, que se inicia pelo aumento da atividade da adenilil ciclase, enzima chave, que converte adenosina trifosfato (ATP) em adenosina monofosfato cíclico (AMPc), o AMPc é classicamente conhecido com um segundo mensageiro intracelular e participa de uma vasta faixa de eventos biológicos. Com o aumento de concentração do AMPc, uma das moléculas que aumenta sua atividade em resposta à esse evento é a proteína quinase dependente de AMPc (PKA). Nos terminais pré-sinápticos a PKA fosforila substratos intracelulares que incluem componentes envolvidos na liberação de neurotransmissores (Chheda *et al.*, 2001; Schwartz, 2001).

Interessantemente, o rA_{2a} é capaz de interagir com outros sistemas de neurotransmissão. Uma interação bem conhecida é a observada com os receptores dopaminérgicos D_2 (rD_2) no núcleo estriado. Neste núcleo, ambos receptores são co-expressos e exercem papéis antagônicos. Essa interação está associada com recentes dados epidemiológicos que relacionam o consumo de cafeína, um antagonista não seletivo do rA_{2a} , com a diminuição no risco de desenvolver doença de Parkinson (Ross *et al.*, 2000; Xu *et al.*, 2005).

Outros estudos associam particularmente os rA_{2a} com o sistema colinérgico, em decorrência de processos relacionados com a indução do comportamento de locomoção associado com o uso de drogas (Celik *et al.*, 2006; Soria *et al.*, 2004; Soria *et al.*, 2006), incluindo a nicotina (Castane *et al.*, 2006).

A nicotina foi isolada pela primeira vez em 1828 por Posselt e Reiman, de folhas do tabaco *Nicotina tabacum*, que servem como matéria prima na fabricação de cigarros e charutos (Ferrari, 2006). Orfila iniciou em 1843 os primeiros estudos farmacológicos sobre este alcalóide que desde então vem sendo extensivamente estudado devido aos

seus efeitos fisiológicos e farmacológicos (Ferrari, 2006; Kane *et al.*, 2004; Pidoplichko *et al.*, 1997; Rezvani *et al.*, 2007; Riah *et al.*, 1998).

Numerosos estudos têm descrito os efeitos da nicotina como: o aumento da frequência cardíaca e da pressão arterial (Armitage, 1965, apud, Maximino, 2006, p.6), contribuição para o desenvolvimento e/ou progressão de doenças cardiovasculares como, por exemplo, arteriosclerose (Auerbach *et al.*, 1965, apud, Maximino, 2006, p.6), doenças cardíacas (Doll e Hill, 1966; Kahn, 1966, apud, Maximino, p.6). No sistema vascular, pequenas doses de nicotina promovem vasoconstrição periférica (Henningfield *et al.*, 1985, apud, Maximino, 2006, p.6). Estes efeitos podem explicar, em parte, o aumento da pressão arterial observado durante o ato de fumar (Benowitz, 1992, apud, Maximino, 2006, p.6).

Esse alcalóide também modula a sinalização intracelular e regula a expressão de genes como o da dopamina (Serova e Sabban, 2002), tirosina hidroxilase (Sun *et al.*, 2004) e neuropeptídeo Y (Li *et al.*, 2000; Matta *et al.*, 1997). Além disso, a nicotina atravessa a barreira hematoencefálica, o que a torna uma substância ativa no sistema nervoso central (SNC).

No SNC, as ações da nicotina podem ser mediadas por dois subtipos de receptores nicotínicos colinérgicos (nAChR, do inglês *nicotinic acetylcholine receptor*): os heteroméricos, formados por conjuntos de duas subunidades alfa ($\alpha_2 - \alpha_6$) e três beta ($\beta_2 - \beta_4$); e os homoméricos formados por cinco subunidades alfa (α_{7-9}) (Dani, 2001b).

Receptores nicotínicos colinérgicos são permeáveis aos íons K^+ , Na^+ e Ca^{2+} . No entanto, os subtipos de receptores nicotínicos neuronais são altamente permeáveis ao Ca^{2+} com uma razão de permeabilidade Ca^{2+}/Na^+ maior que 1 e essa razão sobe para 10 no subtipo de receptor nicotínico α_7 (Mulle *et al.*, 1992a; Mulle *et al.*, 1992b; Seguela *et*

al., 1993). Para fins de comparação, nos nAChr do músculo esquelético a razão de permeabilidade $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^{+}$ é em torno de 0,1 à 0,3 (Vernino *et al.*, 1994).

O aumento na concentração de Ca^{2+} nas células neuronais influencia processos celulares sensíveis ao Ca^{2+} , como por exemplo, ativação de correntes de K^{+} dependente de Ca^{2+} (Sargent, 1993). Em adição, os receptores nicotínicos neuronais localizados nos botões pré-sinápticos estão envolvidos com a liberação de neurotransmissores em decorrência das variações nas concentrações do íon Ca^{2+} nos sítios de liberação de vesículas sinápticas (Broide e Leslie, 1999; Dani, 2001a; Dani, 2001b; Torrao e Britto, 2002). Os nAChr encontrados no soma, dendritos e axônios modulam a excitabilidade local da célula, como também interagem com a liberação de neurotransmissores (Lena *et al.*, 1993; Zarei *et al.*, 1999). Essa variedade de efeitos decorridos em função principalmente das mudanças na concentração de Ca^{2+} , confere aos nAChr neuronais um importante nos mecanismos de plasticidade sináptica.

Entre os diversos sistemas de neurotransmissão modulados pelo sistema colinérgico estão os sistemas dopaminérgico (Pidoplichko *et al.*, 1997; Zhang e Sulzer, 2004; Zhou *et al.*, 2001), gabaérgico (Alkondon *et al.*, 1997; Lena e Changeux, 1997), angiotensinérgico (Ferrari *et al.*, 2007; Ferrari *et al.*, 2008a) e glutamatérgico (Ferrari e Fior-Chadi, 2007; Guo *et al.*, 1998; Sharma e Vijayaraghavan, 2003).

Nosso grupo de pesquisa vem trabalhando com sistemas de neurotransmissão em regiões encefálicas envolvidas no controle neural da pressão arterial. Uma linha bastante estudada em nosso laboratório é a interação da nicotina na gênese da hipertensão arterial neurogênica com enfoque nos sistemas de neurotransmissão modulados por essa droga (Ferrari, 2006; Ferrari e Fior-Chadi, 2007; Ferrari *et al.*, 2007; Maximino, 2006). Muitos dos dados obtidos através desses trabalhos são de grande relevância na literatura, como: a capacidade da nicotina em antecipar o desenvolvimento da

hipertensão em ratos espontaneamente hipertensos, a modulação pela nicotina dos sistemas de neurotransmissão glutamatérgico *in vivo* e angiotensinérgico *in vitro* de ratos. Além de demonstrar a diferença de sensibilidade à nicotina nas linhagens de ratos hipertensos e normotensos (Ferrari e Fior-Chadi, 2007; Ferrari *et al.*, 2007).

Tanto o sistema colinérgico quanto o adenosinérgico são bastante estudados em nosso grupo e estão inseridos em um contexto fisiológico de grande importância, os mecanismos que regulam a pressão arterial.

Mecanismos envolvidos na regulação da pressão arterial.

Desde que Stephen Hales no século XVIII pela primeira vez aferiu diretamente a pressão arterial (PA) (Hales, 1733; apud, Smith, 1993, p.350) e séculos depois desse evento, em 1905, Korotkoff desenvolveu sua técnica indireta de aferição da pressão arterial através de métodos auscultatórios (esfigmomanometria) (Korotkoff, 1905, apud, Arcuri *et al.*, 2007, p.148), estabeleceu-se assim, um dos parâmetros mais importantes para a prevenção de doenças relacionada ao sistema cardiovascular, como a hipertensão, o principal fator de risco para o desenvolvimento de isquemia do miocárdio e acidente vascular encefálico entre outras injúrias.

A pressão arterial é uma variável física expressa em força/unidade de área, que depende do volume sanguíneo contido no leito arterial. Ela compreende a pressão arterial sistólica e pressão arterial diastólica e está condicionada à vários fatores funcionais que a definem momento a momento.

O débito cardíaco (DC) depende da frequência cardíaca, esta é a quantidade de sístoles em um determinado espaço de tempo e do volume sistólico, este último, o volume de sangue ejetado no sistema arterial após uma sístole. O volume sistólico é determinado por dois fatores: a contratilidade cardíaca combinada com a pré-carga e a

resistência periférica. Por sua vez, a pré-carga depende do retorno do sangue para o coração, condicionando-a à vários mecanismos que influenciam esse retorno, como a volemia sanguínea e a complacência venosa.

Os mecanismos que regulam a PA, o fazem através de mudanças instantâneas da contratilidade cardíaca e retorno venoso, tal como o débito cardíaco (frequência cardíaca X volume sistólico) e da resistência periférica (RP), ou por meio de mudanças a longo prazo da volemia. Estes ajustes alteram a quantidade de sangue presente no leito arterial e, num dado instante, determinam o nível momentâneo da PA.

Entre o final do século XVIII e meados do XX alguns fatos fragmentados evidenciavam a existência de um reflexo cardiovascular (Parry, 1799; Waller, 1862, apud, Scher, 1983, p.980). Esse reflexo começou a ser mais bem compreendido quando deCyon e Ludwig em 1866 demonstraram que a estimulação do nervo depressor aórtico no coelho produzia um reflexo depressor na FC e PA (Decyon e Ludwig, 1866, apud Scher, 1983, p.980) e através dos experimentos de Hering, que na época gerou muita controvérsia, pois ele havia observado o mesmo reflexo depressor porém através da estimulação na região do seio carotídeo (Hering, 1927, apud, Scher, 1983, p.980). Finalmente, Heymans, conseguiu juntar esses dois conceitos e um único experimento, estabelecendo assim, o conceito do barorreflexo (Heymans, 1929; Heymans e Neil, 1958, apud, Scher, 1983, p.980).

O barorreflexo age de dois modos. Quando é detectada uma situação de hipotensão e isso evoca uma resposta pressora aumentando o DC e RP via aumento da atividade simpática; e quando há uma situação hipertensora que evocará uma resposta depressora diminuindo o DC e RP via diminuição da atividade simpática e aumento da atividade parassimpática, regulando assim, a PA momento a momento.

O primeiro componente envolvido nesse reflexo são os mecanorreceptores ou barorreceptores, imprescindíveis na detecção dos valores pressóricos gerados pelo fluxo sanguíneo após uma sístole. Localizados na crossa da aorta e no seio carotídeo, as fibras barorreceptoras aórticas (Nervo Depressor Aórtico ou deCyon) caminham junto ao nervo vago, enquanto que as carotídeas (Nervo Sinusal ou de Hering) se incorporam ao nervo glossofaríngeo e levam as informações geradas a cada pulso de pressão para o SNC.

Algumas regiões no SNC já demonstravam ter um papel importante na regulação da pressão arterial, antes mesmo de se conhecer os mecanismos envolvidos no barorreflexo. Um dos primeiros trabalhos foi o de Claude Bernard em 1863, onde ele observara diminuições substanciais na PA em resposta à transecções na medula espinal ao nível cervical (Bernard, 1863, apud, Sved *et al.*, 2002, p.503). Em seguida, Dittmar caracterizou melhor essa resposta através de transecções em regiões do bulbo (Dittmar, 1873, apud, Sved *et al.*, 2002, p.503). Mas foram os trabalhos na década de 70, através de técnicas mais precisas de lesões e/ou microinjeções de algumas drogas em regiões específicas do bulbo, que permitiu o início da caracterização desses núcleos e de suas funções na regulação do sistema cardiovascular (Guertzenstein, 1972; Guertzenstein e Silver, 1974; Miura e Reis, 1972; Nathan e Reis, 1977; Schmitt e Laubie, 1979).

Dentre esses núcleos, o Núcleo do Trato Solitário (NTS) exerce um papel importante, agindo como um centro integrativo para o controle cardiovascular e outras funções autonômicas (Dampney, 1994; Reis e Talman, 1984; Sved, 1994; Talman *et al.*, 1984). Ele recebe as primeiras sinapses viscerossensoriais originadas dos principais reflexos homeostáticos como o cardiovascular, respiratório, gastrointestinal e somático. No NTS ocorre integração de aferências de outras áreas do tronco encefálico incluindo a ponte e substância cinzenta periaquedutal mesencefálica, como também de centros

hipotalâmicos, córtex motor e cerebelo (Bennett *et al.*, 1987; Jordan *et al.*, 1988; Mifflin *et al.*, 1988; Paton *et al.*, 1990; Silva-Carvalho *et al.*, 1995; Spyer, 1994).

Entre essas aferências, está a primeira sinapse oriunda dos barorreceptores, a qual é mediada via liberação de glutamato (Dampney, 1994; Sved, 1994; Talman *et al.*, 1984). Ações do glutamato no NTS podem ser mediadas por receptores metabotrópicos (acoplados a proteína G) e ionotrópicos (associados a canais iônicos). Estes últimos são subdivididos em três categorias de acordo com o agonista exógeno: N – Metil D-Aspartato (NMDA), ácido 2-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxasole-propionico (AMPA) e kainato (KA), todos seletivos para Na⁺ e Ca²⁺ (Kew e Kemp, 2005).

O NTS possui projeções glutamatérgicas para a porção caudal do bulbo ventrolateral (CVL), onde ativa os receptores do tipo NMDA (Gordon, 1987; Sved, 1994). Administração desse aminoácido na CVL produz hipotensão e bradicardia devido à redução da atividade do nervo simpático (Blessing e Reis, 1982; Cravo *et al.*, 1991) e, conseqüentemente, provoca vasodilatação dos leitos vasculares renal, mesentérico e membros inferiores (Willette *et al.*, 1987).

Essa resposta ocorre, pois neurônios GABAérgicos localizados na CVL se projetam para a porção rostral do bulbo ventrolateral (RVL) exercendo uma contínua inibição da atividade dos neurônios barosensitivos da RVL, ao qual ativa diretamente neurônios pré-ganglionares simpáticos (Ito e Sved, 1997; Schreihöfer e Guyenet, 2002; Sved *et al.*, 2000).

Embora muitos neurônios pré-ganglionares simpáticos recebam sinapses da medula espinal, hipotálamo e outras áreas do bulbo (Colombari *et al.*, 2001; Guyenet, 2006; Jansen *et al.*, 1995; Sved *et al.*, 2001), e evidências indicam que essas eferências simpáticas são reguladas primeiramente via RVL (Dampney *et al.*, 2002).

Ativação dos neurônios da RVL causa um aumento na PA em decorrência de aumento da resistência periférica, débito cardíaco e secreção de catecolaminas, principalmente devido ao aumento da estimulação dos nervos simpáticos (Campos Junior e Guertzenstein, 1989; Feldberg e Guertzenstein, 1972).

Por exemplo, no caso de aumento da pressão arterial o NTS, ativado pelo GLU liberado pelas fibras do barorreflexo, irá estimular a CVL que, por sua vez aumentará a liberação de GABA na RVL, resultando em diminuição do tônus da RVL sobre a atividade do sistema nervoso simpático. Concomitantemente, o NTS também irá estimular o núcleo motor dorsal do nervo vago e o núcleo ambíguo aumentando a ativação do sistema nervoso parassimpático. Esses dois eventos irão provocar diminuição na frequência cardíaca e vasodilatação, resultando na diminuição da pressão arterial (Figura 1).

Existem dezenas de neurotransmissores e seus receptores agindo nas regiões que controlam a pressão arterial, sendo a adenosina um deles. A adenosina é encontrada em abundância na maioria dos centros cardiorespiratórios do tronco encefálico, incluindo o NTS (Barraco *et al.*, 1991; Barraco e Phillis, 1991; Burnstock, 2007; Castillo-Melendez *et al.*, 1994; Lawrence e Jarrott, 1996; Scislo e O'leary, 2005).

A adenosina inibe ou facilita a transmissão de outros neurotransmissores via ativação de receptores pré-sinápticos rA_1 ou rA_{2a} , respectivamente (Barraco *et al.*, 1991; Mosqueda-Garcia *et al.*, 1991; Ralevic e Burnstock, 1998). Consequentemente, a ativação dos rA_1 e rA_{2a} frequentemente exerce efeitos opostos na regulação cardiovascular. Por exemplo, estimulação dos rA_1 e rA_{2a} na área subpostremal do NTS evoca respostas pressora e depressora, respectivamente, como demonstrado por Barraco e Phillis (1991).

Figura 1: Representação esquemática do controle neural da pressão arterial pelo barorreflexo. A explicação detalhada da figura encontra-se no texto. **NTS**: núcleo do trato solitário, **CVL**: área ventrolateral do bulbo caudal, **RVL**: área ventrolateral do bulbo rostral, **NA**: núcleo ambíguo, **DMV**: núcleo motor dorsal do nervo vago, **GPV**: gânglio paraventricular, **IML**: coluna intermédia lateral.

A ação hipotensora da adenosina no NTS é mediada via estimulação dos rA_{2a} pré-sinápticos. Estes facilitam a liberação de glutamato das fibras aferentes barorreceptoras e ou através de estimulação de interneurônios envolvidos na transmissão do barorreflexo. Essa estimulação provoca uma diminuição na PAM e na FC, mediada via diminuição na atividade do nervo simpático renal (ANSR) e na atividade do nervo simpático pós-ganglionar adrenal (pós-ANSA) (Barraco *et al.*, 1991; Barraco *et al.*, 1988; Barraco *et al.*, 1996; Barraco e Phillis, 1991; Castillo-Melendez *et al.*, 1994; Mosqueda-Garcia *et al.*, 1991; Tseng *et al.*, 1988).

Além da ação do rA_{2a} no NTS descrita anteriormente, há outros trabalhos relacionados à produção de óxido nítrico (NO, do inglês *nitric oxide*) no NTS com a estimulação dos rA_{2a} , mediando aumento da enzima Óxido Nítrico Síntase (NOS, do inglês *nitric oxide synthase*) (Lo *et al.*, 1998; Lo *et al.*, 1996; Scislo e O'leary, 2006; Scislo *et al.*, 2005).

Os rA_{2a} também podem interagir com receptores de vasopressina V_1 (rV_1) no NTS contribuindo com as respostas hemodinâmicas obtidas devido a sua estimulação, sabendo-se que projeções de fibras vasopressinérgicas do Núcleo Paraventricular do Hipotálamo para o NTS (Van Giersbergen *et al.*, 1992; White *et al.*, 1984; Zakharenko *et al.*, 2001) contendo rA_{2a} poderiam facilitar a liberação tônica de arginina-vasopressina no NTS (Scislo e O'leary, 2006).

As diversas interações entre os sistemas de neurotransmissão encontrados nas regiões que modulam a pressão arterial são de extrema importância na compreensão dos mecanismos envolvidos na manutenção da PA. O aperfeiçoamento de novas abordagens de estudos permitiu agregar novos conhecimentos sobre essas interações.

A utilização de estudos *in vitro* tem demonstrado ser um ótimo modelo, permitindo detalhar o funcionamento de células neuronais e suas interações (Andresen

et al., 2001; Ferrari *et al.*, 2007; Ferrari *et al.*, 2008a; Ferrari *et al.*, 2008c; Kitamura *et al.*, 2008; Kivell *et al.*, 2001; Lewis *et al.*, 2008; Oikawa *et al.*, 2005), além de ser um excelente modelo para o estudo direto da droga na fisiologia das células, possibilitando o estudo detalhado das bases moleculares da ação da droga.

Nosso grupo de pesquisa vem trabalhando com cultura mista de neurônios e células gliais no estudo da neurotransmissão de regiões envolvidas com o controle neural da pressão arterial. Estes trabalhos proporcionaram avanços na compreensão da interação entre alguns sistemas de neurotransmissão e sua relação com a gênese da hipertensão (Ferrari *et al.*, 2007; Ferrari *et al.*, 2008a; Ferrari *et al.*, 2008c). Nossa abordagem é de extrema relevância, visto que disfunções nos sistemas de neurotransmissão em áreas que modulam a PA podem estar envolvidas com a gênese da hipertensão neurogênica.

A hipertensão primária essencial ou neurogênica é responsável por 90% dos casos de hipertensão. Não se conhecem as causas da hipertensão neurogênica, podendo esta ser o resultado da soma de diversos fatores, entre eles problemas nas redes neuronais que modulam a PA (Reis e Talman, 1984). Indivíduos com hipertensão neurogênica possuem altos níveis de catecolaminas plasmáticas e aumento na atividade dos nervos simpáticos, que levam à taquicardia e vasoconstrição. Esses fatores são determinantes para a elevação da PA (Grassi *et al.*, 2006; Guyenet, 2006). Existe também a hipertensão secundária que tem origens bem definidas, como alterações nos vasos sanguíneos, disfunção no sistema renal, hipo e hipertireoidismo e mais raramente por síndromes como a de Cushing (SBH, 2006).

No Brasil estima-se que a hipertensão acomete uma em cada cinco pessoas e na população idosa essa proporção aumenta para uma em cada duas pessoas. É considerada uma pessoa hipertensa, aquela cujos valores de PA aferidos em vários períodos do dia,

seja igual ou acima de 140 mmHg de PA sistólica e 90 mmHg de PA diastólica (SBH, 2006). Diversos fatores aumentam a probabilidade de um indivíduo desenvolver a hipertensão, como a predisposição genética associada à alimentação desbalanceada com alta ingestão de sódio e gorduras, sedentarismo, tabagismo, entre outros.

A hipertensão é um problema de saúde pública, visto que cada vez mais cresce o número de indivíduos com essa doença, desencadeando uma série de problemas socioeconômicos. O estudo dos mecanismos envolvidos na hipertensão dão o respaldo necessário para os programas de prevenção e o desenvolvimento de novos tratamentos terapêuticos para o combate dessa doença.

Como discutido anteriormente, o receptor de adenosina A_{2a} é um importante mecanismo modulatório do sistema glutamatérgico, nitrérgico e vasopressinérgico no NTS. Sua estimulação parece ajustar pontualmente cada um desses sistemas, estabelecendo assim, uma rede de interação importante na regulação da pressão arterial.

A nicotina é um agente farmacológico importante devido ao seu papel modulatório na sinalização intracelular e extracelular, além de interagir com diversos sistemas fisiológicos e de antecipar o desenvolvimento da hipertensão em indivíduos com pré-disposição genética.

Portanto, considerando que: 1) a hipertensão essencial pode ter origem nas áreas envolvidas no controle cardiovascular, 2) a nicotina pode antecipar e/ou intensificar a hipertensão em sujeitos com pré-disposição genética, 3) a nicotina interage com diversos sistemas de neurotransmissão, 4) os efeitos modulatórios do rA_{2a} em outros sistemas de neurotransmissão no NTS e seu papel hipotensor, e ainda, a inexistência na literatura de trabalhos que revelem a real modulação da nicotina no receptor de adenosina A_{2a} em áreas envolvidas com o controle cardiovascular, propõe-se uma análise celular da modulação da nicotina sobre o rA_{2a} , utilizando um modelo *in vitro*, de

cultura mista de neurônios e células gliais da região dorso-medial do bulbo de ratos geneticamente hipertensos e normotensos.

OBJETIVOS

Objetivos Gerais

Avaliar os efeitos modulatórios da nicotina sobre os α_2 em cultura mista de neurônio e células gliais do bulbo dorso-medial de ratos geneticamente hipertensos e normotensos.

Objetivos Específicos

- 1) Avaliar o efeito da nicotina sobre a expressão do RNA mensageiro (RNAm) do α_2 em cultura de células da porção dorso-medial do bulbo de ratos SHR e WKY, através de experimentos de curva dose-resposta e curva temporal, utilizando a técnica de análise quantitativa de RNAm por PCR em tempo real,
- 2) Avaliar o efeito da nicotina sobre a expressão da proteína do α_2 em cultura de células da porção dorso-medial do bulbo de ratos SHR e WKY, através de experimentos de curva dose-resposta e curva temporal, utilizando a técnica de Western Blotting,
- 3) Avaliar o efeito da nicotina sobre a ligação do α_2 em cultura de células da porção dorso-medial do bulbo de ratos SHR e WKY, através de experimentos de curva dose-resposta e curva temporal, utilizando a técnica de Ensaio de Ligação ao Receptor,

- 4) Comparar os efeitos modulatórios da nicotina sobre o rA_{2a} em cultura de células da porção dorso-medial do bulbo de ratos geneticamente hipertensos e normotensos.

MATERIAL E MÉTODOS

Materiais e Métodos

Animais

Todos os procedimentos foram devidamente aprovados pelo Comitê de Ética Animal do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (CEA-IBUSP).

Foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus albinus*) neonatos das linhagens SHR, com predisposição genética à hipertensão e Wistar Kyoto (WKY), normotensos, provenientes do biotério do Departamento de Fisiologia do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.

Cultura de Células

Para a cultura de células, a metodologia empregada foi uma modificação da descrita por Kivell e colaboradores (Kivell *et al.*, 2001). Os encéfalos (n=30, por experimento) foram removidos e a porção do bulbo dorso-medial contendo o núcleo do trato solitário de ratos neonatos foi separada e colocada em placa de petri estéril com solução tampão gelada constituída de NaCl (120mmol/L), KCl (5mmol/L), KH₂PO₄ (1,2mmol/L), MgSO₄·7 H₂O(1,2mmol/L), NaHCO₃ (25mmol/L) e glicose (13mmol/L). O pH do tampão foi ajustado para 7,2 e em seguida filtrado em membrana de 0,2µm de poro (Millipore) dentro de fluxo laminar (Veco) para esterilização.

Ao término da retirada dos encéfalos de todos os ratos, as células do tronco encefálico foram dissociadas através de incubação à 37°C com tripsina e homogeneizadas suavemente em tubo de polipropileno (Falcon) por 15 vezes. Após aproximadamente 5 minutos de espera, para que os pedaços de tecido não dissociados decantem, o sobrenadante contendo as células dissociadas em suspensão foi separado para um novo tubo. Este procedimento foi repetido por aproximadamente 3 vezes para a

extração da grande maioria das células do tecido. Os tubos contendo as células em suspensão foram centrifugados a 300g durante 5 minutos para precipitação das células.

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

Para melhor adesão celular, as placas de cultura (Nunc) foram tratadas com poli-D-lisina (10mg/L, Sigma) durante 40 minutos no dia anterior à cultura, sendo lavada 3 vezes com água destilada estéril seguida de incubação por 2 horas com soro fetal bovino (10%, Gibco) momentos antes do plaqueamento das células.

Após o plaqueamento, o meio de cultura foi trocado a cada 72 horas e mantido na incubadora à 37° C com uma PCO₂ em 5%, para melhor desenvolvimento da célula.

Tecido

A região dorso-medial do bulbo contendo o núcleo do trato solitário de ratos neonatos foi retirada e limpa em PBS a temperatura ambiente. O tecido foi dissociado mecanicamente e as células submetidas ao procedimento de extração de proteína e RNA. Este procedimento permitiu que a análise do nível de proteína e do RNAm do rA_{2a} fosse feita a mesma região do tecido do que foi retirado para a realização do experimento de cultura de células. Este experimento foi realizado no intuito de avaliar a similaridade do padrão de funcionamento basal desses dois parâmetros.

Tratamento

As células foram tratadas com nicotina 9 dias após o plaqueamento. Foram feitos experimentos de curvas dose-resposta e temporal para análise da modulação dos $\alpha_2\alpha$ pela nicotina.

Para o experimento de curva temporal, as células foram incubadas com 10 $\mu\text{mol/L}$ de nicotina (Sigma, EUA) durante 4, 12, 24 e 48 horas, sendo que cada tratamento possui seu respectivo controle sem nicotina. A resposta dose-dependente foi verificada através de incubação das culturas por 24 horas com 1, 10 ou 100 $\mu\text{mol/L}$ de nicotina. A droga foi diluída em meio de cultura que foi aplicado sobre as células.

Após o tempo destinado ao tratamento, as células foram lavadas e instantaneamente submetidas à análise de ligação, proteína, ou RNA mensageiro do $\alpha_2\alpha$ através dos experimentos de Ensaio de Ligação do Receptor, Western Blotting e PCR em Tempo Real.

Extração e Quantificação de RNA

O ambiente de trabalho foi limpo utilizando-se solução descontaminante de RNase (RNase ZAP, Ambion) e também foram utilizados tubos, ponteiros e soluções livres de RNases. Para a extração de RNA, utilizou-se o kit e protocolo provenientes da empresa GE Healthcare (RNAspin Mini, Alemanha). Para obter RNA total em quantidade suficiente para os experimentos de PCR em Tempo Real, seguiu-se as seguintes etapas:

As amostras foram lisadas por um tampão de lise composto por 350 μL de solução de lise RA1 e 3,5 μL de β -mercaptoetanol por placa e/ou tubo, as células foram rompidas pipetando-se vigorosamente para acelerar a lise. O lisado foi transferido para um tubo contendo um Filtro RNAspin Mini (anel roxo) e submetido à centrifugação

(11.000 g por 1min). O filtro foi descartado e o filtrado contendo o RNA foi transferido para um novo tubo livre de RNase onde foi adicionado 350µL de etanol (70%) para o ajuste das condições de ligação do RNA. A solução foi homogeneizada vigorosamente por 2 vezes no vortex, como também foi sugada e expelida com uma pipeta por algumas vezes e após esse procedimento ela foi transferida para um novo tubo contendo uma coluna RNAspin Mini (anel azul) e submetido à centrifugação (8.000g por 30 seg). A coluna foi transferida para um novo tubo, onde foi adicionado 350µL do tampão de dessalinização da membrana (MDB) e centrifugado (11.000g por 1 min). Para livrar o RNA de possíveis contaminações com DNA genômico, o que interfere na análise por PCR em tempo real, adicionou-se uma solução contendo 5µL de DNAI + 90µL de reação tampão de DNase, incubando-se por 15 min à temperatura ambiente. Foram realizadas três lavagens da membrana: a primeira aplicando 200µL de solução RA2 na coluna e centrifugando à 11.000g por 1 minuto; a segunda adicionando 600µL da solução RA3 e centrifugando à 11.000g por 1 minuto e a terceira foi realizada com a adição de 250µL da solução RA3 e centrifugando à 11.000g por 2 minutos. Para eluição do RNA purificado a coluna foi transferida para, um tubo novo, adicionando-se 20 µL de água livre de RNase e submetido, à centrifugação à 11.000g por 1 minuto. A coluna foi descartada, restando assim, o tubo com RNA purificado.

Para acessar a quantidade e qualidade do RNA extraído, primeiramente cada amostra foi diluída a 1:50 em tampão TE e foi submetida a espectrofotômetro para ter a absorbância à UV determinada, revelando assim sua qualidade e concentração. As amostras que revelaram uma razão A260:A280 menor que 1.8 foram descartadas. Após a determinação da concentração de RNA por tubo, uma outra amostra de 8µL contendo 0,5µg de RNA total foi fracionada em gel de agarose 1% contendo brometo de etídio (0,1µg/mL). A proporção entre as frações 28S e 18S deve ser de aproximadamente 2:1

para que o RNA seja considerado de boa qualidade e apropriado para as análises de PCR em tempo real.

PCR em Tempo Real

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

As probes e primers para o RNAm do rA_{2a} (ADORA2a rn00583935_m1) contem FAMTM como repórter fluorescente e são comercialmente disponíveis através da empresa Applied Biosystems. Foi avaliado o RNAm do rA_{2a} da cultura mista de células após tratamento com nicotina e do tecido proveniente da porção dorso-medial do bulbo. Foram utilizados primers e probe para o RNA ribossômico (18S) como controle da

reação, o qual contém o repórter VIC™ e também é comercialmente disponível (Applied Biosystems, EUA). A tabela 1 exemplifica o protocolo que foi utilizado.

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

18S	Volume por reação (25µL)
2x Master Mix	12,5µL
Probe	0,156µL
Primers	0,25µL (reverso e de avanço)
cDNA (diluído 1:100)	5µL
Água DEPC	6,84µL
Demais RNAs	
2x Master Mix	12,5µL
Probe/primers	1,25µL
cDNA (diluído 1:5)	5µL
Água DEPC	6,25µL

As soluções foram colocadas em placa de 96 poços com qualidade óptica (ABI Prism, Applied Biosystems, EUA) que foi lacrada com adesivo também com qualidade óptica (ABI Prism, Applied Biosystems, EUA) e submetida à amplificação e detecção através de PCR em tempo real (modelo 7300, ABI Prism, Applied Biosystems, EUA) por 50 ciclos.

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

Extração de Proteína

Primeiramente, as células foram lavadas com PBS a temperatura ambiente, descoladas das placas, lisadas e homogeneizadas, com auxílio de pipetagem vigorosa,

utilizando-se 250µL de tampão de lise constituído de NP40 (1%), deoxicolato de sódio (0,5%), SDS (1%), EDTA (1mmol/L), EGTA (1mmol/L) e coquetel inibidor de proteases (Sigma, 1%) em PBS. Após o tampão de lise contendo a extração protéica incubou-se por 30 minutos a 4°C e centrifugou-se (14.000 rpm, 4°C por 20 min).

O tecido da porção dorso-medial do bulbo foi lavado com PBS, dissociado mecanicamente e submetido ao mesmo processo de extração de proteína descrito anteriormente.

A quantidade de proteína de cada amostra foi determinada pelo método quantitativo de Bradford (Bradford, 1976). Uma curva padrão foi construída contendo as concentrações de 16, 8, 4, 2, 1 e 0,5µg utilizando a proteína Albumina (1 µg/µL). Uma solução de 40 µL contendo 2µL do extrato protéico de cada amostra e 38µL de água milliQ foi adicionado a 200µL de Bradford (1:5). Através de espectrofotômetro foi possível detectar a concentração de proteínas de cada amostra.

Western Blotting

As amostras foram diluídas em tampão de lise a fim de se obter a quantidade de 30µg em 10µL e adicionando 2,15µL de Tampão de Amostra (1,65µL de SB + 0,5µL de β-mercaptoetanol). As amostras foram desnaturadas à 100°C durante 3 minutos e aplicadas para fracionamento nas canaletas do gel de poliacrilamida a 12% composto por 4,3mL de água milliQ, 3mL de acrilamida (40%), 2,5mL de trisma (1,5M, pH 8,8), 100µL de dodecil sulfato de sódio (10%), 100µL de persulfato de amônio (SDS, 10%) e 4 µL de N,N,N,N-tetrametiletilenodiamina (TEMED). Em um dos pocinhos foram aplicados 4µL de marcador de peso molecular (Kaleidoscope, pré-corado, Bio-Rad, EUA). O tampão de corrida foi preparado com trisma (25mmol/L), glicina (0,2mol/L) e

SDS (0,1%), as proteínas foram separadas através da aplicação de 100 volts durante 1 hora.

Após a corrida, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose (Bio-Rad) utilizando tampão de transferência gelado contendo trisma (25mmol/L), glicina (0,2mol/L) e metanol (10%) durante 1 hora a 100 volts.

A membrana foi então incubada com solução de bloqueio dos sítios não ocupados à temperatura de 4°C por 12 horas. A solução de bloqueio foi à base de leite (5%) e albumina de soro bovino (BSA,1%) em TBS-T (tampão trisma-salina com tween 20 a 0,05%). Após este bloqueio, as membranas foram incubadas com o anticorpo primário anti-rA2a (1:100), comercialmente disponível pela Santa Cruz, EUA, diluídos na mesma solução de bloqueio, durante 24 horas à 4°C sob agitação constante. As membranas foram lavadas em TBS-T por duas vezes de 10 min. O anticorpo secundário (anti-coelho, HRP conjugado, Amershan, EUA) foi diluído 1:2000 na mesma solução do bloqueio, a incubação da membrana com este anticorpo foi feita à temperatura ambiente durante 45 minutos.

Após a incubação com o anticorpo secundário, as membranas foram lavadas por três vezes com TBS-T e uma vez com TBS durante 10 minutos cada. As membranas foram submetidas a incubação com reagente quimioluminescente (Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus, ECL kit, Perkinelmer, EUA) durante exatamente 1 minuto e expostas a filme sensível a quimioluminescência (Hyperfilm ECL, Amersham Biosciences) durante 1 minuto.

Para revelação o filme foi imerso em líquido revelador GBX (KODAK, Brasil) por 5 minutos, lavado em água destilado e imerso em líquido fixador GBX (KODAK, Brasil) por 10 minutos.

Após revelação dos filmes, as membranas foram limpas através de incubação durante 18 minutos a 57°C com solução contendo 2% SDS, 100mmol/L β -mercaptoetanol, em tris-HCl, pH6,8, 62,5mmol/L, sendo lavadas por 2 vezes de 10 minutos com TBS. Depois da limpeza, as membranas foram submetidas a nova marcação com anticorpo contra a alfa-tubulina. Esta proteína estrutural, não se modifica pelo tratamento com nicotina e é utilizado para normalizar os valores protéicos. Para isso, as membranas foram bloqueadas em leite a 5% por 1 hora, incubadas com anticorpo primário (contra alfa-tubulina, Sigma, EUA) diluído a 1:15000 em TBS-T contendo BSA a 1% durante 1 hora em temperatura ambiente seguida de duas lavagens com TBS-T por 10 minutos cada e de incubação, por 45 minutos à temperatura ambiente, com o anticorpo secundário (anti-camundongo, HRP conjugado, Amersham) diluído a 1:3000 em TBS-T com BSA a 1%. Após estas incubações, as membranas foram lavadas com TBS por 2 vezes para dar prosseguimento com a reação e exposição ao filme sensível à quimioluminescência como já descrito.

Os filmes foram quantificados através de densitometria óptica usando um sistema de análise de imagens (Imaging Research Inc., Brock University, Canadá, modelo M4/SK/ALU). A intensidade de luz que atravessa o filme, numa região fora da membrana, foi fixada em 200 unidades densitométricas (arbitrárias), o valor da marcação inespecífica foi tomado de uma região próxima a cada banda correspondente às proteínas de interesse. Desta forma, a marcação específica foi o resultado da subtração do valor inespecífico do valor correspondente à marcação das bandas. Os valores foram corrigidos dividindo-se o valor da densidade das bandas das proteínas de estudo pelo valor da alfa-tubulina.

Ensaio de Ligação do Receptor

Culturas de células foram submetidas à análise de ligação do rA_{2a} após tratamento com nicotina.

Após o tempo de tratamento com nicotina, as células foram lavadas rapidamente em PBS e incubadas à 37°C por 20 minutos em solução contendo 50mM de trisma, 10mM $MgCl_2$ e 2u/ml de adenosina deaminase para eliminação da adenosina do meio extracelular.

Os poços destinados à marcação total foram incubados em solução contendo 50mM de trisma, 10mM de $MgCl_2$ e 30M [carboxietil-3H(N)] CGS 21680 ([3H] CGS - 21680, Perkelmer, EUA), este último um agonista seletivo do rA_{2a} ligado à uma molécula de trício. Para ligação não específica, os demais receptores de adenosina foram bloqueados adicionando-se a essa solução 300mM de adenosina (Sigma, EUA). A solução (250 μ l/poço) foi colocada sobre as células que ficaram incubando à temperatura ambiente por 2 horas, sendo depois lavadas extensivamente com 50mM de trisma e 10mM de $MgCl$ em trisma gelado. As células foram lisadas com NaOH (0,1N, 250 μ l) por 1 hora e a solução transferida para microtubos. Desta solução 200 μ l foram transferidos para tubos contendo líquido de cintilação e foram submetidos à leitura em contador de cintilação (Packard).

A marcação específica dos receptores foi calculada subtraindo-se o valor correspondente à ligação não específica (na presença de adenosina não radioativa) da ligação total. Os resultados foram normalizados pela quantidade de proteína em cada poço da placa. Para isso uma alíquota de 20 μ l de cada amostra experimental foi submetida à análise protéica utilizando-se o método de Bradford. Em cada tubo especial para espectrofotômetro (Cuvette, Fisher, EUA) foram adicionados, proteína (20 μ l), HCl (0,1N, 20 μ l) para neutralizar o NaOH em que as células foram lisadas, água (60 μ l) e

200µl de solução concentrada de Bradford (Protein Assay, Bio-Rad, EUA). A curva de calibração foi realizada utilizando-se albumina (1mg/ml) em concentrações de 0 a 8µg/µl.

Foi realizado inicialmente, o experimento de curva de saturação para determinar a concentração do ligante radioativo utilizado no experimento de ensaio de ligação do receptor de adenosina A_{2a} (concentração próxima ao K_D).

Algumas culturas foram então expostas a concentrações crescentes do ligante radioativo e outros foram incubados com o ligante radioativo juntamente com o ligante frio específico (adenosina) a fim de se obter a ligação não específica. As concentrações foram de 1,5nM a 100nM. Após, as culturas foram submetidas aos mesmos procedimentos descritos anteriormente.

Análise Estatística

Os dados obtidos foram analisados através do teste-t de *Student* ou análise de variância (ANOVA) de duas vias, dependendo do caso, o que será relatado no momento da apresentação de cada resultado. A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa GraphPad Prism, versão 3.00 de 25 de março de 1999, para Windows (GraphPad Software, San Diego, Califórnia EUA). Foram aceitas como variações significativas aquelas em que a diferença entre os grupos resultou em um valor de p menor ou igual a 0,05.

RESULTADOS

Resultados

Análise da Ligação do Receptor de Adenosina A_{2a}

Através de experimentos de saturação para a padronização da técnica quantitativa de ensaio de ligação do receptor de adenosina A_{2a}, foi possível determinar o valor de K_D (em nM) do rA_{2a} (32 ± 3) (Figura 2).

A ligação dos rA_{2a} em cultura mista de células gliais e neurônios foi maior em células de ratos WKY do que em células de ratos SHR.

As culturas de células gliais e neuronais de ratos WKY e SHR apresentaram um padrão de resposta similar ao tratamento com nicotina em ambos os experimentos.

O tratamento com nicotina promoveu diminuição dose dependente na ligação dos receptores A_{2a} em cultura de células de ratos WKY e SHR, com diminuição máxima no tratamento com 100 μM de nicotina (Figura 3 e Tabela 2).

A análise temporal demonstrou que a ligação nos rA_{2a} em células de ratos WKY e SHR diminuiu em todos os tempos de tratamento comparado com seus respectivos controles. Ambas as culturas apresentaram uma diminuição máxima na ligação dos rA_{2a} após tratamento por 12 horas, ao passo que após 24 e 48 horas de tratamento esse efeito foi atenuado (Figura 4 e Tabela 2).

Curva de ensaio de saturação do rA_{2a} – [3H] CGS 21680

Figura 2. Curva de ligação do [3H] CGS 21680 (fmol.mg proteína⁻¹), obtida através de curva de saturação do rA_{2a} em culturas de células gliais e neuronais da porção dorso-medial do bulbo de ratos espontaneamente hipertensos ($K_D=32\pm3$ nM).

Tabela 2. Ligação dos receptores de adenosina A_{2a} em cultura de células gliais e neuronais de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e normotensos (WKY) tratadas com 1, 10 e 100µM de nicotina por 24h (dose-resposta), ou após tratamento com nicotina (10µM) durante 4, 12, 24 e 48h (curva temporal).

Ligação do [³ H] CGS 21680 no rA _{2a}				
Tratamento	WKY		SHR	
	Controle	Nicotina	Controle	Nicotina
1µM	32,91±0,32	19,41±0,40 *	7,08±0,37 †	5,50±0,59 *
10µM	32,91±0,32	8,50±0,42 *	7,08±0,37 †	3,21±0,55 *
100µM	32,91±0,32	4,69±0,24 *	7,08±0,37 †	1,96±0,27 *

Tratamento	WKY		SHR	
	Controle	Nicotina	Controle	Nicotina
4 horas	32,91±0,32	5,47±0,39 *	7,08±0,37 †	4,25±0,46 *
12 horas	32,91±0,32	5,17±0,18 *	7,08±0,37 †	2,42±0,28 *
24 horas	32,91±0,32	8,50±0,42 *	7,08±0,37 †	3,21±0,55 *
48 horas	32,91±0,32	19,33±0,52 *	7,08±0,37 †	4,60±0,63 *

*Os valores estão representados como média aritmética ± EPM. O tratamento e a linhagem separadamente, como também a interação entre ambos influenciam a ligação do receptor $p<0,001$. † $p<0,01$ comparado com cultura WKY controle, * $p<0,001$ comparado com seus respectivos controles, segundo a análise de variância (ANOVA) de duas vias seguidas do pós-teste de Bonferroni.*

Efeito da nicotina na ligação do rA_{2a} (Dose-Resposta)

Figura 3. Ligação dos receptores de adenosina A_{2a} em cultura de células neuronais e gliais da porção dorso-medial do bulbo de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e normotensos (WKY) após tratamento com nicotina (1, 10 e 100µM) durante 24h. Os valores estão representados como média aritmética $\pm$ EPM. *O tratamento e a linhagem separadamente, como também a interação entre ambos influenciam a ligação do receptor* $p < 0,001$. † $p < 0,01$ comparado com cultura WKY controle, * $p < 0,001$ comparado com seus respectivos controles, segundo a análise de variância (ANOVA) de duas vias seguidas do pós-teste de Bonferroni.

Efeito da nicotina na ligação do rA_{2a} (Curva Temporal)

Figura 4. Ligação dos receptores de adenosina A_{2a} em cultura de células neuronais e gliais da porção dorso-medial do bulbo de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e normotensos (WKY) após tratamento com nicotina ($10\mu M$) durante 4, 12, 24 e 48h. Os valores estão representados como média aritmética $\pm$ EPM. *O tratamento e a linhagem separadamente, como também a interação entre ambos influenciam a ligação do receptor* $p < 0,001$. $^{\dagger} p < 0,01$ comparado com cultura WKY controle, $* p < 0,001$ comparado com seus respectivos controles, segundo a análise de variância (ANOVA) de duas vias seguidas do pós-teste de Bonferroni.

Quantificação do receptor de adenosina A_{2a} (proteína) através de Western Blot.

O nível basal do receptor de adenosina A_{2a} foi maior em cultura mista de células gliais e neurônios de ratos SHR do que nas células de ratos WKY (Tabela 3). Observamos o mesmo padrão de diferença nos níveis basais do rA_{2a} nas amostras de tecido da porção dorso-medial do bulbo de ratos neonatos dessas mesmas linhagens (Figura 7 e Tabela 4).

O tratamento com nicotina aumentou os níveis do rA_{2a} em cultura mista de células gliais e neurônios de ratos WKY e SHR tratadas com doses de 1 e 10μM. No entanto, o tratamento com dose de 100μM de nicotina nessas mesmas cepas provocou diminuição dos níveis de receptores de adenosina A_{2a} (Figura 5 e Tabela 3).

No estudo temporal, cada tratamento foi comparado com sua respectiva situação controle e obtivemos os seguintes resultados: em cultura de células gliais e neurônios de ratos WKY e SHR observamos respostas tempo-dependente similares ao tratamento com nicotina. O maior aumento na quantidade dos rA_{2a} foi observado após 4 horas de tratamento com nicotina, seguidos de aumentos de menor magnitude (12 e 24 horas). No entanto, não foi observada mudança significativa na quantidade do rA_{2a} no tratamento com 10μM por 48 horas (Figura 6 e Tabela 3).

Tabela 3. Variação na quantidade dos receptores de adenosina A_{2a} em cultura de células gliais e neuronais da porção dorso-medial do bulbo de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e normotensos (WKY) tratadas com 1, 10 e 100µM de nicotina por 24h (dose-resposta), ou após tratamento com nicotina (10µM) durante 4, 12, 24 e 48h (curva temporal).

Densidade óptica relativa (u.a.)				
Tratamento	WKY		SHR	
	Controle	Nicotina	Controle	Nicotina
1µM	2,54±0,11	2,83±0,05 *	3,54±0,07 †	3,74±0,04 *
10µM	2,54±0,11	3,01±0,10 *	3,54±0,07 †	3,93±0,13 *
100µM	2,54±0,11	2,29±0,05*	3,54±0,07 †	3,03±0,08 *
Tratamento	WKY		SHR	
	Controle	Nicotina	Controle	Nicotina
4 horas	2,89±0,06	5,24±0,05*	3,89±0,07 †	4,57±0,06 *
12 horas	2,94±0,07	4,25±0,05 *	3,85±0,04 †	4,21±0,05 *
24 horas	2,93±0,07	3,60±0,08 *	3,86±0,07 †	4,12±0,07 *
48 horas	2,94±0,06	3,03±0,08	3,85±0,11 †	3,77±0,07

*Os valores estão representados como média aritmética ± EPM. O tratamento e a linhagem separadamente, como também a interação entre ambos influenciam a expressão do RNAm do rA2a $p<0,01$. † $p<0,001$ comparado com seu respectivo WKY controle, * $p<0,01$ comparado com seus respectivos controles, segundo a análise de variância (ANOVA) de duas vias seguidas do pós-teste de Bonferroni.*

Efeito da nicotina nos níveis do rA_{2a} (Dose-Resposta)

Figura 5. Variação da densidade óptica relativa do receptor de adenosina A_{2a} em cultura de células gliais e neuronais da porção dorso-medial do bulbo de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e normotensos (WKY) após tratamento com nicotina (1, 10 e 100 μ M) durante 24 horas. Os valores estão representados como média aritmética $\pm$ EPM. O tratamento e a linhagem separadamente, como também a interação entre ambos influenciam a quantidade do rA_{2a} $p < 0,01$. † $p < 0,01$ comparado com cultura WKY controle, * $p < 0,05$ comparado com seus respectivos controle, segundo a análise de variância (ANOVA) de duas vias seguidas do pós-teste de Bonferroni.

Efeito da nicotina nos níveis do rA_{2a} (Curva Temporal)

Figura 6. Variação da densidade óptica relativa do receptor de adenosina A_{2a} em cultura de células gliais e neuronais da porção dorso-medial do bulbo de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e normotensos (WKY) após tratamento com nicotina ($10\mu M$) durante 4, 12, 24 e 48 horas. Os valores estão representados como média aritmética $\pm$ EPM. O tratamento e a linhagem separadamente, como também a interação entre ambos influenciam a quantidade do rA_{2a} $p < 0,001$. † $p < 0,001$ comparado com cultura WKY controle, * $p < 0,001$ comparado com seus respectivos controles, segundo a análise de variância (ANOVA) de duas vias seguidas do pós-teste de Bonferroni.

Níveis do rA_{2a} na porção dorso-medial do bulbo de neonatos

Figura 7. Variação da densidade óptica relativa do receptor de adenosina A_{2a} no tecido da porção dorso-medial do bulbo de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e normotensos (WKY) com 1 dia de vida. Os valores estão representados como média aritmética ± EPM. * $p < 0,001$ comparado com WKY controle, segundo a análise pelo teste-*t* Student.

Tabela 4. Variação na quantidade do receptor de adenosina A_{2a} da porção dorso-medial do bulbo de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e normotensos (WKY). Os valores estão representados como média aritmética ± EPM.

Densidade óptica (u.a.)	
WKY	SHR
2,3±0,1	3,5±0,2 *

* $p < 0,001$ comparado com WKY controle, segundo a análise pelo teste-*t* Student.

Avaliação do RNAm do receptor de adenosina A_{2a} por PCR em Tempo Real.

A expressão basal do RNAm do receptor de adenosina A_{2a} foi maior em cultura mista de células gliais e neurônios de ratos SHR do que nas células de ratos WKY (Tabela 5). Da mesma forma, a expressão do RNAm do rA_{2a} em amostras do tecido da porção dorso-medial do bulbo de ratos neonatos foi maior em ratos SHR do que em ratos WKY (Figura 10 e Tabela 6).

O tratamento com nicotina promoveu diminuição na expressão do RNAm do rA_{2a} em cultura mista de células gliais e neurônios de ratos WKY na dose de 1μM, 10 e 100μM de nicotina por 24 horas. A maior diminuição na expressão do RNAm do rA_{2a} foi observada no tratamento com a dose de 10 μM de nicotina (Figura 8 e Tabela 5).

Células de ratos SHR apresentaram diminuição na expressão do RNAm do rA_{2a} em todas as doses de nicotina (1, 10 e 100μM), com uma maior diminuição na dose de 10 μM (Figura 8 e Tabela 5).

No estudo temporal em cultura de células gliais e neurônios de ratos WKY observamos uma resposta tempo-dependente bifásica com aumento na expressão do RNAm do rA_{2a} após 4 e 12 horas de tratamento com 10μM de nicotina, enquanto que, após tratamento por 24 e 48 horas com nicotina observamos diminuição na expressão do RNAm do rA_{2a}. O maior aumento na expressão do RNAm do rA_{2a} ocorreu após 4 horas de tratamento com nicotina, enquanto a maior diminuição na expressão se deu no tratamento por 48 horas (Figura 9 e Tabela 5).

As respostas das células dos ratos SHR à nicotina foi diferente a cada tratamento temporal aos quais elas foram submetidas. Após 4, 24 e 48 horas de tratamento com nicotina foi observada uma diminuição na expressão do RNAm do rA_{2a} comparado com seus respectivos controles, sendo que a maior diminuição ocorreu no tratamento de 24 horas quando comparado com os demais tratamentos com esse mesmo padrão de

resposta. Por outro lado, após 12 horas de tratamento com nicotina observamos um aumento na expressão do RNAm do rA_{2a} comparado com seu controle (Figura 9 e Tabela 5).

Tabela 5. Variação na expressão do RNAm do receptor de adenosina A_{2a} em cultura de células gliais e neuronais de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e normotensos (WKY) tratadas com 1, 10 e 100 μ M de nicotina por 24h (dose-resposta), ou após tratamento com nicotina (10 μ M) durante 4, 12, 24 e 48h (curva temporal).

Variação na expressão (vezes)				
Tratamento	WKY		SHR	
	Controle	Nicotina	Controle	Nicotina
1μM	1,00 $\pm$ 0,00	0,89 $\pm$ 0,02 *	1,75 $\pm$ 0,03 [†]	0,86 $\pm$ 0,08 *
10μM	1,00 $\pm$ 0,00	0,59 $\pm$ 0,04 *	1,75 $\pm$ 0,03 [†]	0,68 $\pm$ 0,06 *
100μM	1,00 $\pm$ 0,00	0,85 $\pm$ 0,02 *	1,75 $\pm$ 0,03 [†]	0,74 $\pm$ 0,07 *
Tratamento	WKY		SHR	
	Controle	Nicotina	Controle	Nicotina
4 horas	1,00 $\pm$ 0,00	1,61 $\pm$ 0,05*	2,20 $\pm$ 0,05 [†]	1,89 $\pm$ 0,07 *
12 horas	1,00 $\pm$ 0,00	1,34 $\pm$ 0,03 *	2,14 $\pm$ 0,06 [†]	2,33 $\pm$ 0,05 *
24 horas	1,00 $\pm$ 0,00	0,83 $\pm$ 0,08 *	2,10 $\pm$ 0,03 [†]	1,25 $\pm$ 0,03 *
48 horas	1,00 $\pm$ 0,00	0,67 $\pm$ 0,03 *	2,06 $\pm$ 0,06 [†]	1,82 $\pm$ 0,07 *

*Os valores estão representados como média aritmética $\pm$ EPM. O tratamento e a linhagem separadamente, como também a interação entre ambos influenciam a expressão do RNAm do rA_{2a} $p<0,001$. [†] $p<0,001$ comparado com seu respectivo WKY controle, * $p<0,05$ comparado com seus respectivos controles, segundo a análise de variância (ANOVA) de duas vias seguidas do pós-teste de Bonferroni.*

Efeito da nicotina na expressão do RNAm do rA_{2a} (Dose-Resposta)

Figura 8. Variação na expressão do RNAm do receptor de adenosina A_{2a} em cultura de células gliais e neuronais da porção dorso-medial do bulbo de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e normotensos (WKY) após tratamento com nicotina (1, 10 e 100µM) durante 24 horas. Os valores estão representados como média aritmética $\pm$ EPM. *O tratamento e a linhagem separadamente, como também a interação entre ambos influenciam a expressão do RNAm do rA_{2a} $p < 0,01$. $^{\dagger}p < 0,001$ comparado com cultura proeniente de ratos WKY controle, $*p < 0,001$ comparado com seus respectivos controles, segundo a análise de variância (ANOVA) de duas vias seguidas do pós-teste de Bonferroni.*

Efeito da nicotina na expressão do RNAm do RA_{2a} (Curva Temporal)

Figura 9. Variação na expressão do RNAm do receptor de adenosina A_{2a} em cultura de células gliais e neuronais da porção dorso-medial do bulbo de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e normotensos (WKY) após tratamento com nicotina (10 μ M) durante 4, 12, 24 e 48 horas. Os valores estão representados como média aritmética $\pm$ EPM. *O tratamento e a linhagem separadamente, como também a interação entre ambos influenciam a expressão do RNAm do rA_{2a} $p < 0,001$. [†] $p < 0,001$ comparado com cultura proeniente de ratos WKY controle, ^{*} $p < 0,001$ comparado com seus respectivos controles, segundo a análise de variância (ANOVA) de duas vias seguidas do pós-teste de Bonferroni.*

Expressão do RNAm do rA_{2a} da porção dorso-medial do bulbo

Figura 10. Variação na expressão do RNAm do receptor de adenosina A_{2a} da porção dorso-medial do bulbo de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e normotensos (WKY) de 1 dia de vida. Os valores estão representados como média aritmética $\pm$ EPM.
* $p < 0,001$ comparado com WKY controle, segundo a análise pelo teste-t Student.

Tabela 6. Variação na expressão do RNAm do receptor de adenosina A_{2a} da porção dorso-medial do bulbo de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e normotensos (WKY). Os valores estão representados como média aritmética $\pm$ EPM.

Variação na expressão (vezes)	
WKY	SHR
1,00 $\pm$ 0,01	1,53 $\pm$ 0,05 *

* $p < 0,001$ comparado com WKY controle, segundo a análise pelo teste-t Student.

DISCUSSÃO

Discussão

Modelo Experimental

No Brasil, em 2003, 27,3% dos óbitos foram em decorrência de doenças cardiovasculares. A hipertensão é o principal fator de risco das doenças cardiovasculares, apresentando altos custos médicos e socioeconômicos (SBH, 2006). Atualmente a hipertensão é considerada um problema de saúde pública. A primeira etapa para solucionar esse problema é entender a gênese dessa doença. Nesse aspecto, os estudos sobre os mecanismos envolvidos na gênese da hipertensão arterial possuem um papel fundamental tanto no desenvolvimento de tratamentos terapêuticos quanto na elaboração de novas abordagens preventivas.

Os animais são utilizados pelo homem à séculos para compreensão da sua própria fisiologia. Contudo o uso do modelo animal deve estar devidamente fundamentado em princípios éticos e em sua relevância nos avanços gerados através de sua utilização. A utilização de ratos como modelo animal já demonstrou ser bastante eficaz no estudo da hipertensão (Akemi Sato *et al.*, 2001; Akine *et al.*, 2003; Alvarez *et al.*, 2008; Carrettiero e Fior-Chadi, 2008; Ferrari *et al.*, 2007).

A linhagem mais comum usada nesses estudos é a do Rato Espontaneamente Hipertenso (SHR, do inglês *spontaneously hypertensive rat*). Os ratos SHR descendem dos cruzamentos de ratos machos da linhagem Wistar da colônia da cidade de Kyoto no Japão, que desenvolveram espontaneamente hipertensão com ratas fêmeas dessa mesma colônia com a PA elevada. A seleção dessa hipertensão espontânea foi mantida através de cruzamentos da prole (irmão x irmã) e reproduzida em larga escala em 1968 nos Estado Unidos da América (EUA). Os ratos SHR nascem normotensos, com uma pressão arterial média (PAM) entre 100 e 120 mmHg e permanecem nesta condição até

8 semanas de idade quando começam a apresentar elevação da PA para valores iguais ou maiores que 150 mmHg de PAM, mantendo esta condição pelo o resto de sua vida. Mais tarde em 1971 o rato Wistar Kyoto (WKY) foi estabelecido pela *National Institutes of Health* (EUA) como a linhagem de ratos normotensos controle para os ratos SHR. Esse critério foi adotado baseando-se no fato de que os ratos SHR foram isolados da colônia de ratos Wistar da Universidade de Kyoto (Doggrell e Brown, 1998).

Recentemente nosso grupo de pesquisa descreveu pela primeira vez o perfil da expressão gênica de células do bulbo de ratos SHR e WKY. O estudo identificou diferença na expressão gênica em 376 genes entre as linhagens, incluindo genes relacionados com a hipertensão (Ferrari *et al.*, 2008b). Outros estudos também investigaram as diferenças na expressão gênica entre os ratos SHR e WKY, aplicando esses conhecimentos na compreensão dos mecanismos envolvidos na hipertensão arterial (Grayson *et al.*, 2007; Rysa *et al.*, 2005).

Outro fato interessante no estudo da diferença entre os ratos SHR e WKY é que o funcionamento de algumas regiões do bulbo está alterado em ratos SHR em relação a ratos normotensos WKY e Sprague-Dawley (Akemi Sato *et al.*, 2000; Akemi Sato *et al.*, 2001). Além disso, os ratos SHR possuem uma sensibilidade diferente à drogas como a nicotina, quando comparado com os ratos WKY (Ferrari e Fior-Chadi, 2007; Ferrari *et al.*, 2007; Ferrari *et al.*, 2008a), indicando importantes diferenças genótípicas e fenótípicas entre essas duas linhagens.

Esses trabalhos destacam a importância de se estudar essas duas cepas no intuito de entender melhor os mecanismos que diferenciam essas duas linhagens aplicando esses conhecimentos na compreensão dos mecanismos envolvidos na gênese da hipertensão nos ratos SHR. O modelo de hipertensão do rato SHR possui características similares à hipertensão no ser humano, portanto, conhecer melhor os mecanismos

envolvidos com a hipertensão desses ratos tornou-se um excelente modelo para compreendermos os mecanismos envolvidos na hipertensão humana.

Ainda não estão bem esclarecidas as causas da hipertensão neurogênica. No entanto, muitos autores postulam que a hipertensão pode ser o resultado do desequilíbrio nos núcleos encefálicos envolvidos com o controle do sistema cardiovascular (Cravo *et al.*, 1991; Guyenet, 2006; Reis e Talman, 1984).

Um dos focos do estudo da gênese da hipertensão é o Núcleo do Trato Solitário, pois ele ocupa um papel de destaque entre os núcleos encefálicos envolvidos com o controle do sistema cardiovascular. Principalmente, por integrar as aferências viscerossensoriais como, por exemplo, a dos barorreceptores, dos quimiorreceptores, dos termorreceptores musculares esqueléticos, hipotalâmicas e corticais entre outras (Bennett *et al.*, 1987; Dampney, 1994; Jordan *et al.*, 1988; Mifflin *et al.*, 1988; Paton *et al.*, 1990; Silva-Carvalho *et al.*, 1995; Spyer, 1994). O NTS coordena os ajustes necessários para manter a pressão em valores estáveis, como também, promove o remodelamento do sistema cardiovascular adequando-o a cada situação como, por exemplo, durante o exercício. Esses ajustes são realizados via modulação de outros núcleos contidos no bulbo como, por exemplo, a CVL, a RVL, o núcleo ambíguo e o núcleo motor dorsal do vago (Colombari *et al.*, 2001; Dampney, 1994; Sved *et al.*, 2001; Sved, 1994).

O NTS possui uma densa população de neurônios especializados e uma variedade de moléculas que agem como neurotransmissores ou neuromoduladores. Entre essas moléculas a adenosina ocupa um papel de destaque no NTS agindo nos receptores de adenosina do tipo A₁ e A_{2a}.

O receptor de adenosina A_{2a} tornou-se foco de muitos estudos devido ao seu grande espectro de efeitos fisiológicos (Armstrong *et al.*, 2001; Castillo-Melendez *et al.*, 1994; Celik *et al.*, 2006; Dubey *et al.*, 1996; Haschemi *et al.*, 2007; Monopoli *et al.*,

1998; Rudolphi *et al.*, 1992; Soria *et al.*, 2004; Soria *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2005). A cada ano que passa vão surgindo novas descobertas sobre as ações do rA_{2a} , possibilitando avanços no desenvolvimento de novos tratamentos terapêuticos para algumas doenças (Jacobson e Gao, 2006).

O receptor de adenosina A_{2a} é muito importante no controle cardiovascular. No NTS o rA_{2a} quando estimulado provoca diminuição na pressão arterial. Esse efeito é mediado principalmente via estimulação dos rA_{2a} pré-sinápticos das fibras aferentes vagais e/ou de interneurônios intrínsecos do NTS envolvidos na transmissão glutamatérgica do barorreflexo (Barraco *et al.*, 1996; Barraco e Phillis, 1991; Castillo-Melendez *et al.*, 1994). Há também evidências que demonstram a interação dos rA_{2a} com o sistema vasopressinérgico (Scislo e O'leary, 2006) e nitrérgico (Lo *et al.*, 1998; Scislo *et al.*, 2005) no NTS. A vasta faixa de interações do rA_{2a} no NTS, além de sua ação hipotensora, foram os principais fatores que contribuíram para sua escolha no presente estudo.

Considerando o grande espectro de efeitos da nicotina intra e extracelular (Dani, 2001a; Dani, 2001b; Hogg *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2000; Serova e Sabban, 2002), além do fato dessa molécula ser capaz de antecipar a hipertensão em ratos SHR e modular o funcionamento de sistemas de neurotransmissão, como por exemplo, o glutamatérgico e angiotensinérgico (Ferrari e Fior-Chadi, 2007; Ferrari *et al.*, 2007; Ferrari *et al.*, 2008a), credenciou essa molécula como agente farmacológico a ser utilizado nesse estudo.

Os estudos *in vitro* são fundamentais para determinar o efeito direto de drogas na fisiologia das células, possibilitando o estudo detalhado das bases moleculares da ação da droga. Além de ser um excelente modelo no estudo do funcionamento intracelular. A co-cultura de neurônios e células gliais da porção dorso-medial do bulbo contendo as células do NTS possibilitou analisar diretamente a ação da nicotina sobre o rA_{2a} de

células importantes no controle cardiovascular, como também permitiu comparar o padrão de resposta observado entre as cepas hipertensa e normotensa.

Perfil basal do rA_{2a} em células do bulbo de ratos SHR e WKY

Atualmente, sabe-se que o receptor de adenosina A_{2a} ocupa um papel de destaque em nosso organismo. O rA_{2a} está envolvido na isquemia cerebral e cardíaca, distúrbios do sono, no sistema imunológico e inflamatório, câncer, além de ser o alvo da cafeína, a droga mais consumida no mundo (Jacobson e Gao, 2006). Sua grande faixa de efeitos fisiológicos o credencia como um excelente alvo de intervenções terapêuticas.

Uma característica importante é a variedade de eventos intracelulares que a estimulação do A_{2a} produz. O rA_{2a} é um receptor acoplado a proteína G do tipo s que eleva a concentração do AMPc intracelular, que por sua vez aumenta a atividade de diversas proteínas como, por exemplo, a proteína quinase ativadora mitogênica (MAPK, do inglês, *mitogen activated protein kinase*), proteína quinase dependente de AMPc e quinase regulatória de sinalização extracelular (ERK, do inglês, *extracellular regulated kinases*) entre outras. Essas proteínas são responsáveis pelos efeitos do rA_{2a} nas diversas células aos quais esse receptor é encontrado (Fredholm *et al.*, 2001).

Alguns estudos relacionam a interação entre o receptor A_{2a} e o receptor dopaminérgico D_2 no núcleo estriado com o efeito de desaceleração da neurodegeneração das células dopaminérgicas em pacientes com doença de Parkinson, pois o consumo de cafeína, um antagonista do rA_{2a} , produz esse efeito benéfico, além de diminuir o risco de desenvolvimento dessa doença (Ascherio *et al.*, 2001; Ross *et al.*, 2000; Xu *et al.*, 2005).

Existem também evidências que o rA_{2a} media proteção celular em tecidos periféricos (Linden, 2005). Um exemplo reportado é o de que rA_{2a} nas células derivadas

da medula óssea são responsáveis pela proteção contra isquemia nos rins (Day *et al.*, 2003).

No sistema cardiovascular a adenosina agindo sobre o rA_{2a} é um potente agente vasodilatador da aorta, das artérias coronárias (Fredholm *et al.*, 2001) e dos vasos sanguíneos (Tabrizchi e Bedi, 2001).

Interessantemente, nas artérias renais o receptor de adenosina A_{2a} está associado com a síntese de ácidos epoxieicosatrienoico (EETs, do inglês, *epoxyeicosatrienoic acid*) causando vasodilatação. O sistema rA_{2a} /EETs aumenta em resposta à ingestão de uma dieta rica em sal em ratos Sprague Dawley (normotenso) (Liclican *et al.*, 2005). No entanto, em ratos hipertenso Dahl sensível ao sal, um modelo genético de hipertensão, não foi observado esse padrão de efeito, ou seja, o rA_{2a} já demonstra trabalhar diferentemente em ratos normotensos e hipertensos, podendo influenciar no desenvolvimento da hipertensão na linhagem de rato com genótipo hipertensivo (Liclican *et al.*, 2008).

Como discutido extensamente, no NTS a ativação do receptor de adenosina A_{2a} diminui a pressão arterial, através da modulação dos sistemas glutamatérgico, nitrérgico e vasopressinérgico. A ativação dessas vias de sinalização produz diminuição da atividade simpática, principalmente na glândula adrenal e nos rins causando vasodilatação (Barraco *et al.*, 1991; Castillo-Melendez *et al.*, 1994; Scislo e O'leary, 2005; Scislo e O'leary, 2006; Scislo *et al.*, 2005).

Sabendo que a hipertensão produz aumento da atividade simpática (Grassi *et al.*, 2006; Guyenet, 2006) e que a ativação do rA_{2a} no NTS produz efeitos antagônicos a essa situação, ou seja, diminuindo a atividade simpática, logo, é importante avaliar o funcionamento do rA_{2a} no NTS para entender a sua influência no desenvolvimento da hipertensão.

Os resultados do presente trabalho demonstraram que as células da porção dorso-medial do bulbo de ratos neonatos SHR apresentam maior expressão gênica e protéica do receptor de adenosina A_{2a} , quando comparados com as células de ratos WKY. O mesmo padrão ocorre no tecido da porção dorso-medial do bulbo contendo células do NTS dessas duas linhagens, demonstrando a viabilidade do estudo em cultura. No entanto, as células de ratos WKY apresentaram uma maior ligação do receptor ao agonista CGS 21680 do que as células dos ratos SHR.

O maior nível de expressão do RNAm e protéica do rA_{2a} observado nas células de ratos SHR pode ser uma resposta compensatória em função do baixo nível de ligação do rA_{2a} nessa célula.

Interessantemente, esse mecanismo também pode ser observado nos receptores de insulina de mamíferos. Baixa atividade dos receptores de insulina aumenta a expressão do RNAm e a quantidade dos receptores de insulina (Puig e Tjian, 2005).

O padrão oposto foi encontrado nas células de ratos WKY: altos níveis de ligação do receptor, baixos níveis de expressão do RNAm e protéico do rA_{2a} . Também é observado nesse mesmo estudo, mecanismos de retroalimentação negativa na expressão do RNAm e na síntese protéica em resposta aos altos níveis da ligação do receptor de insulina (Puig e Tjian, 2005).

Considerando que a ativação dos rA_{2a} no NTS provoca diminuição da atividade simpática, diminuindo a pressão arterial, os resultados obtidos nos experimentos de ensaio de ligação do receptor A_{2a} corroboram o fato de que um sistema hipotensivo, está com seu funcionamento diminuído em células de ratos hipertensos quando comparados a células de ratos normotensos, possivelmente sendo um fator que favorece o aparecimento da hipertensão em ratos geneticamente hipertensos.

Efeito modulatório da nicotina

Há muitos anos é sabido que a nicotina atravessa a barreira hematoencefálica sendo assim, capaz de interagir com células do sistema nervoso central (Izquierdo e Izquierdo, 1971; Riah *et al.*, 1998). Esse fato é bastante explorado no estudo dos efeitos da nicotina sobre os diversos sistemas de neurotransmissão e sua influência em algumas doenças (Ferrari e Fior-Chadi, 2007; Ferrari *et al.*, 2007; Ferrari *et al.*, 2008a; Gueorguiev *et al.*, 1999; Inoue *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2000; Matta *et al.*, 1997).

A nicotina age sobre os receptores colinérgicos nicotínicos, no SNC são encontrados principalmente os receptores nicotínicos do tipo $\alpha 7$ e $\alpha 4\beta 2$ (Dani e Bertrand, 2007). No entanto, outros trabalhos sugerem que o nAChR do tipo $\alpha 3\beta 4$ também é igualmente encontrado no SNC (Dhar *et al.*, 2000; Fenster *et al.*, 1997; Mulle *et al.*, 1991; Takeda *et al.*, 2003).

Apesar dos receptores colinérgicos nicotínicos serem canais iônicos seletivos ao Na^+ , eles são também altamente permeáveis ao Ca^{2+} (Broide e Leslie, 1999; Dani, 2001a; Hogg *et al.*, 2003; Mulle *et al.*, 1992a). O Ca^{2+} intracelular é responsável por desencadear uma série de eventos intracelulares, entre eles, modular fatores de transcrição gênica. Um mecanismo bem conhecido é a via da ativação do complexo Ca^{2+} /Calmodulina, que por sua vez ativa as proteínas quinase dependente de Ca^{2+} /Calmodulina II e IV (CaMK, II e IV; do inglês *Ca^{2+} /Calmodulin-dependent kinase*). Estas duas proteínas exercem papéis antagônicos sobre o elemento de ligação à proteínas responsivas ao AMPc (CREB, do inglês *cAMP-response-element-binding-protein*), um conhecido fator de transcrição gênica. A CaMK IV aumenta a transcrição gênica pelo CREB, enquanto a CaMKII reduz a transcrição (Carlezon *et al.*, 2005).

Esses mecanismos corroboram com os dados encontrados em alguns trabalhos, onde a nicotina foi capaz de modular a expressão de RNAm de alguns genes (Ferrari *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2000; Matta *et al.*, 1997; Serova e Sabban, 2002; Sun *et al.*, 2004).

A nicotina também é capaz de aumentar os níveis protéicos de receptores. Como observado com os receptores AMPA, NMDA e receptores metabotrópicos glutamatérgicos (Dajas-Bailador e Wonnacott, 2004; Ferrari *et al.*, 2002; Kane *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2007). Esse aumento ocorre devido a inibição da degradação protéica do proteossoma pela nicotina, que provoca um aumento de proteína ubiquitinadas. O processo de degradação pelo sistema ubiquitina-proteossoma (UPS, do inglês *system-proteasome-ubiquitin*) é resultado do equilíbrio de atividade das enzimas de ubiquitinação e deubiquitinação, eventualmente proteínas ubiquitinadas não degradadas são “recicladas” via deubiquitinação e poupadas da degradação (Mimnaugh *et al.*, 1999; Wu *et al.*, 2004).

A diminuição da degradação protéica é atribuída preferencialmente à diminuição da atividade catalítica dos componentes do proteossoma, pois a exposição à nicotina desencadeia mecanismos compensatórios que aumentam a expressão do RNAm de alguns componentes do UPS (Kane *et al.*, 2004), além de aumentar os níveis de proteína de alguns componentes do proteossoma (Rezvani *et al.*, 2007). Isso indica que a regulação desses componentes foi devido à diminuição da atividade catalítica do proteossoma.

O tratamento crônico com nicotina demonstrou ser capaz de aumentar a ligação do receptor nicotínico $\alpha 4\beta 2$, esse processo ocorreu devido a modificações na conformação do próprio receptor alterando seu estado na membrana de repouso para ativado, ou seja, aumentando a afinidade do seu próprio receptor (Vallejo *et al.*, 2005). Outros receptores também apresentaram mudanças em sua ligação em resposta ao

tratamento com nicotina como, por exemplo, NMDA, AMPA e Kainato *in vivo* onde foi observado diminuição na ligação (Ferrari e Fior-Chadi, 2007) e o receptor de angiotensina AT₁ *in vitro* cuja a ligação foi aumentada (Ferrari *et al.*, 2007). No entanto, os mecanismos envolvidos na interação entre os receptores de nicotina e esses receptores de outros sistemas de neurotransmissão ainda permanecem desconhecidos.

Efeito modulatório da nicotina sobre o receptor de adenosina A_{2a}

A ligação do receptor é o principal parâmetro utilizado para avaliar o funcionamento fisiológico do receptor. Os resultados observados no ensaio de ligação foram de extrema relevância na análise dos efeitos diretos da nicotina sobre o sistema purinérgico.

O tratamento com nicotina diminuiu a ligação do receptor A_{2a} em ambas as cepas, no entanto, houve maior diminuição nas células de ratos WKY indicando que há diferença de sensibilidade à nicotina entre os ratos normotensos e hipertensos.

Na presença de nicotina a ligação do rA_{2a} das células de WKY diminuiu aos níveis encontrados nas células de SHR em estado basal. Nesse caso, a nicotina parece afetar mais o funcionamento do rA_{2a} em células de ratos normotensos, fazendo com que esses níveis de ligação do rA_{2a} se equiparem à valores encontrados em células de ratos hipertensos.

Conforme observado, houve maior diminuição de ligação do rA_{2a} em resposta ao tratamento com nicotina no período de 12 horas. Essa resposta pode estar relacionada com os resultados que Vallejo e colaboradores acharam em seus estudos (Vallejo *et al.*, 2005). Nesse trabalho foi observado que tratamento crônico com nicotina em células embrionárias de rim humano (HEK, do inglês, *human embryonic kidney cell*) alterou o estado do próprio receptor nicotínico na membrana, mudando seu estado de repouso

para ativado. O receptor nesse estado está mais funcional, ou seja, há um aumento na afinidade do receptor e conseqüentemente um maior efeito da nicotina nessa célula. Interessantemente, esse efeito ocorreu entre 10 e 12 horas de tratamento com nicotina, justamente no mesmo período de tratamento onde observamos a maior diminuição da ligação do rA_{2a} em resposta à nicotina.

No entanto, dependendo da exposição à nicotina há uma inversão na conformação do receptor diminuindo a afinidade dos receptores nicotínicos e o próprio efeito da nicotina na célula (Vallejo *et al.*, 2005). Concordando com nossos resultados observados no tratamento com nicotina por 24 e 48 horas. Onde houve atenuação no efeito da nicotina sobre a ligação do rA_{2a} .

Os mecanismos envolvidos nessa modulação ainda permanecem desconhecidos. Uma possibilidade é que possam ocorrer interações diretas entre os receptores, uma vez que os receptores colinérgicos nicotínicos (Shihara *et al.*, 1999; Smith e Uteshev, 2008; Ueno *et al.*, 1993) e os receptores de adenosina A_{2a} (Barraco *et al.*, 1991; Mosqueda-Garcia *et al.*, 1991; Ralevic e Burnstock, 1998) são encontrados em abundância nas subpopulações de neurônios do NTS. Outro fato que colabora com essa hipótese é que tanto o rA_{2a} (Castillo-Melendez *et al.*, 1994) como alguns dos AChR (Smith e Uteshev, 2008) estão localizados nos botões terminais pré-sinápticos no NTS aumentando a possibilidade de co-localização e interação direta de ambos os receptores.

Interessantemente, a capacidade de interação direta entre o rA_{2a} e outros receptores já foi observada em outras regiões do SNC. Um exemplo bem conhecido é interação do rA_{2a} com o receptor dopaminérgico D_2 na sinalização gabaérgica das porções dorsal e ventral do estriado-palidal, onde a ativação do rA_{2a} reduz o acoplamento e a atividade dos rD_2 . Como resultado da inibição da atividade do rD_2 há um aumento na atividade nos neurônios gabaérgicos, responsáveis pela via indireta da

modulação motora pelos gânglios basais, reduzindo assim, as funções motoras. Na doença de Parkinson, a atividade do rD_2 está reduzida, consequentemente antagonistas do rA_{2a} são utilizados como agentes terapêuticos para aumentar a atividade dos rD_2 e atenuar os sintomas da doença (Fuxe *et al*, 2006).

Como discutido anteriormente, o aumento nos níveis de proteína do rA_{2a} em resposta ao tratamento com nicotina observado em ambas as cepas, pode ser devido à ação direta e indireta da nicotina: direta, pois o tratamento com nicotina diminui a atividade catalítica do proteossoma afetando a degradação do receptor (Rezvani *et al.*, 2007) e indireta já que a diminuição da ligação do rA_{2a} em resposta à nicotina aciona mecanismos compensatórios que aumentam a quantidade do receptor por meio de diminuição da degradação e/ou por aumento de síntese protéica.

Os dados também mostraram que a nicotina alterou os níveis do RNAm do rA_{2a} nas células de ambas as cepas. Os resultados observados em células de WKY parecem acompanhar o padrão de resposta compensatória esperado com a ação da nicotina na ligação do rA_{2a} e nos níveis de proteína do receptor. Isto é, houve um aumento nos níveis do RNAm juntamente com o aumento nos níveis protéicos em resposta à diminuição da ligação do rA_{2a} . No entanto, no tratamento com nicotina por 24 e 48 horas observamos uma diminuição nos níveis de RNAm de rA_{2a} , sugerindo que nesse momento o sistema estaria tentando se restabelecer e voltar nos níveis normais.

As células de ratos SHR apresentaram um padrão diferente nos níveis do RNAm do rA_{2a} em resposta ao tratamento com nicotina. Possivelmente, diferentes mecanismos regulatórios dos níveis do RNAm podem ter sido acionados em resposta ao tratamento com nicotina nessa cepa.

Os parâmetros avaliados demonstraram que o tratamento com 10 μ M de nicotina produziu efeitos maiores que o tratamento com 100 μ M. Isso pode ser explicado, devido

a saturação do receptor nicotínico na presença de altas concentrações da droga que provoca dessensibilização do receptor, diminuindo o efeito da nicotina na célula (Fenster *et al.*, 1999a; Fenster *et al.*, 1999b).

Vale a pena ressaltar que o tratamento com nicotina promoveu padrões de respostas similares em ambas as cepas, muito embora, as células de ratos normotensos demonstraram maior sensibilidade à droga. Talvez isso tenha acontecido devido ao fato do sistema da adenosina, relacionado ao rA_{2a} , já esteja bastante diminuído no rato SHR, dificultando uma regulação adicional nesta cepa.

Em conclusão, os resultados apresentados no presente estudo demonstraram que a nicotina modula o funcionamento do receptor de adenosina A_{2a} em células do NTS de ratos normotensos e hipertensos.

O tratamento com nicotina diminuiu a ligação do rA_{2a} em células do NTS em ambas as linhagens de ratos. Esse efeito promoveu respostas modulatórias compensatórias em mecanismos intracelulares como o níveis de proteína e expressão do RNAm do rA_{2a} .

Além disso, os dados aqui apresentados demonstram que há uma menor ligação no receptor de adenosina A_{2a} em células do NTS de ratos SHR do que de ratos WKY em condição basal, sugerindo que um mecanismo de sinalização relacionado a respostas hipotensoras possa estar funcionando inadequadamente em células de ratos SHR, favorecendo o desenvolvimento da hipertensão nesta cepa.

E por fim, a modulação do receptor de adenosina A_{2a} pela nicotina demonstrou diminuir o funcionamento desse receptor em células do bulbo contendo o NTS, onde possivelmente esse efeito pode desregular outros sistemas de neurotransmissão aos quais o rA_{2a} está associado favorecendo o surgimento da hipertensão. Estes resultados ajudaram a explicar a ação direta da nicotina sobre um mecanismo de sinalização

envolvido em respostas hipotensoras em um núcleo encefálico muito importante no controle neural da pressão arterial, assim como, compreender melhor seu possível envolvimento na gênese da hipertensão.

CONCLUSÕES

Conclusões

Com base nos resultados apresentados pode-se concluir que:

- O receptor de adenosina A_{2a} parece menos eficiente em células de ratos hipertensos do que em células de ratos normotensos em condição basal, possivelmente influenciando no desenvolvimento da hipertensão em ratos geneticamente hipertensos,
- A nicotina modulou o funcionamento do receptor de adenosina A_{2a} em células do bulbo de ambas as linhagens, agindo na ligação, nos níveis protéicos e na expressão do RNAm do rA_{2a} ,
- A modulação do receptor de adenosina A_{2a} pela nicotina parece ocorrer com maior magnitude em células de ratos normotensos do que de hipertensos, pois células de ratos WKY tiveram maiores efeitos em resposta aos mesmos tratamentos com nicotina do que as células de ratos SHR.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Referências Bibliográficas

Akemi Sato, M., Colombari, E., Morrison, S. F. Inhibition of commissural nucleus of the solitary tract (commNTS) reduces sympathetic nerve activity (SNA) in spontaneously hypertensive rats (SHR). Physiologist, v.43, p.264. 2000.

Akemi Sato, M., Vanderlei Menani, J., Ubriaco Lopes, O., Colombari, E. Lesions of the commissural nucleus of the solitary tract reduce arterial pressure in spontaneously hypertensive rats. Hypertension, v.38, n.3 Pt 2, p.560-4. 2001.

Akine, A., Montanaro, M., Allen, A. M. Hypothalamic paraventricular nucleus inhibition decreases renal sympathetic nerve activity in hypertensive and normotensive rats. Auton Neurosci, v.108, n.1-2, p.17-21. 2003.

Alkondon, M., Pereira, E. F., Barbosa, C. T., Albuquerque, E. X. Neuronal nicotinic acetylcholine receptor activation modulates gamma-aminobutyric acid release from CA1 neurons of rat hippocampal slices. J Pharmacol Exp Ther, v.283, n.3, p.1396-411. 1997.

Alvarez, Y., Briones, A. M., Hernanz, R., Perez-Giron, J. V., Alonso, M. J., Salaices, M. Role of NADPH oxidase and iNOS in vasoconstrictor responses of vessels from hypertensive and normotensive rats. Br J Pharmacol, v.153, n.5, p.926-35. 2008.

Anderson, C. M., Xiong, W., Young, J. D., Cass, C. E., Parkinson, F. E. Demonstration of the existence of mRNAs encoding N1/cif and N2/cit sodium/nucleoside cotransporters in rat brain. Brain Res Mol Brain Res, v.42, n.2, p.358-61. 1996.

Andresen, M. C., Doyle, M. W., Jin, Y. H., Bailey, T. W. Cellular mechanisms of baroreceptor integration at the nucleus tractus solitarius. Ann N Y Acad Sci, v.940, p.132-41. 2001.

Arcuri, E. A. M., Araújo, T. L., Veiga, E. V., Oliveira, S. M., Lamas, J. L. T., Santos, J. L. F. Sons de Korotkoff: desenvolvimento da pesquisa em esfigmomanometria na Escola de Enfermagem da USP. Rev Esc Enferm USP, v. 41, n.1, p.147-53. 2007.

Armstrong, J. M., Chen, J. F., Schwarzschild, M. A., Apasov, S., Smith, P. T., Caldwell, C., Chen, P., Figler, H., Sullivan, G., Fink, S., Linden, J., Sitkovsky, M. Gene dose effect reveals no Gs-coupled A2A adenosine receptor reserve in murine T-lymphocytes: studies of cells from A2A-receptor-gene-deficient mice. Biochem J, v.354, n.Pt 1, p.123-30. 2001.

Ascherio, A., Zhang, S. M., Hernan, M. A., Kawachi, I., Colditz, G. A., Speizer, F. E., Willett, W. C. Prospective study of caffeine consumption and risk of Parkinson's disease in men and women. Ann Neurol, v.50, n.1, p.56-63. 2001.

Baldwin, S. A., Mackey, J. R., Cass, C. E., Young, J. D. Nucleoside transporters: molecular biology and implications for therapeutic development. Mol Med Today, v.5, n.5, p.216-24. 1999.

Barraco, R. A., El-Ridi, M. R., Ergene, E., Phillis, J. W. Adenosine receptor subtypes in the brainstem mediate distinct cardiovascular response patterns. Brain Res Bull, v.26, n.1, p.59-84. 1991.

Barraco, R. A., Janusz, C. J., Polasek, P. M., Parizon, M., Roberts, P. A. Cardiovascular effects of microinjection of adenosine into the nucleus tractus solitarius. Brain Res Bull, v.20, n.1, p.129-32. 1988.

Barraco, R. A., O'leary, D. S., Ergene, E., Scislo, T. J. Activation of purinergic receptor subtypes in the nucleus tractus solitarius elicits specific regional vascular response patterns. J Auton Nerv Syst, v.59, n.3, p.113-24. 1996.

Barraco, R. A., Phillis, J. W. Subtypes of adenosine receptors in the brainstem mediate opposite blood pressure responses. Neuropharmacology, v.30, n.4, p.403-7. 1991.

Bennett, J. A., McWilliam, P. N., Shephard, S. L. A gamma-aminobutyric-acid-mediated inhibition of neurones in the nucleus tractus solitarius of the cat. J Physiol, v.392, p.417-30. 1987.

Blessing, W. W., Reis, D. J. Inhibitory cardiovascular function of neurons in the caudal ventrolateral medulla of the rabbit: relationship to the area containing A1 noradrenergic cells. Brain Res, v.253, n.1-2, p.161-71. 1982.

Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem, v.72, p.248-54. 1976.

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

Broide, R. S., Leslie, F. M. The alpha7 nicotinic acetylcholine receptor in neuronal plasticity. Mol Neurobiol, v.20, n.1, p.1-16. 1999.

Burnstock, G. Historical review: ATP as a neurotransmitter. Trends Pharmacol Sci, v.27, n.3, p.166-76. 2006.

Burnstock, G. Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. Physiol Rev, v.87, n.2, p.659-797. 2007.

Campos Junior, R. R., Guertzenstein, P. G. Role of the glycine sensitive area in the regulation of cardiac output. Prog Brain Res, v.81, p.243-51. 1989.

Carlezon, W. A., Jr., Duman, R. S., Nestler, E. J. The many faces of CREB. Trends Neurosci, v.28, n.8, p.436-45. 2005.

Carrettiero, D. C., Fior-Chadi, D. R. Age-dependent changes in adenosine A1 receptor distribution and density within the nucleus tractus solitarii of normotensive and hypertensive rats. J Neural Transm, v.115, n.8, p.1109-18. 2008.

Castane, A., Soria, G., Ledent, C., Maldonado, R., Valverde, O. Attenuation of nicotine-induced rewarding effects in A2A knockout mice. Neuropharmacology, v.51, n.3, p.631-40. 2006.

Castillo-Melendez, M., Krstew, E., Lawrence, A. J., Jarrott, B. Presynaptic adenosine A2a receptors on soma and central terminals of rat vagal afferent neurons. Brain Res, v.652, n.1, p.137-44. 1994.

Celik, E., Uzbay, I. T., Karakas, S. Caffeine and amphetamine produce cross-sensitization to nicotine-induced locomotor activity in mice. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, v.30, n.1, p.50-5. 2006.

Chen, J. F., Huang, Z., Ma, J., Zhu, J., Moratalla, R., Standaert, D., Moskowitz, M. A., Fink, J. S., Schwarzschild, M. A. A(2A) adenosine receptor deficiency attenuates brain injury induced by transient focal ischemia in mice. J Neurosci, v.19, n.21, p.9192-200. 1999.

Chheda, M. G., Ashery, U., Thakur, P., Rettig, J., Sheng, Z. H. Phosphorylation of Snapin by PKA modulates its interaction with the SNARE complex. Nat Cell Biol, v.3, n.4, p.331-8. 2001.

Colombari, E., Sato, M. A., Cravo, S. L., Bergamaschi, C. T., Campos, R. R., Jr., Lopes, O. U. Role of the medulla oblongata in hypertension. Hypertension, v.38, n.3 Pt 2, p.549-54. 2001.

Cravo, S. L., Morrison, S. F., Reis, D. J. Differentiation of two cardiovascular regions within caudal ventrolateral medulla. Am J Physiol, v.261, n.4 Pt 2, p.R985-94. 1991.

Dajas-Bailador, F., Wonnacott, S. Nicotinic acetylcholine receptors and the regulation of neuronal signalling. Trends Pharmacol Sci, v.25, n.6, p.317-24. 2004.

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

Dampney, R. A., Coleman, M. J., Fontes, M. A., Hirooka, Y., Horiuchi, J., Li, Y. W., Polson, J. W., Potts, P. D., Tagawa, T. Central mechanisms underlying short- and long-term regulation of the cardiovascular system. Clin Exp Pharmacol Physiol, v.29, n.4, p.261-8. 2002.

Dani, J. A. Nicotinic receptor activity alters synaptic plasticity. ScientificWorldJournal, v.1, p.393-5. 2001a.

Dani, J. A. Overview of nicotinic receptors and their roles in the central nervous system. Biol Psychiatry, v.49, n.3, p.166-74. 2001b.

Dani, J. A., Bertrand, D. Nicotinic acetylcholine receptors and nicotinic cholinergic mechanisms of the central nervous system. Annu Rev Pharmacol Toxicol, v.47, p.699-729. 2007.

Day, Y. J., Huang, L., McDuffie, M. J., Rosin, D. L., Ye, H., Chen, J. F., Schwarzschild, M. A., Fink, J. S., Linden, J., Okusa, M. D. Renal protection from ischemia mediated by A2A adenosine receptors on bone marrow-derived cells. J Clin Invest, v.112, n.6, p.883-91. 2003.

Deckert, J., Nothen, M. M., Bryant, S. P., Schuffenhauer, S., Schofield, P. R., Spurr, N. K., Propping, P. Mapping of the human adenosine A2a receptor gene: relationship to potential schizophrenia loci on chromosome 22q and exclusion from the CATCH 22 region. Hum Genet, v.99, n.3, p.326-8. 1997.

Dhar, S., Nagy, F., McIntosh, J. M., Sapru, H. N. Receptor subtypes mediating depressor responses to microinjections of nicotine into medial NTS of the rat. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, v.279, n.1, p.R132-40. 2000.

Doggrell, S. A., Brown, L. Rat models of hypertension, cardiac hypertrophy and failure. Cardiovasc Res, v.39, n.1, p.89-105. 1998.

Dubey, R. K., Gillespie, D. G., Osaka, K., Suzuki, F., Jackson, E. K. Adenosine inhibits growth of rat aortic smooth muscle cells. Possible role of A2b receptor. Hypertension, v.27, n.3 Pt 2, p.786-93. 1996.

Dunwiddie, T. V., Diao, L., Proctor, W. R. Adenine nucleotides undergo rapid, quantitative conversion to adenosine in the extracellular space in rat hippocampus. J Neurosci, v.17, n.20, p.7673-82. 1997.

Feldberg, W., Guertzenstein, P. G. A vasodepressor effect of pentobarbitone sodium when acting from the liquor space. J Physiol, v.222, n.2, p.150P-151P. 1972.

Fenster, C. P., Beckman, M. L., Parker, J. C., Sheffield, E. B., Whitworth, T. L., Quick, M. W., Lester, R. A. Regulation of alpha4beta2 nicotinic receptor desensitization by calcium and protein kinase C. Mol Pharmacol, v.55, n.3, p.432-43. 1999a.

Fenster, C. P., Hicks, J. H., Beckman, M. L., Covernton, P. J., Quick, M. W., Lester, R. A. Desensitization of nicotinic receptors in the central nervous system. Ann N Y Acad Sci, v.868, p.620-3. 1999b.

Fenster, C. P., Rains, M. F., Noerager, B., Quick, M. W., Lester, R. A. Influence of subunit composition on desensitization of neuronal acetylcholine receptors at low concentrations of nicotine. J Neurosci, v.17, n.15, p.5747-59. 1997.

Ferrari, M. F. Efeito Modulatório da Nicotina sobre a Neurotransmissão em Núcleos Encefálicos Responsáveis pelo Controle Cardiovascular em Ratos Geneticamente Hipertensos e Normotensos. (Tese Doutorado). Departamento de Fisiologia - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

Ferrari, M. F., Fior-Chadi, D. R. Chronic nicotine administration. Analysis of the development of hypertension and glutamatergic neurotransmission. Brain Res Bull, v.72, n.4-6, p.215-24. 2007.

Ferrari, M. F., Raizada, M. K., Fior-Chadi, D. R. Nicotine modulates the renin-angiotensin system of cultured neurons and glial cells from cardiovascular brain areas of

Wistar Kyoto and spontaneously hypertensive rats. J Mol Neurosci, v.33, n.3, p.284-93. 2007.

Ferrari, M. F., Raizada, M. K., Fior-Chadi, D. R. Differential regulation of the renin-angiotensin system by nicotine in WKY and SHR glia. J Mol Neurosci, v.35, n.2, p.151-60. 2008a.

Ferrari, M. F., Reis, E. M., Matsumoto, J. P., Fior-Chadi, D. R. Gene Expression Profiling of Cultured Cells From Brainstem of Newborn Spontaneously Hypertensive and Wistar Kyoto Rats. Cell Mol Neurobiol. 2008b.

Ferrari, M. F., Reis, E. M., Matsumoto, J. P., Fior-Chadi, D. R. Gene expression profiling of cultured cells from brainstem of spontaneously hypertensive and Wistar Kyoto rats. Whole genome microarray analysis. Cellular and Molecular Neurobiology, . 2008c.

Ferrari, R., Le Novere, N., Picciotto, M. R., Changeux, J. P., Zoli, M. Acute and long-term changes in the mesolimbic dopamine pathway after systemic or local single nicotine injections. Eur J Neurosci, v.15, n.11, p.1810-8. 2002.

Fredholm, B. B., Ap, I. J., Jacobson, K. A., Klotz, K. N., Linden, J. International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. Pharmacol Rev, v.53, n.4, p.527-52. 2001.

Fuxe, K., Ferre, S., Genedani, S., Franco, R., Agnati, L. F. Adenosine receptor-dopamine receptor interactions in the basal ganglia and their relevance for brain function. Physiol Behav, v.92, n.1-2, p.210-7. 2007.

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

Grassi, G., Trevano, F. Q., Seravalle, G., Scopelliti, F., Mancia, G. Baroreflex function in hypertension: consequences for antihypertensive therapy. Prog Cardiovasc Dis, v.48, n.6, p.407-15. 2006.

Grayson, T. H., Ohms, S. J., Brackenbury, T. D., Meaney, K. R., Peng, K., Pittelkow, Y. E., Wilson, S. R., Sandow, S. L., Hill, C. E. Vascular microarray profiling in two models of hypertension identifies caveolin-1, Rgs2 and Rgs5 as antihypertensive targets. BMC Genomics, v.8, p.404. 2007.

Gueorguiev, V. D., Zeman, R. J., Hiremagalur, B., Menezes, A., Sabban, E. L. Differing temporal roles of Ca²⁺ and cAMP in nicotine-elicited elevation of tyrosine hydroxylase mRNA. Am J Physiol, v.276, n.1 Pt 1, p.C54-65. 1999.

Guertzenstein, P. G. Vasodepressor and pressor responses to drugs topically applied to the ventral surface of the brain stem. J Physiol, v.224, n.2, p.84P-85P. 1972.

Guertzenstein, P. G., Silver, A. Fall in blood pressure produced from discrete regions of the ventral surface of the medulla by glycine and lesions. J Physiol, v.242, n.2, p.489-503. 1974.

Guo, J. Z., Tredway, T. L., Chiappinelli, V. A. Glutamate and GABA release are enhanced by different subtypes of presynaptic nicotinic receptors in the lateral geniculate nucleus. J Neurosci, v.18, n.6, p.1963-9. 1998.

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

Haschemi, A., Wagner, O., Marculescu, R., Wegiel, B., Robson, S. C., Gagliani, N., Gallo, D., Chen, J. F., Bach, F. H., Otterbein, L. E. Cross-regulation of carbon monoxide and the adenosine A2a receptor in macrophages. J Immunol, v.178, n.9, p.5921-9. 2007.

Hogg, R. C., Raggenbass, M., Bertrand, D. Nicotinic acetylcholine receptors: from structure to brain function. Rev Physiol Biochem Pharmacol, v.147, p.1-46. 2003.

Inoue, Y., Yao, L., Hopf, F. W., Fan, P., Jiang, Z., Bonci, A., Diamond, I. Nicotine and ethanol activate protein kinase A synergistically via G(i) betagamma subunits in nucleus

accumbens/ventral tegmental cocultures: the role of dopamine D(1)/D(2) and adenosine A(2A) receptors. J Pharmacol Exp Ther, v.322, n.1, p.23-9. 2007.

Ito, S., Sved, A. F. Tonic glutamate-mediated control of rostral ventrolateral medulla and sympathetic vasomotor tone. Am J Physiol, v.273, n.2 Pt 2, p.R487-94. 1997.

Izquierdo, I., Izquierdo, J. A. Effects of drugs on deep brain centers. Annu Rev Pharmacol, v.11, p.189-208. 1971.

Jacobson, K. A., Gao, Z. G. Adenosine receptors as therapeutic targets. Nat Rev Drug Discov, v.5, n.3, p.247-64. 2006.

Jansen, A. S., Nguyen, X. V., Karpitskiy, V., Mettenleiter, T. C., Loewy, A. D. Central command neurons of the sympathetic nervous system: basis of the fight-or-flight response. Science, v.270, n.5236, p.644-6. 1995.

Jordan, D., Mifflin, S. W., Spyer, K. M. Hypothalamic inhibition of neurones in the nucleus tractus solitarius of the cat is GABA mediated. J Physiol, v.399, p.389-404. 1988.

Kane, J. K., Hwang, Y., Konu, O., Loughlin, S. E., Leslie, F. M., Li, M. D. Regulation of Homer and group I metabotropic glutamate receptors by nicotine. Eur J Neurosci, v.21, n.5, p.1145-54. 2005.

Kane, J. K., Konu, O., Ma, J. Z., Li, M. D. Nicotine coregulates multiple pathways involved in protein modification/degradation in rat brain. Brain Res Mol Brain Res, v.132, n.2, p.181-91. 2004.

Kew, J. N., Kemp, J. A. Ionotropic and metabotropic glutamate receptor structure and pharmacology. Psychopharmacology (Berl), v.179, n.1, p.4-29. 2005.

Kitamura, A., Ishibashi, H., Watanabe, M., Takatsuru, Y., Brodwick, M., Nabekura, J. Sustained depolarizing shift of the GABA reversal potential by glutamate receptor activation in hippocampal neurons. Neurosci Res. 2008.

Kivell, B. M., McDonald, F. J., Miller, J. H. Method for serum-free culture of late fetal and early postnatal rat brainstem neurons. Brain Res Brain Res Protoc, v.6, n.3, p.91-9. 2001.

Latini, S., Bordoni, F., Pedata, F., Corradetti, R. Extracellular adenosine concentrations during in vitro ischaemia in rat hippocampal slices. Br J Pharmacol, v.127, n.3, p.729-39. 1999.

Lawrence, A. J., Jarrott, B. Neurochemical modulation of cardiovascular control in the nucleus tractus solitarius. Prog Neurobiol, v.48, n.1, p.21-53. 1996.

Lena, C., Changeux, J. P. Role of Ca²⁺ ions in nicotinic facilitation of GABA release in mouse thalamus. J Neurosci, v.17, n.2, p.576-85. 1997.

Lena, C., Changeux, J. P., Mulle, C. Evidence for "preterminal" nicotinic receptors on GABAergic axons in the rat interpeduncular nucleus. J Neurosci, v.13, n.6, p.2680-8. 1993.

Lewis, D. K., Woodin, H. R., Sohrabji, F. Astrocytes from Acyclic Female Rats Exhibit Lowered Capacity for Neuronal Differentiation. Aging Cell. 2008.

Li, M. D., Kane, J. K., Parker, S. L., Mcallen, K., Matta, S. G., Sharp, B. M. Nicotine administration enhances NPY expression in the rat hypothalamus. Brain Res, v.867, n.1-2, p.157-64. 2000.

Liclican, E. L., McGiff, J. C., Falck, J. R., Carroll, M. A. Failure to upregulate the adenosine 2A receptor-epoxyeicosatrienoic acid pathway contributes to the development of hypertension in Dahl salt-sensitive rats. Am J Physiol Renal Physiol. 2008.

Liclican, E. L., McGiff, J. C., Pedraza, P. L., Ferreri, N. R., Falck, J. R., Carroll, M. A. Exaggerated response to adenosine in kidneys from high salt-fed rats: role of epoxyeicosatrienoic acids. Am J Physiol Renal Physiol, v.289, n.2, p.F386-92. 2005.

Linden, J. Molecular approach to adenosine receptors: receptor-mediated mechanisms of tissue protection. Annu Rev Pharmacol Toxicol, v.41, p.775-87. 2001.

Linden, J. Adenosine in tissue protection and tissue regeneration. Mol Pharmacol, v.67, n.5, p.1385-7. 2005.

Lo, W. C., Jan, C. R., Wu, S. N., Tseng, C. J. Cardiovascular effects of nitric oxide and adenosine in the nucleus tractus solitarii of rats. Hypertension, v.32, n.6, p.1034-8. 1998.

Lo, W. J., Liu, H. W., Lin, H. C., Ger, L. P., Tung, C. S., Tseng, C. J. Modulatory effects of nitric oxide on baroreflex activation in the brainstem nuclei of rats. Chin J Physiol, v.39, n.1, p.57-62. 1996.

Maccollin, M., Peterfreund, R., Macdonald, M., Fink, J. S., Gusella, J. Mapping of a human A2a adenosine receptor (ADORA2) to chromosome 22. Genomics, v.20, n.2, p.332-3. 1994.

Matta, S. G., Valentine, J. D., Sharp, B. M. Nicotine activates NPY and catecholaminergic neurons in brainstem regions involved in ACTH secretion. Brain Res, v.759, n.2, p.259-69. 1997.

Maximino, J. R. Estudo da Neurotransmissão Encefálicas em Proles de Ratas Espontaneamente Hipertensas Tratadas Cronicamente com Nicotina. (Tese de Doutorado). Departamento de Fisiologia - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

Mifflin, S. W., Spyer, K. M., Withington-Wray, D. J. Baroreceptor inputs to the nucleus tractus solitarius in the cat: modulation by the hypothalamus. J Physiol, v.399, p.369-87. 1988.

Mimnaugh, E. G., Bonvini, P., Neckers, L. The measurement of ubiquitin and ubiquitinated proteins. Electrophoresis, v.20, n.2, p.418-28. 1999.

Miura, M., Reis, D. J. The role of the solitary and paramedian reticular nuclei in mediating cardiovascular reflex responses from carotid baro- and chemoreceptors. J Physiol, v.223, n.2, p.525-48. 1972.

Monopoli, A., Lozza, G., Forlani, A., Mattavelli, A., Ongini, E. Blockade of adenosine A2A receptors by SCH 58261 results in neuroprotective effects in cerebral ischaemia in rats. Neuroreport, v.9, n.17, p.3955-9. 1998.

Mosqueda-Garcia, R., Tseng, C. J., Appalsamy, M., Beck, C., Robertson, D. Cardiovascular excitatory effects of adenosine in the nucleus of the solitary tract. Hypertension, v.18, n.4, p.494-502. 1991.

Mulle, C., Choquet, D., Korn, H., Changeux, J. P. Calcium influx through nicotinic receptor in rat central neurons: its relevance to cellular regulation. Neuron, v.8, n.1, p.135-43. 1992a.

Mulle, C., Lena, C., Changeux, J. P. Potentiation of nicotinic receptor response by external calcium in rat central neurons. Neuron, v.8, n.5, p.937-45. 1992b.

Mulle, C., Vidal, C., Benoit, P., Changeux, J. P. Existence of different subtypes of nicotinic acetylcholine receptors in the rat habenulo-interpeduncular system. J Neurosci, v.11, n.8, p.2588-97. 1991.

Nathan, M. A., Reis, D. J. Chronic labile hypertension produced by lesions of the nucleus tractus solitarii in the cat. Circ Res, v.40, n.1, p.72-81. 1977.

Oikawa, H., Nakamichi, N., Kambe, Y., Ogura, M., Yoneda, Y. An increase in intracellular free calcium ions by nicotinic acetylcholine receptors in a single cultured rat cortical astrocyte. J Neurosci Res, v.79, n.4, p.535-44. 2005.

Paton, J. F., Silva-Carvalho, L., Goldsmith, G. E., Spyer, K. M. Inhibition of barosensitive neurones evoked by lobule IXb of the posterior cerebellar cortex in the decerebrate rabbit. J Physiol, v.427, p.553-65. 1990.

Pidoplichko, V. I., Debiasi, M., Williams, J. T., Dani, J. A. Nicotine activates and desensitizes midbrain dopamine neurons. Nature, v.390, n.6658, p.401-4. 1997.

Puig, O., Tjian, R. Transcriptional feedback control of insulin receptor by dFOXO/FOXO1. Genes Dev, v.19, n.20, p.2435-46. 2005.

Ralevic, V., Burnstock, G. Receptors for purines and pyrimidines. Pharmacol Rev, v.50, n.3, p.413-92. 1998.

Reis, D. J., Talman, W. T. Brain lesions and hypertension. In: W, D. J. (Ed.). Experimental and Genetics Models of Hypertension. New York: Elsevier; 451 - 473, 1984. Birkenhäger, W. H. e Reid, J. L. Handbook of Hypertension, 4

Rezvani, K., Teng, Y., Shim, D., De Biasi, M. Nicotine regulates multiple synaptic proteins by inhibiting proteasomal activity. J Neurosci, v.27, n.39, p.10508-19. 2007.

Riah, O., Courriere, P., Dousset, J. C., Todeschi, N., Labat, C. Nicotine is more efficient than cotinine at passing the blood-brain barrier in rats. Cell Mol Neurobiol, v.18, n.3, p.311-8. 1998.

Ross, G. W., Abbott, R. D., Petrovitch, H., Morens, D. M., Grandinetti, A., Tung, K. H., Tanner, C. M., Masaki, K. H., Blanchette, P. L., Curb, J. D., Popper, J. S., White, L. R. Association of coffee and caffeine intake with the risk of Parkinson disease. Jama, v.283, n.20, p.2674-9. 2000.

Rudolphi, K. A., Schubert, P., Parkinson, F. E., Fredholm, B. B. Adenosine and brain ischemia. Cerebrovasc Brain Metab Rev, v.4, n.4, p.346-69. 1992.

Rysa, J., Leskinen, H., Ilves, M., Ruskoaho, H. Distinct upregulation of extracellular matrix genes in transition from hypertrophy to hypertensive heart failure. Hypertension, v.45, n.5, p.927-33. 2005.

Sargent, P. B. The diversity of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. Annu Rev Neurosci, v.16, p.403-43. 1993.

SBH. V Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial. Revista Brasileira de Hipertensão Arterial, v.9, n.4, p.121-157. 2006.

Scher, A. M. Cardiovascular Control. In: (Ed.). IX Circulation, Chapter 51, p.972 - 990, 1983.

Schmitt, H., Laubie, M. Destruction of the nucleus tractus solitarii in dogs: acute effects on blood pressure and haemodynamics, chronic effects on blood pressure: importance of the nucleus for the effects of drugs. In: Meyer, P. e Schmitt, H. (Ed.). Nervous Systems and Hypertension. New York: Wiley - Flammation; 173 - 201, 1979.

Schreihofer, A. M., Guyenet, P. G. The baroreflex and beyond: control of sympathetic vasomotor tone by GABAergic neurons in the ventrolateral medulla. Clin Exp Pharmacol Physiol, v.29, n.5-6, p.514-21. 2002.

Schubert, P., Komp, W., Kreutzberg, G. W. Correlation of 5'-nucleotidase activity and selective transneuronal transfer of adenosine in the hippocampus. Brain Res, v.168, n.2, p.419-24. 1979.

Schwartz, J. H. The many dimensions of cAMP signaling. Proc Natl Acad Sci U S A, v.98, n.24, p.13482-4. 2001.

Scislo, T. J., O'leary, D. S. Purinergic mechanisms of the nucleus of the solitary tract and neural cardiovascular control. Neurol Res, v.27, n.2, p.182-94. 2005.

Scislo, T. J., O'leary, D. S. Vasopressin V1 receptors contribute to hemodynamic and sympathoinhibitory responses evoked by stimulation of adenosine A2a receptors in NTS. Am J Physiol Heart Circ Physiol, v.290, n.5, p.H1889-98. 2006.

Scislo, T. J., Tan, N., O'leary, D. S. Differential role of nitric oxide in regional sympathetic responses to stimulation of NTS A2a adenosine receptors. Am J Physiol Heart Circ Physiol, v.288, n.2, p.H638-49. 2005.

Seguela, P., Wadiche, J., Dineley-Miller, K., Dani, J. A., Patrick, J. W. Molecular cloning, functional properties, and distribution of rat brain alpha 7: a nicotinic cation channel highly permeable to calcium. J Neurosci, v.13, n.2, p.596-604. 1993.

Serova, L., Sabban, E. L. Involvement of alpha 7 nicotinic acetylcholine receptors in gene expression of dopamine biosynthetic enzymes in rat brain. J Pharmacol Exp Ther, v.303, n.3, p.896-903. 2002.

Sharma, G., Vijayaraghavan, S. Modulation of presynaptic store calcium induces release of glutamate and postsynaptic firing. Neuron, v.38, n.6, p.929-39. 2003.

Shihara, M., Hori, N., Hirooka, Y., Eshima, K., Akaike, N., Takeshita, A. Cholinergic systems in the nucleus of the solitary tract of rats. Am J Physiol, v.276, n.4 Pt 2, p.R1141-8. 1999.

Silva-Carvalho, L., Dawid-Milner, M. S., Spyer, K. M. The pattern of excitatory inputs to the nucleus tractus solitarii evoked on stimulation in the hypothalamic defence area in the cat. J Physiol, v.487 (Pt 3), p.727-37. 1995.

Smith, D. V., Uteshev, V. V. Heterogeneity of nicotinic acetylcholine receptor expression in the caudal nucleus of the solitary tract. Neuropharmacology, v.54, n.2, p.445-53. 2008.

Smith, I. B. The impact of Stephen Hales on medicine. J R Soc Med, v.86, n.6, p.349-52. 1993.

Soria, G., Castane, A., Berrendero, F., Ledent, C., Parmentier, M., Maldonado, R., Valverde, O. Adenosine A2A receptors are involved in physical dependence and place conditioning induced by THC. Eur J Neurosci, v.20, n.8, p.2203-13. 2004.

Soria, G., Castane, A., Ledent, C., Parmentier, M., Maldonado, R., Valverde, O. The lack of A2A adenosine receptors diminishes the reinforcing efficacy of cocaine. Neuropsychopharmacology, v.31, n.5, p.978-87. 2006.

Spyer, K. M. Annual review prize lecture. Central nervous mechanisms contributing to cardiovascular control. J Physiol, v.474, n.1, p.1-19. 1994.

Sun, B., Chen, X., Xu, L., Sterling, C., Tank, A. W. Chronic nicotine treatment leads to induction of tyrosine hydroxylase in locus ceruleus neurons: the role of transcriptional activation. Mol Pharmacol, v.66, n.4, p.1011-21. 2004.

Sved, A. F., Cano, G., Card, J. P. Neuroanatomical specificity of the circuits controlling sympathetic outflow to different targets. Clin Exp Pharmacol Physiol, v.28, n.1-2, p.115-9. 2001.

Sved, A. F., Gordon, F. J. Amino acids as central neurotransmitters in the baroreceptor reflex pathway. News Physiol. Sci., v.9, p.243-246. 1994.

Sved, A. F., Ito, S., Madden, C. J. Baroreflex dependent and independent roles of the caudal ventrolateral medulla in cardiovascular regulation. Brain Res Bull, v.51, n.2, p.129-33. 2000.

Sved, A. F., Ito, S., Yajima, Y. Role of excitatory amino acid inputs to the rostral ventrolateral medulla in cardiovascular regulation. Clin Exp Pharmacol Physiol, v.29, n.5-6, p.503-6. 2002.

Tabrizchi, R., Bedi, S. Pharmacology of adenosine receptors in the vasculature. Pharmacol Ther, v.91, n.2, p.133-47. 2001.

Takeda, D., Nakatsuka, T., Papke, R., Gu, J. G. Modulation of inhibitory synaptic activity by a non- $\alpha 4\beta 2$, non- $\alpha 7$ subtype of nicotinic receptors in the substantia gelatinosa of adult rat spinal cord. Pain, v.101, n.1-2, p.13-23. 2003.

Talman, W. T., Granata, A. R., Reis, D. J. Glutamatergic mechanisms in the nucleus tractus solitarius in blood pressure control. Fed Proc, v.43, n.1, p.39-44. 1984.

Torrazo, A. S., Britto, L. R. Neurotransmitter regulation of neural development: acetylcholine and nicotinic receptors. An Acad Bras Cienc, v.74, n.3, p.453-61. 2002.

Tseng, C. J., Biaggioni, I., Appalsamy, M.,Robertson, D. Purinergic receptors in the brainstem mediate hypotension and bradycardia. Hypertension, v.11, n.2, p.191-7. 1988.

Ueno, S., Kakehata, S.,Akaike, N. Nicotinic acetylcholine receptor in dissociated rat nucleus tractus solitarii neurons. Neurosci Lett, v.149, n.1, p.15-8. 1993.

Vallejo, Y. F., Buisson, B., Bertrand, D.,Green, W. N. Chronic nicotine exposure upregulates nicotinic receptors by a novel mechanism. J Neurosci, v.25, n.23, p.5563-72. 2005.

Van Giersbergen, P. L., Palkovits, M.,De Jong, W. Involvement of neurotransmitters in the nucleus tractus solitarii in cardiovascular regulation. Physiol Rev, v.72, n.3, p.789-824. 1992.

Vernino, S., Rogers, M., Radcliffe, K. A.,Dani, J. A. Quantitative measurement of calcium flux through muscle and neuronal nicotinic acetylcholine receptors. J Neurosci, v.14, n.9, p.5514-24. 1994.

Wang, F., Chen, H., Steketee, J. D.,Sharp, B. M. Upregulation of ionotropic glutamate receptor subunits within specific mesocorticolimbic regions during chronic nicotine self-administration. Neuropsychopharmacology, v.32, n.1, p.103-9. 2007.

White, J. D., Krause, J. E.,Mckelvy, J. F. In vivo biosynthesis and transport of oxytocin, vasopressin, and neurophysins to posterior pituitary and nucleus of the solitary tract. J Neurosci, v.4, n.5, p.1262-70. 1984.

Willette, R. N., Punnen-Grandy, S., Krieger, A. J.,Sapru, H. N. Differential regulation of regional vascular resistance by the rostral and caudal ventrolateral medulla in the rat. J Auton Nerv Syst, v.18, n.2, p.143-51. 1987.

Williams, T. C.,Jarvis, S. M. Multiple sodium-dependent nucleoside transport systems in bovine renal brush-border membrane vesicles. Biochem J, v.274 (Pt 1), p.27-33. 1991.

- Wu, X., Yen, L., Irwin, L., Sweeney, C., Carraway, K. L., 3rd. Stabilization of the E3 ubiquitin ligase Nrdp1 by the deubiquitinating enzyme USP8. Mol Cell Biol, v.24, n.17, p.7748-57. 2004.
- Xu, K., Bastia, E., Schwarzschild, M. Therapeutic potential of adenosine A(2A) receptor antagonists in Parkinson's disease. Pharmacol Ther, v.105, n.3, p.267-310. 2005.
- Yegutkin, G. G. Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade. Biochim Biophys Acta, v.1783, n.5, p.673-94. 2008.
- Zakharenko, S. S., Zablow, L., Siegelbaum, S. A. Visualization of changes in presynaptic function during long-term synaptic plasticity. Nat Neurosci, v.4, n.7, p.711-7. 2001.
- Zarei, M. M., Radcliffe, K. A., Chen, D., Patrick, J. W., Dani, J. A. Distributions of nicotinic acetylcholine receptor alpha7 and beta2 subunits on cultured hippocampal neurons. Neuroscience, v.88, n.3, p.755-64. 1999.
- Zezula, J., Freissmuth, M. The A(2A)-adenosine receptor: a GPCR with unique features? Br J Pharmacol, v.153 Suppl 1, p.S184-90. 2008.
- Zhang, H., Sulzer, D. Frequency-dependent modulation of dopamine release by nicotine. Nat Neurosci, v.7, n.6, p.581-2. 2004.
- Zhou, F. M., Liang, Y., Dani, J. A. Endogenous nicotinic cholinergic activity regulates dopamine release in the striatum. Nat Neurosci, v.4, n.12, p.1224-9. 2001.
- Zimmermann, H., Braun, N., Kegel, B., Heine, P. New insights into molecular structure and function of ectonucleotidases in the nervous system. Neurochem Int, v.32, n.5-6, p.421-5. 1998.

APÊNDICE

Apêndice

Os resultados do presente trabalho foram apresentados em congressos nacionais e internacionais, bem como foram submetidos a publicação, e os dados estão sendo compilados para elaboração de artigos científicos.

Manuscrito em preparação:

MATSUMOTO, J. P. P; FERRARI, M. F. R; CARRETTIERO, D. C. & FIOR-CHADI, D.R. (2009). Differential modulation of adenosine A_{2a} receptor by nicotine in cultured cells of WKY and SHR rats.

Congresso Internacional:

MATSUMOTO, J. P. P; FERRARI, M. F. R; FIOR-CHADI, D. R. Effects of nicotine on the expression of adenosine A_{2a} receptor mRNA in cultured neurons from medulla oblongata of normotensive and hypertensive rats. I CONGRESSO IBRO/LARC DE NEUROCIÊNCIAS DA AMÉRICA LATINA, CARIBE E PENÍNSULA IBÉRICA. Búzios – RJ, 2008.

Congresso Nacional:

MATSUMOTO, J. P. P; FERRARI, M. F. R; FIOR-CHADI, D. R. Análise do tratamento com nicotina na expressão do RNAm do receptor de adenosina A_{2a} em cultura de neurônios da medula oblonga de ratos normotensos e hipertensos. XVI Congresso Interno de Apoio a Pesquisa em Neurociências e Comportamento. São Paulo, 2008.