WILLIAN SEIJI KORIM

Vias centrais purinérgicas envolvidas na regulação do fluxo sangüíneo muscular durante os comportamentos de alerta e defesa

Tese apresentada à Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Psicologia pelo programa de pós-graduação em Neurociências e Comportamento.

São Paulo

2006

WILLIAN SEIJI KORIM

Vias centrais purinérgicas envolvidas na regulação do fluxo sangüíneo muscular durante os comportamentos de alerta e defesa

Tese apresentada à Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Psicologia pelo programa de pós-graduação em Neurociências e Comportamento.

Orientador

Prof. Dr. Sergio Luiz D. Cravo

Korim, Willian Seiji

Vias centrais purinérgicas envolvidas na regulação do fluxo sangüíneo muscular durante os comportamentos de alerta e defesa. / Willian Seiji Korim – São Paulo, 2006. XI, 118f.

Tese (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Programa de Pós-Graduaçao em Neurociências e Comportamento.

Título em inglês: Purinergic central pathways involved in the muscle blood flow regulation during alerting defense behaviours.

1. Reação de alerta e defesa. 2. Hipotálamo. 3. Fluxo sangüíneo. 4. NTS. 5. Transmissão purinérgica.

Aos meus pais:

Tereza Massaco Korim

Julio Korim

... por tudo que ganhei deles: por me proporcionarem educação, apoio e motivação... por tudo que sou hoje.

Minha eterna gratidão!

Raquel (kel**)...

... por tudo que compartilhamos, pela sua paciência, carinho , compreensão, dedicação e amor;

... pelo que vivemos e ainda vamos viver;

... por me inspirar, não somente na profissão, mas na vida;

... por estar ao meu lado.

Dedico minha Tese àqueles que já se foram. No entanto, antes ajudaram a iluminar o caminho de muitos e ainda motivam o os sonhos de outros. Deles ganhei a paixão pela ciência, pela fisiologia e pela fisioterapia:

Prof. Dra. Odete de Fátima Sallas Durigon (*in memorian*)
Prof. Dr. César Timo-Iaria (*in memorian*)

... saudades

“I thought what I'd do was, I'd pretend I was one of those deaf-mutes.”

(J.D. Salinger – The catcher in the rye)

Agradecimentos:

Em especial ao Prof. Dr. Sérgio Luiz D. Cravo por me ensinar a ciência que existe acima da minha pesquisa desenvolvida. Por ter feito acontecer essa ciência que outros haviam me inspirado e por ter me motivado a ir além. Por tudo que me ensinou e vem me ensinando, pela amizade e pelo prazer de pesquisar em seu laboratório.

Fernanda, Olga, Daniel, Gustavo, Luciana, Celisa e Julia: a vocês agradeço pela paciência, motivação, ajuda, companheirismo, lealdade, dedicação, competência, divertimento, isto é, amizade. Principalmente por terem transformado todo meu trabalho e minha pesquisa num hobby, ainda assim mantendo toda qualidade e seriedade. Por antes serem meus colegas de trabalho e hoje serem meus amigos.

Ao Marcos L. Ferreira Neto, em primeiro lugar pela amizade, pois o que está escrito acima também é atribuído a você. No entanto, também não posso deixar de agradecer sua paciente dedicação e confiança ao me ensinar os primeiros passos antes de seguir meu caminho dentro da pesquisa.

Aos docentes do programa de pós-graduação em Neurociências e Comportamento por proporcionarem muitas das ferramentas necessárias para este estudo.

Aos professores do departamento de Fisiologia cardiovascular e respiratória da Universidade Federal de São Paulo, pela disposição, conhecimento e profissionalismo.

Aos funcionários do departamento de Fisiologia cardiovascular e respiratória da Universidade Federal de São Paulo pelo auxílio e agradável convívio nesse período.

Aos amigos e colegas fisioterapeutas e alunos de fisioterapia do Departamento de fisioterapia da faculdade de medicina da Universidade de São Paulo.

Aos meus amigos Ivan Li Huang, Henrique Huang, Fabiana Ikeda (Fabi), Rafael Correia Vieira da Silva (Careca), Marina Oliveira (Ma), Catarina Boffino (Cati). Vocês sempre me ajudaram e acreditaram, por isso também são parte de tudo isso. Em especial meus amigos Jun Hirabayashi e Dan Alec Yamaguchi (k3ph) pelas nossas conversas as quais me fizeram entender um pouco mais sobre quem somos, o que fazemos e porque fazemos.

Aos meus pacientes...

Gostaria de agradecer a CAPES e ao PRONEX pelo suporte financeiro e contribuição à pesquisa

LISTA DE ABREVIATURAS

3V: terceiro ventrículo

5HT: serotonina

7-ni:7-nitroindazole

ap: área postrema

AP: ântero-posterior

ATP: adenosina tri-fosfato

C1: grupo de neurônios adrenérgicos

cc: canal central

CEDEME: centro de desenvolvimento de modelos experimentais

CS: cálamus scriptórius

CVL: núcleo reticular caudoventrolateral

CVMP: condutância vascular dos membros posteriores

DMD: núcleo hipotalâmico dorsomedial

DV: dorso-ventral

EE: estimulação elétrica

eeHipo: estimulação elétrica do hipotálamo

EPM: erro padrão da média

FC: freqüência cardíaca

FSMP: fluxo sangüíneo dos membros posteriores

HDA: área de defesa hipotalâmica

i.v.: intra venoso

IML: coluna intermédio-lateral

Kyn bilat NTS: ácido quinurênico bilateral no NTS

Kyn bilat RVL: ácido quinurênico bilateral no RVL

L-NAME: N^G-nitro-L-arginine methyl ester

ML: médio-lateral

mt: trato mamilo-talâmico

NA: núcleo Anbíguo

NO: óxido nítrico

NOS: óxido nítrico sintase

NTS: núcleos do trato solitário

PAM: pressão arterial média

PAP: pressão arterial pulsátil

py: trato cortiço piramidal

RVL: núcleo reticular rostroventrolateral

SNC: sistema nervoso central

SPV: núcleo espinal do nervo trigêmeo

VMH: núcleo hipotalâmico ventromedial

X: núcleo dorsal motor do vago

XII: núcleo hipoglosso

αβMeATP NTS: α,β-methylene ATP no NTS

ÍNDICE

RESUMO.....1

INTRODUÇÃO.....3

1-Introdução geral.....3

2-Núcleo rostroventrolateral.....8

3-Núcleos do trato solitário.....11

4-Receptores purinérgicos.....13

HIPÓTESE E OBJETIVOS.....23

MÉTODOS.....25

1-Procedimentos gerais.....25

2-Estimulação elétrica do hipotálamo.....28

3-Microinjeções no RVL e NTS.....28

4-Histologia.....29

5-Drogas utilizadas.....31

6-Análise estatística.....32

7-Protocolos experimentais.....33

7.1-Efeito do bloqueio de receptores purinérgicos P2x no NTS durante as reações de alerta e defesa.....33

7.2-Eficácia no bloqueio dos receptores purinérgicos P2x no NTS.....33

7.3-Efeito do bloqueio dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos no NTS nos ajustes cardiovasculares devido EE do Hipotálamo.....33

7.4-Efeito do bloqueio dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos no RVL durante a estimulação química do NTS com agonista purinérgico P2x.....33

7.5-Participação dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos no RVL durante a estimulação química do NTS com agonista purinérgico A2a.....34

7.6-Relação entre os receptores P2x no NTS e a retirada do tônus simpático nas reações de defesa.....34

RESULTADOS.....38

1-Efeito do bloqueio de receptores purinérgicos P2x no NTS durante as reações de alerta e defesa.....38

2-Eficácia no bloqueio dos receptores purinérgicos P2x no NTS.....44

3-Efeito do bloqueio dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos no NTS nos ajustes cardiovasculares devido EE do Hipotálamo.....50

4-Efeito do bloqueio dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos no RVL durante a estimulação química do NTS com agonista purinérgico P2x.....57

5-Participação dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos no RVL durante a estimulação química do NTS com agonista purinérgico A2a.....64

6-Relação entre os receptores P2x no NTS e a retirada do tônus simpático nas reações de defesa.....71

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES.....87

REFERÊNCIAS BILBIOGRÁFICAS.....102

ABSTRACT.....117

RESUMO

As reações de alerta e defesa compreendem ajustes cardiovasculares proporcionando um fluxo sangüíneo muscular adequado nas situações de “luta ou fuga”. As vias centrais e os possíveis neurotransmissores envolvidos nestes ajustes permanecem ainda, em grande parte, desconhecidas. Neste estudo buscamos analisar a participação da neurotransmissão purinérgica e glutamatérgica no núcleo do trato solitário (NTS) na gênese da vasodilatação muscular durante reações de defesa e o papel das vias glutamatérgicas do NTS para o núcleo rostroventrolateral (RVL) nestas respostas. Ratos Wistar machos (250-350 g) foram anestesiados (uretana 600 mg/kg + α-chloralose 50 mg/kg, i.v.), paralisados (d-Tubocurarina, 0,5 mg/kg, i.v.) e ventilados artificialmente. Registramos a pressão arterial média (PAM), a freqüência cardíaca (FC) e o fluxo sangüíneo dos membros posteriores (FSMP). A condutância vascular dos membros posteriores (CVMP) foi determinada como a razão FSMP/PAM e expressa como percentagem do valor basal. A estimulação elétrica (EE; 150 µA; 0,6 ms; 100 Hz; 6 s) do hipotálamo lateral provocou hipertensão, taquicardia e vasodilatação nos membros posteriores. A microinjeção bilateral de suramin (100 pmol/50 nl), um antagonista não específico de receptores P2x no NTS, reduziu a vasodilatação nos membros posteriores durante a EE do hipotálamo (173$\pm$19,0 vs 28$\pm$14,1% do basal) sem alterar as respostas pressora e taquicárdica. A microinjeção do agonista P2x α,β-methylene ATP (100 pmol/50 nl) no NTS produziu hipotensão, bradicardia e vasodilatação dos membros posteriores. A microinjeção de suramin (100 pmol/50 nl) bloqueou a vasodilatação muscular (76$\pm$15,2 vs 9$\pm$2,1% do basal)

e a hipotensão (-47±4,5 vs -6±2,0 mmHg). A microinjeção de ácido quinurênico (4 nmol/50 nl), um antagonista glutamatérgico ionotrópico não seletivo no NTS bloqueou, de forma semelhante ao suramin, a vasodilatação durante a EE do hipotálamo (134±21,5 vs 27±12,7% do basal) sem alterar as respostas pressora ou taquicárdica. O bloqueio bilateral no RVL com microinjeções de ácido quinurênico reduziu intensamente a resposta hipotensora (-60±6,1 vs -9±3,7 mmHg) e vasodilatadora (126±16,9 vs 17±4,6% do basal) provocada pelas microinjeções de α,β-methylene ATP (100 pmol/50 nl) no NTS. O agonista purinérgico A2a, CGS21680 (20 pmol/50 nl) no NTS, evocou hipotensão, bradicardia e vasodilatação muscular de longa duração. O bloqueio do RVL com ácido quinurênico (4 nmol/50 nl) reduziu a hipotensão (-41±4,7 vs -7±1,9 mmHg), a bradicardia (-33±9 vs -10±3,1 bpm) e a vasodilatação nos membros posteriores (81±5,6 vs 8±1,5% do basal). Estes resultados sugerem que a vasodilatação muscular nas repostas de defesa depende da ativação de receptores P2x e receptores glutamatérgicos no NTS. Ajustes cardiovasculares por ativação dos receptores purinérgicos P2x e A2a no NTS provocam vasodilatação muscular que depende da liberação de glutamato no RVL, provavelmente ativando interneurônios inibitórios ali presentes.

INTRODUÇÃO

1-INTRODUÇÃO GERAL

A perfusão do leito vascular capilar constitui um elemento essencial da homeostasia. É através do fluxo sangüíneo percorrendo este território e das trocas aí realizadas que o interstício pode ser renovado, mantendo-se as condições ideais para a homeostasia celular. Uma vez que o gasto energético da maioria dos tecidos do organismo não é constante, mas muito variável, os mecanismos de ajustes do fluxo sangüíneo e da taxa de perfusão são essenciais para a manutenção do equilíbrio interno e das funções vegetativas básicas. Estes mecanismos e ajustes são especialmente necessários durante a emissão de comportamentos que demandem mobilização de múltiplos sistemas do organismo. Ao emitir um determinado comportamento o sistema nervoso central (SNC) mobiliza sistemas efetores que compreendem os sistemas motores, envolvidos com a ativação de musculatura esquelética, e os sistemas neurovegetativos, compreendendo a mobilização das divisões simpática e parassimpática do assim chamado sistema nervoso autônomo, do sistema respiratório e os sistemas neuroendócrinos. Os ajustes do fluxo sangüíneo constituem um dos principais componentes vegetativos, uma vez que se relacionam diretamente com a adequação da perfusão. Os ajustes do fluxo sangüíneo e da resistência vascular periférica (ou do seu inverso, i.e., a condutância vascular) se realizam essencialmente por modificações rápidas do calibre das arteríolas, i.e., de graus variáveis de vasoconstrição e vasodilatação.

Dentre as numerosas classes de comportamento emitidas pelos animais os comportamentos de alerta se destacam devido à sua relevância na proteção da vida e da integridade física do indivíduo. Os comportamentos de alerta e defesa

são fundamentais para a sobrevivência das espécies devido à capacidade de antecipar e preparar o organismo para uma situação de alta demanda física-mental, otimizando o desempenho das atitudes e respostas a serem tomadas frente a um estímulo. Embora quase que exclusivamente referidos como os comportamentos exibidos por um indivíduo frente a estímulos potencialmente lesivos ou a um agressor mais poderoso, os comportamentos defensivos provavelmente constituem um contínuo, incluindo desde o simples abanar de uma orelha ou cauda para afastar um inseto, a retração de um membro (comportamento de flexão) ou a cabeça de um agente nocivo, a esquiva ou fuga, i.e., a retração de todo o corpo destes agentes ou, ainda, manifestações verbais de desculpa, de justificativa etc (Timo-Iaria, 1985). Os assim chamados "exercícios físicos" , como o correr, nadar etc, podem também ser classificados como uma manifestação deste comportamento. Respostas ao exercício físico mobilizam todos os sistemas fisiológicos, ajustando o organismo a um maior nível de trabalho e demanda, sendo assim, com um conseqüente aumento no consumo energético e no nível metabólico. A Figura 1 representa o modelo do componente periférico desses sistemas integrados.

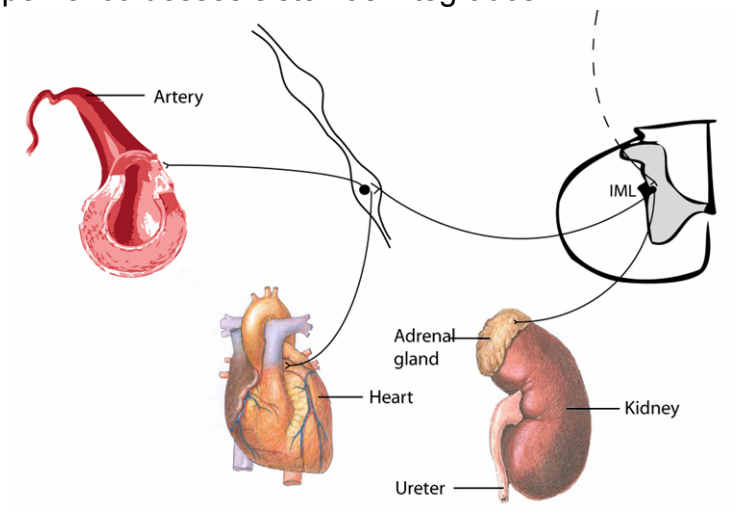


Fig 1 – Possíveis componentes periféricos envolvidos nos ajustes hemodinâmicos durante comportamentos de defesa.

Dentre os ajustes cardiovasculares característicos dos comportamentos de alerta podemos citar: os aumentos da pressão sangüínea arterial, da força e da freqüência cardíacas e do débito cardíaco. O aumento do débito cardíaco é seletivamente dirigido aos territórios musculares mobilizados, com graus variáveis de vasodilatação muscular, enquanto se observa vasoconstrição de outros territórios como, por exemplo, o leito vascular esplâncnico. As vias neurais responsáveis por estes ajustes ainda não são completamente conhecidas e tem constituído uma linha de pesquisa em nosso laboratório.

A caracterização dos ajustes vegetativos envolvidos com as reações de defesa recebeu um notável impulso a partir dos trabalhos de Hilton e colaboradores na década de 1960 (Abraham et al. 1962). Estes investigadores demonstraram que em animais anestesiados a estimulação elétrica de regiões hipotalâmicas e mesencefálicas provocava ajustes cardiovasculares compatíveis com aqueles descritos nas reações de alerta e defesa, i.e., aumento transitório da pressão arterial, taquicardia, intensa vasodilatação muscular esquelética e vasoconstrição mesentérica. Em animais despertos a estimulação destas mesmas áreas também provocava ajustes motores como rosnados, grunhidos, abaixamentos do corpo etc. Desenvolvendo técnicas de registro crônico de fluxo sangüíneo e pressão arterial, estes autores puderam demonstrar o caráter concomitante e integrado destas reações motoras e vegetativas, demonstrando finalmente que os comportamentos de alerta eliciados pela estimulação destas regiões eram semelhantes àqueles obtidos naturalmente por estimulação auditiva, visual ou táctil (Abraham et al., 1962).

Posteriormente, Yardley e Hilton (1987) propuseram que, no rato, a estimulação elétrica hipotalâmica desencadeava uma resposta vasodilatadora em membros posteriores. Segundo estes autores, nestes animais, a vasodilatação muscular observada era devido à combinação da redução do tono vasoconstritor simpático e a vasodilatação induzida pela secreção de catecolaminas circulantes agindo em receptores β_2-adrenérgicos. Todavia, estes estudos demonstraram ainda que uma resposta vasodilatadora dos membros posteriores podia ser observada mesmo após a combinação de adrenalectomia bilateral e administração sistêmica de um antagonista α_1 adrenérgico sugerindo a existência de outros mecanismos capazes de promover vasodilatação muscular.

Evidências experimentais obtidas nos últimos anos (Possas & Lewis, 1997, Davisson et al., 1994, 1997) sugerem o envolvimento de um terceiro mecanismo, já citado, durante a vasodilatação muscular nos comportamentos de alerta. Este mecanismo parece envolver a liberação de NO nos terminais nervosos ou compostos nitrosilados contendo NO em sua estrutura química (Davisson et al., 1994, 1997).

Estudos anteriores demonstraram a presença da enzima óxido nítrico sintase (NOS), responsável pela síntese e liberação de NO, em neurônios pré-ganglionares e em fibras pós-ganglionares da cadeia simpática lombar de ratos. Nesses neurônios simpáticos a NOS é sintetizada no corpo celular e transportada anterogradamente aos botões terminais por sistemas de transporte axonal (Davisson et al., 1997). A estimulação elétrica da cadeia simpática lombar com baixas freqüências provoca uma vasodilatação do membro posterior, a qual pode

ser abolida pela administração sistêmica de 7-nitroindazole (7-ni), um inibidor específico da NOS neuronal (Davisson et al., 1997).

O bloqueio da NOS neuronal pela administração sistêmica de 7-ni abole a vasodilatação dos membros posteriores induzida pela estimulação elétrica de aferentes dos baroceptores no nervo laríngeo superior (Possas & Lewis, 1997). Resultados prévios do nosso laboratório indicam que a vasodilatação muscular nos membros posteriores em ratos anestesiado induzida por estimulação elétrica hipotalâmica é abolida após a combinação de adrenalectomia bilateral e infusão sistêmica de fentolamina, seguido pela administração sistêmica de L-NAME, um antagonista competitivo da NOS neuronal e endotelial (Ferreira-Neto et al., 2005). Essas evidências sugerem uma vasodilatação muscular a qual depende de três componentes: 1) a retirada do tônus vasoconstritor simpático, 2) a liberação de catecolaminas pela medula da adrenal e 3) a liberação de óxido nítrico e fatores nitrozilados nas terminações nervosas; conforme mostra a Figura 2.

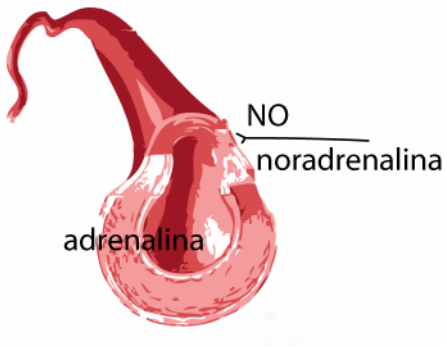


Fig 2 – Possíveis componentes presentes na vasodilatação durante reações de alerta e defesa.

Finalmente, Davisson et al (1994) demonstraram que, em ratos acordados, a vasodilatação em membros posteriores, durante reações de alerta produzidas pela aplicação de um jato de ar na região do focinho, era abolida após a administração sistêmica de hexametônio (um antagonista nicotínico ganglionar) ou

após L-NAME, sugerindo a dependência da vasodilatação e a ativação de fibras simpáticas pós-ganglionares e a síntese de NO (Colombari et al., 1998).

O conjunto destes estudos sugere a existência de uma via nitrérgica capaz de modular a resistência / condutância vascular dos membros posteriores, capaz de ser ativado durante ajustes reflexos homeostáticos, como os associados aos reflexos baroceptores, mas também durante a vasodilatação muscular de autênticas reações de alerta / defesa.

2-O NÚCLEO ROSTROVENTROLATERAL (RVL)

A circuitaria responsável pelos mecanismos de vasodilatação acima descritos envolve a integridade de regiões responsáveis pela regulação neurovegetativa no SNC, dentre essas áreas destacamos alguns núcleos localizados no tronco cerebral capazes de se projetarem para a medula espinal e para algumas regiões do diencéfalo.

A partir dos estudos de Feldberg e Guertzeinstein (1976) sobre a localização das áreas bulbares responsáveis pela manutenção do tono vasomotor e da pressão artérial, Reis e colaboradores (Ross et al., 1984) demonstraram uma notável coincidência entre estas áreas e a localização do grupo C1 de neurônios adrenérgicos em ratos. Baseados nas características funcionais, na presença dos neurônios adrenérgicos, nas projeções à coluna intermédio lateral (IML) e na hodologia desta área, Reis e colaboradores propuseram a existência de uma nova entidade anatômica que foi denominada *nucleus reticularis rostroventrolateralis* ou *núcleo reticular rostroventrolateral (RVL).* (Ross et al., 1984).

Evidências experimentais obtidas nos últimos trinta anos demonstraram que o RVL constitui a principal fonte de excitação tônica de neurônios simpáticos pré-ganglionares na IML. Anatomicamente, neurônios bulbo-espinais do RVL projetam-se diretamente e monosinapticamente a neurônios simpáticos pré-ganglionares estabelecendo sinapses excitatórias. Estudos utilizando técnicas eletrofisiológicas demonstraram no RVL a presença de neurônios cuja atividade é sincronizada com o ciclo cardíaco e cuja descarga precede, sistematicamente, a descarga de neurônios simpáticos pré-ganglionares e a atividade simpática em fibras pós-ganglionares cardíacas e vasomotoras (Brown & Guyenet, 1984, 1985; Morrison & Reis, 1989). Diversas evidências experimentais suportam a hipótese de que o L-glutamato constitua o neurotransmissor preferencial em rápidas sinapses excitatórias entre o RVL e neurônios simpáticos pré-ganglionares na IML (Morrison et al., 1991; Morrison et al., 1989).

Os neurônios do RVL são os responsáveis pela atividade simpática ao coração, vasos e da medula da adrenal (revisão em Dampney, 1994, Guyenet, 2006). O RVL constitui o braço eferente final comum de diversos ajustes cardiovasculares incluindo os ajustes reflexos provocados pela estimulação de aferentes dos baroceptores (Granata et al., 1983, 1985), quimioceptores (De Paula & Machado, 2001) e na resposta isquêmica cerebral (Sun et al., 1992). O RVL parece constituir ainda a via eferente das respostas pressoras e de ajustes hemodinâmicos provocadas pela estimulação elétrica do nervo ciático ou provocados pela estimulação da contração muscular (Stornetta et al., 1989; Morrison et al, 1989; Possas et al., 2001; Bauer et al. 1989, Cravo et al. 2003).

Estudos anteriores demonstraram que em ratos anestesiados a possível participação do RVL em ajustes cardiovasculares presentes durante a estimulação elétrica de aferentes cutâneos e musculares. A estimulação desses aferentes provoca aumento transitório da pressão arterial (Kiely & Gordon, 1994), taquicardia e vasodilatação do membro estimulado. (Possas et al., 2001). Estes ajustes são integrados no RVL contralateral ao sítio de estimulação. Além disto, foi possível demonstrar que no RVL sinapses glutamatérgicas medeiam a resposta pressora à estimulação nociceptiva, enquanto a vasodilatação muscular depende de sinapses GABAérgicas.

Em um estudo posterior Cravo et al (2003) buscaram determinar a participação do RVL na vasodilatação muscular durante o alerta induzido pela estimulação hipotalâmica. Os resultados obtidos neste estudo demonstraram que no rato a vasodilatação muscular parece envolver pelo menos três mecanismos: 1) a redução do tono vasoconstrictor simpático, 2) a secreção de catecolaminas pela medula da adrenal e 3) um mecanismo dependente da síntese/liberação de NO. Essa vasodilatação muscular obtida era completamente abolida após o bloqueio dos receptores glutamatérgicos no RVL, por microinjeção bilateral de ácido quinurênico, um antagonista glutamatérgico ionotrópico não-seletivo. Estes resultados confirmaram e expandiram os resultados anteriores, indicando o papel fundamental do RVL na vasodilatação durante as reações de alerta. A interação das projeções purinérgicas e dos receptores glutamatérgicos localizados nesse núcleo envolvidos nesta resposta, todavia, permanece desconhecido.

3-OS NUCLEOS DO TRATO SOLITÁRIO (NTS)

Localizado na região dorso-medial do tronco cerebral, os núcleos do trato solitário (NTS) recebem projeções de diversas regiões do SNC e integram informações vegetativas contribuindo para a regulação homeostática de diversos sistemas como o respiratório e o cardiovascular (Ciriello et al., 1994). No sistema cardiovascular, o NTS possui um papel de extrema importância para os ajustes de perfusão tecidual compreendendo a pressão arterial (Colombari et al., 1996) e o fluxo sangüíneo em diversos territórios (Dias e Colombari, 2006).

O NTS tem conexões diretas com numerosas estruturas do tronco cerebral e diencéfalo envolvido na regulação cardiovascular como, por exemplo, a área e defesa hipotalâmica correspondente ao hipotálamo lateral (Mifflin et al., 1988; Silva Carvalho et al., 1995; Rocha et al., 2003), o RVL (Meeley et al., 1985), para a região caudoventrolateral do bulbo, a área parabraquial e o núcleo paraventricular do hipotálamo (Hermes et al., 2006; Ruggiero et al., 1990).

O NTS também é integrante das vias centrais controladoras da condutância vascular no território muscular. Há muito tempo sabe-se que lesão do NTS provoca hipertensão neurogênica muitas vezes fulminante, com falência ventricular esquerda e edema agudo de pulmão (Talman et al., 1981). A estimulação do NTS por microinjeções de agentes excitatórios como o L-glutamato provoca respostas cardiovasculares complexas que dependem de diversos fatores como o uso de anestésicos e/ou a sub-região do NTS estimulada (Sapru, 2002; Colombari, 1996). Em animais anestesiados a estimulação das porções intermediárias do NTS provoca um padrão de respostas caracterizadas por hipotensão, bradicardia e vasodilatação muscular (Foley et al., 1998; Canesin et

al., 2000). Em animais não anestesiados, a microinjeção destas mesmas áreas provoca ajustes bifásicos na pressão arterial, caracterizando uma hipotensão rápida e curta, seguida de hipertensão (Colombari et al., 1998; Dias et al., 2001). Quanto à resistência vascular dos membros posteriores, a estimulação do NTS nestas condições provoca vasoconstrição inicial, seguida por uma intensa vasodilatação no trem posterior. A vasodilatação muscular obtida parece conter um componente dependente de NO, uma vez que ela é abolida após a administração sistêmica de L-NAME (Colombari et al.,1998). No NTS a vasodilatação muscular pode ser obtida pela estimulação seletiva de receptores glutamatérgicos do subtipo não–NMDA (Dias et al., 2001). O bloqueio farmacológico com a microinjeção de L-NAME no NTS reduziu ajustes cardiovasulares de pressão arterial, freqüência cardíaca e atividade simpática renal em resposta à estimulação de receptores NMDA e não NMDA (Dias et al., 2005). Estes resultados demonstram a possibilidade da ativação, a partir do NTS, de vias vasodilatadoras da musculatura esquelética nos membros posteriores (Dias e Colombari, 2006).

Estas vias do NTS são partes integrantes dos circuitos neurais de regulação reflexa cardiovascular, porém é muito provável o seu envolvimento nos ajustes cardiovasculares durante a emissão de comportamentos defensivos. Trabalhos utilizando ratos já demonstraram a participação de neurotransmissores como a serotonina (5HT) provenientes de neurônios da área de defesa hipotalâmica (HDA) sobre o NTS inibindo o barorreflexo (Sevóz-Couche et al., 2003) e facilitando o quimiorreflexo (Rocha et al., 2003). Diversos estudos anteriores com gatos demonstraram uma relação da ativação nas áreas de defesa hipotalâmica

sobre o NTS, o barorreflexo e o quimiorreflexo (Spyer et al., 1997; Silva-Carvalho et al., 1995; Mifflin et al., 1988).

4-RECEPTORES PURINÈRGICOS

Nas últimas décadas novas formas de comunicação celular foram descobertas e diversas substâncias tiveram novas propriedades identificadas. Os efeitos do ATP juntamente com seus compostos derivados têm sido documentados em estudos envolvendo desde uma célula *in vitro* até mesmo respostas fisiológicas em todo o organismo (Ralevic & Burnstock, 1998; Ralevic et al., 1999). Os receptores para as purinas podem ser encontrados ao longo de todo organismo em diversos sistemas envolvidos com a contração da musculatura lisa, na secreção exócrina e endócrina, na resposta imune, na resposta inflamatória, na agregação plaquetária, na dor, na modulação cardiovascular entre todas outras mais. Sabe-se hoje que o ATP e a adenosina (seu principal catabólito) (Fig 3) podem também atuar como neurotransmissores, neuromoduladores e até mesmo como cotransmissores nas sinapses dos sistemas nervoso central e periférico (Burnstock, 1999, 2004).

O possível papel do ATP e seus derivados como neurotransmissores em transmissões nervosas purinérgicas foi primeiramente relatado na literatura em 1972 por Burnstock (Burnstock, 1972) descrevendo receptores específicos para estes compostos primariamente no sistema nervoso periférico e em seguida outros autores inferiram a participação desses receptores no sistema nervoso central (Wu & Phillis, 1976). Dentre as classes de receptores purinérgicos os receptores P1 para adenosina podem ser subdivididos em A1, A2a, A2b, e A3;

funcionando por meio de um acoplamento com a proteína G. Em contrapartida os receptores P2 para ATP se dividem em duas famílias: P2x (ionotrópicos) e P2y (metabotrópicos). Nos mamíferos temos o espectro P2x variando com sete subtipos ($P2x_{1-7}$) e os P2y com cinco subtipos ($P2y_1$, $P2y_2$, $P2y_5$, $P2y_6$, $P2y_{11}$,) (Ralevic & Burnstock, 1998; Burnstock 1999).

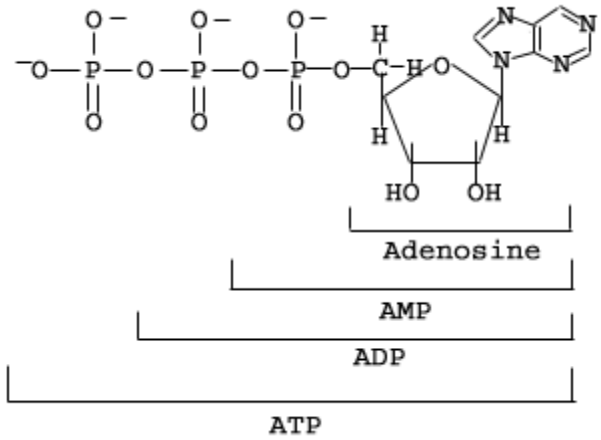


Fig 3 – Representação esquemática da molécula de adenosina e adenosina tri-fosfato.

Estudos envolvendo métodos autorradiográficos no sistema nervoso central demonstraram alta distribuição dos receptores purinérgicos A1(St Lambert et al., 1996; Carretiero & Fior-Chadi, 2004), A2a (Thomas et al., 2000) e P2x (Kanjhan et al., 1999; Tuayu et al., 1997) ao longo do tronco cerebral e principalmente no NTS de ratos. Estes subtipos de receptores estavam densamente distribuídos em núcleos responsáveis pela regulação cardiovascular localizados nas superfícies ventral e dorsal do bulbo de ratos.

Foi demonstrado que os receptores A1 no NTS possuem funções importantes no componente hipertensor durante os ajustes hemodinâmicos evocados pela estimulação elétrica do hipotálamo em ratos anestesiados. St Lambert et al (1996) observaram que a administração do antagonista DPCPX para receptores A1 na porção posterior do IV ventrículo reduzia a hipertensão

decorrente da estimulação hipotalâmica. Estes mesmos autores realizaram cortes seriados *in vitro* utilizando troncos cerebrais de ratos marcados com [^{3}H]DPCPX, estas marcações indicaram alta densidade desses receptores nas imediações dos núcleos RVL e NTS.

Ainda estudando subtipos de receptores para adenosina, utilizando o antagonista [^{125}I]ZM241385 para receptores do subtipo A2a, Thomas e colaboradores (2000) demonstraram a distribuição desses receptores no tronco cerebral de ratos. Os sítios que apresentaram receptores com alta afinidade foram os territórios rostrais do NTS e do RVL, o NTS comissural e o núcleo dorsal motor do vago possuíam níveis intermediários de afinidade, finalmente baixos níveis de afinidade foram encontrados nas mediações caudais do NTS e no núcleo caudoventrolateral (CVL). O bloqueio do subtipo de receptor A2a com a microinjeção do antagonista ZM241385 não alterou os níveis basais de pressão arterial e freqüência cardíaca. Durante a estimulação do nervo aórtico depressor ipsilateral houve uma diminuição da resposta bradicárdica enquanto a resposta hipotensora e a redução da atividade do nervo frênico permaneceram inalteradas, tendo-se concluído que os receptores A2a podem participar nos ajustes do barorreflexo.

Por sua vez os receptores purinérgicos P2x para ATP também estão presentes em diversas regiões ao longo do tronco encefálico e da medula espinal (Tuyau et al., 1997; Kanjhan et al., 1999; Yao et al., 2001). Através da marcação imuno-histoquímica por meio de anticorpos P2x2R96ab projetados para se ligarem às proteínas dos receptores ionotrópicos P2x2, Kanjhan e colaboradores (1999) notaram uma intensa marcação desses receptores na região do RVL, porém

ocorrendo de forma moderada quando toda extensão da região C1 de neurônios catecolaminérgicos era analisada. O núcleo ambíguo apresentou níveis relativamente baixos, enquanto a região reticular caudoventrolateral do bulbo apresentou a maior expressão. Outros dois núcleos bulbares que apresentaram forte marcação imunoistoquímica foram o NTS e o núcleo dorsal motor do vago.

A transmissão purinérgica possui papel fundamental na regulação cardiovascular, estando envolvida com ajustes da pressão arterial, da freqüência cardíaca e do fluxo sangüíneo muscular. Como já foi demonstrado, os receptores purinérgicos estão densamente presentes em neurônios dos núcleos vasomotores na medula oblongata e a ativação química de seus subtipos evoca ajustes reflexos e comportamentais característico. É plausível que esses receptores estejam envolvidos nos ajustes reflexos de baroceptores, quimoceptores e até mesmo nas reações de defesa hipotalâmica.

A estimulação dos receptores A1 no NTS comissural, por microinjeção de adenosina, provoca uma hipertensão de longa duração sem alterar os níveis basais de freqüência cardíaca. Em ratos acordados, De Paula e Machado (2001) tentaram bloquear a resposta hipertensora do quimioreflexo induzida pela infusão sistêmica de cianeto de potássio (KCN). Após a microinjeção do antagonista A1 ,DPCPX, em sítios do NTS comissural e intermediário, o aumento transitório da pressão arterial pela infusão de KCN não sofreu alterações significativas. Num estudo prévio de Barraco e Phillis (1991) com ratos anestesiados, a microinjeção do agonista A1, CPA, provocou ajustes pressores similares aos dados observados por De Paula e Machado (2001), a microinjeção do antagonista DPCPX bloqueou

esses ajustes demonstrando ser um fármaco eficaz para o bloqueio de receptores A1.

Os receptores purinérgicos no NTS participam em importantes ajustes cardiovasculares além de participar nos ajustes pressores por meio dos receptores A1. A vasodilatação muscular e a regulação do fluxo sangüíneo muscular possuem importantes papéis entre os ajustes cardiovasculares reflexos nos ratos e outros receptores purinérgicos contribuem significantemente para estas respostas. Dentre as categorias dos receptores purinérgicos os subtipos relacionados com as respostas de vasodilatação e aumentos do fluxo sangüíneo são os ionotrópicos P2x para ATP e o subtipo metabotrópico A2a para adenosina.

A ativação química dos diferentes tipos de receptores purinérgicos em determinadas regiões do NTS é capaz de evocar variados padrões de vasodilatação e vasoconstrição característicos em diversos leitos vasculares nos ratos anestesiados. Mensurando a pressão arterial, a freqüência cardíaca, o fluxo sangüíneo mesentérico, fluxo sangüíneo renal e o fluxo sangüíneo ilíaco, assim como suas respectivas condutâncias, Barraco et al (1996) demonstraram que a ativação dos receptores A2a no NTS provoca hipotensão, bradicardia e vasodilatação do território iliaco muscular prolongados. A estimulação química excitatória dos receptores P2x nos mesmos sítios do NTS também demonstrou hipotensão, bradicardia e vasodilatação ilíaca, porém em associação com vasodilatação mesentérica e renal por períodos breves.

A excitação química de receptores A2a na região subpostremal do NTS gera uma prolongada hipotensão, bradicardia e uma vasodilatação em território ilíaco com aumento do fluxo sangüíneo do trem posterior de ratos a qual

permanece em média por 30 minutos, padrão que foi observado por Barraco e colaboradores (1996). Kitchen et al (2000) demonstraram que essa vasodilatação, conseqüente da estimulação dos receptores A2a no NTS, parece estar intimamente relacionada com a liberação de catecolaminas pela medula da adrenal. Esses autores realizaram bloqueios adrenérgicos com a administração sistêmica de propanolol e com adrenalectomia bilateral, abolindo a vasodilatação para os membros posteriores induzida pela microinjeção do agonista A2a CGS21680 em regiões comissurais do NTS. Vários autores concluíram que a estimulação dos receptores A2a no NTS aumenta a atividade nervosa simpática para a adrenal enquanto diminui a atividade nervosa simpática renal e não modifica a atividade nervosa simpática do segmento lombar (Scislo et al 1998, Kitchen et al 2000).

Na mesma região do NTS, quando ativados quimicamente os receptores P2x produzem hipotensão (Ergene et al., 1994), bradicardia (Scislo et al., 1998b) e vasodilatação significativa nos territórios de membros posteriores, mesentérico e renal (Barraco et al., 1996). Comparando os componentes de débito cardíaco e resistência vascular periférica o estudo de Kitchen et al (2001) provou por meio do registro da pressão arterial, da freqüência cardíaca e da implantação de um fluxômetro Doppler na aorta ascendente, que a hipotensão está principalmente relacionada com a redução da resistência periférica total e não pela redução do débito cardíaco.

Ergene et al (1994) demonstraram que a ativação de receptores P2x no NTS subpostremal era capaz de evocar uma resposta hipotensora através da microinjeção do agonista ionotrópico α,β-methylene ATP para receptores P2x,

para comprovar a participação desses receptores esses autores microinjetaram no NTS seu respectivo antagonista suramin na dose de 500 pmol bloqueando a resposta hipotensora pelo α,β-methylene ATP. Já este mesmo grupo de pesquisadores em 1998 (Scislo et al., 1998b) realizou o bloqueio desses mesmos receptores com suramin no NTS, durante a bradicardia evocada nas respostas do barorreflexo. A microinjeção de suramin na dose de 500 pmol, nas mediações do NTS, bloqueou os ajustes da freqüência cardíaca decorrentes do barorreflexo induzido pela infusão de fenilefrina e de nitroprussiato de sódio. Paton e colaboradores (2002) propuseram uma nova dose de suramin, 100 pmol, para o bloqueio dos receptores P2 no NTS, demonstrando que essa dose era capaz e bloquear a resposta bradicárdica induzida pela microinjeção de α,β-methylene ATP sem bloquear receptores glutamatérgicos testados pela microinjeção de agonistas NMDA e não NMDA.

A vasodilatação em território ilíaco foi induzida pela microinjeção de αβ-MeATP na região do NTS subpostremal. Esta resposta vasodilatadora possui um pico de resposta máxima maior quando comparado a vasodilatação decorrente da estimulação dos receptores A2a. Embora esta variação máxima de condutância vascular seja maior, sua duração permanece por um período mais curto diferentemente dos ajustes hemodinâmicos em virtude da estimulação química dos receptores A2a no NTS onde foram observadas vasodilatações com durações de aproximadamente 20 minutos (Barraco et al., 1996). Estes padrões de respostas vasodilatadoras descrito acima decorrem de uma simpatoinibição em todos esses territórios (Scislo et al., 2001). Esses ajustes são acompanhados de redução da freqüência cardíaca, muito semelhante aos padrões observados no

barorreflexo e na estimulação dos receptores glutamatérgicos da mesma região (Scislo et al., 1998b). Scislo e O´Leary observaram, por microinjeção de ácido quinurêncio no NTS, que o bloqueio dos receptores glutamatérgicos no NTS comissural abolindo os ajustes cardiovasculares induzidos pela microinjeção do agonista P2x α,β-methylene ATP no mesmo local. Segundo esses autores os receptores purinérgicos P2x estão possivelmente atuando como co-transmissor do glutamato ou por meio da ativação de interneurônios glutamatérgicos localizados no próprio NTS (Scislo et al., 2000).

Como pudemos observar os receptores purinérgicos A2a e P2x no NTS estão intimamente ligados aos fenômenos de vasodilatação em diversos territórios. Os receptores A1, também localizados no NTS, estão vinculados aos ajustes de aumento da pressão arterial. Curiosamente as reações de alerta e defesa são altamente conhecidas por esses padrões de ajustes hemodinâmicos com hipertensão e intensa vasodilatação muscular.

A ativação química dos receptores A1 localizados no NTS comissural provoca um aumento transitório da pressão arterial de longa duração (Philis et al., 1997; Barraco & Philis, 1991, Spyer & Thomas, 2000) Scislo e colaboradores (2001) observaram que o aumento da pressão arterial era acompanhado de simpatoexcitação nos territórios lombar, adrenal e renal. A administração de DPCPX, um antagonista para receptores A1 em diversas doses, na porção posterior do quarto ventrículo foi capaz de diminuir os componentes primário e secundário da resposta hipertensora durante a estimulação elétrica da HDA, demonstrando a participação dos receptores A1 nas reações de alerta e defesa (St Lambert et al., 1996, 1994).

Durante as reações de alerta e defesa St Lambert et al (1997) demonstraram que o ATP liberado no meio extracelular na região comissural do NTS e no RVL, durante a estimulação elétrica do hipotálamo, é catabolizado em adenosina pela enzima 5´-ectonucleotidase sendo assim capaz de estimular os receptores purinérgicos do subtipo A1 nessas regiões. A inibição da 5´-ectonucleotidase por meio de α,β-meADP no NTS comissural, impedindo dessa forma a catabolização do ATP em adenosina, foi capaz de bloquear parcialmente a resposta hipertensora na sua fase primária, ou seja, durante o período de estimulação. O mesmo bloqueio, quando realizado no RVL, aboliu a segunda fase da resposta hipertensora que se desenvolve nos momentos seguintes à estimulação elétrica (St Lambert et al., 1997, Spyer & Thomas, 2000). Esses dados corroboram para indicar o papel fundamental dos receptores A1 e conseqüentemente da rápida liberação de adenosina nas mediações do NTS comissural em meio às respostas pressoras do alerta.

Dale et al (2002) também estudaram a participação da rápida liberação de adenosina nos receptores A1 do NTS comissural, nas respostas hipertensoras em ratos durante a estimulação da área de defesa hipotalâmica. Pela implantação de um transdutor no NTS de ratos anestesiados, eles foram capazes de quantificar um rápido aumento do nível de adenosina liberado no meio extracelular assim como de seus metabólitos no NTS. Esses autores observaram que a maior liberação de adenosina ocorria em torno de 0,2 a 0,7 mm rostral ao *calamus scriptorius*. A quantidade de adenosina liberada no NTS nesses sítios em resposta à EE da HDA tem se demonstrado mais que suficiente para saturar os receptores

A1 contribuindo nas primeiras fases do alerta. Os locais onde se encontrou maior liberação de adenosina coincidem com os sítios aferentes dos baroceptores, sendo assim, o aumento da liberação de adenosina poderia excitar uma via quimioceptora e inibir a via baroceptora a qual seria responsável pelo aumento da pressão arterial provocada pela EE hipotalâmica.

A rápida liberação de adenosina (proveniente do ATP extracelular) demonstrou ser um componente importante nas reações de alerta e defesa, colaborando para os ajustes pressores por intermédio da ativação de receptores A1. Sabemos que a estimulação elétrica do hipotálamo produz ajustes cardiovasculares com hipertensão, taquicardia e intensa vasodilatação muscular. Outra observação importante é que existem comunicações da HDA para o NTS e a ativação de receptores purinérgicos presentes no NTS, dos subtipos A2a e P2x, estão diretamente relacionados com respostas de vasodilatação muscular.

Em conjunto os resultados até aqui discutidos permitem sugerir a hipótese de que vias purinérgicas do NTS constituam parte das vias centrais envolvidas com a vasodilatação muscular dos comportamentos de alerta e defesa, e que esta vasodilatação seja possivelmente mediada pela interações com o RVL. No NTS a participação dos receptores purinérgicos e sua interação com receptores glutamatérgicos de outras regiões do sistema nervoso, envolvido nas respostas vasodilatadoras, ainda permanecem desconhecidas.

HIPÓTESE & OBJETIVOS

HIPÓTESE:

A vasodilatação muscular nas reações de alerta e defesa, provocadas pela estimulação elétrica da área de defesa hipotalâmica, dependeria da presença de ATP extracelular e da conseqüente ativação de receptores purinérgicos do subtipo P2x nas mediações do NTS intermediário. Quando ativados, os receptores do subtipo P2x e A2a presentes no NTS provocariam vasodilatação devido a uma excitação de neurônios do RVL por meio de sinapses glutamatérgicas. A vasodilatação em trem posterior de ratos anestesiados, provocada pela ativação de receptores P2x no NTS, estaria relacionada preferencialmente com a retirada do tônus vasoconstritor simpático.

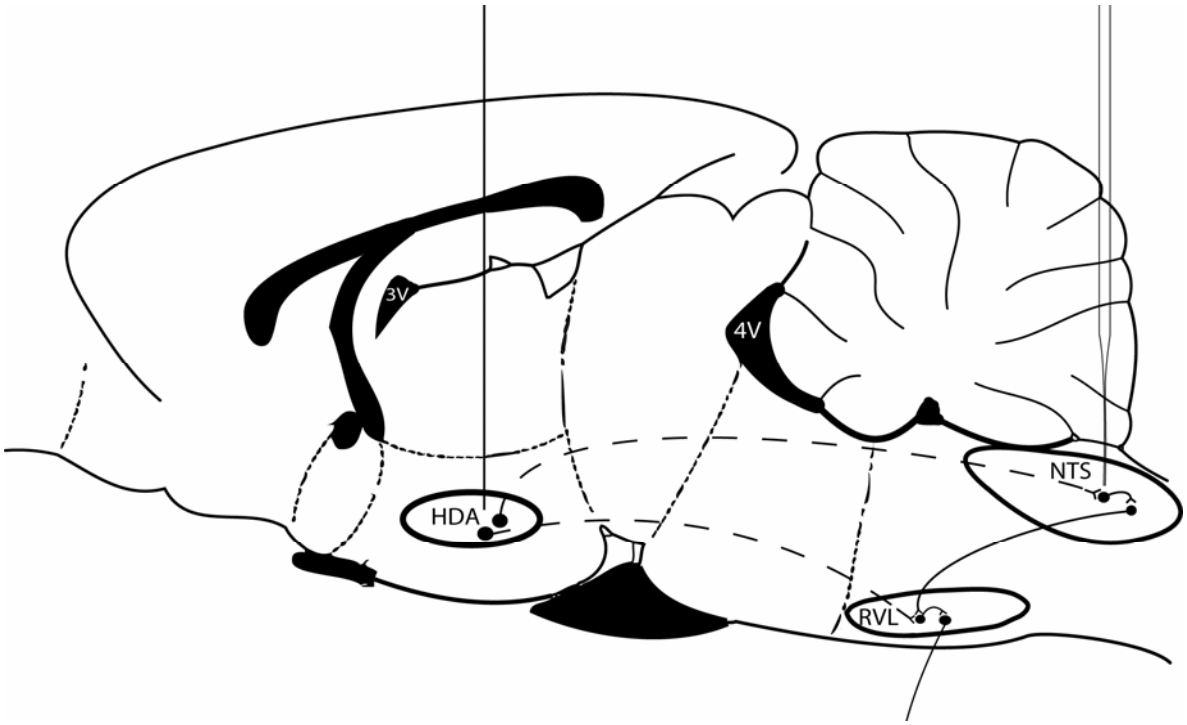


Fig 4 – Modelo experimental proposto para o estudo das vias centrais envolvidas com as reações de alerta e defesa.

OBJETIVOS:

1. Caracterizar a função dos receptores purinérgicos P2x do NTS na regulação da vasodilatação muscular em membros posteriores de ratos durante as reações de alerta, promovido pela estimulação elétrica da área de defesa hipotalâmica.

2. Estudar a interação entre NTS e o núcleo RVL por meio de projeções glutamatérgicas nos ajustes cardiovasculares ativados pela estimulação de receptores purinérgicos no NTS.

3. Verificar a participação dos receptores purinérgicos P2x no componente de retirada do tônus simpático vasoconstritor durante a vasodilatação muscular presente nas reações de alerta e defesa.

MÉTODOS

1-PROCEDIMENTOS GERAIS:

Todos os experimentos foram realizados em ratos adultos machos Wistar (250-350 g, N=32), fornecidos pelo Biotério Central da Escola Paulista de Medicina (CEDEME). Após indução da anestesia com Halotano (3% em O_2 100%) e canulação da veia jugular, todos os animais foram anestesiados com Uretana, (0,6 g/kg, i.v.) e α–cloralose (50 mg/kg, i.v.). A traquéia foi canulada para redução da resistência das vias aéreas e ventilação artificial. Os animais foram paralisados com d-tubocurarina (0,5 mg/kg, i.v.) e ventilados artificialmente em ar ambiente (7025 Rodent Ventilator – UGO BASILE) com volume corrente de 0,6 ml/100 g de peso corporal e freqüência de 70 a 90 ciclos por minuto. A temperatura retal foi mantida em 37,5±0,5 ^{o}C por meio de uma mesa aquecida (Figura 5).

Fig 5 – Cateterizações e traqueostomia. Abaixo na foto da esquerda para a direita: cateterização da veia jugular, traqueostomia e cateterização da artéria carótida comum (setas em preto).

A pressão arterial pulsátil (PAP) foi registrada a partir da canulação na artéria carótida direita com tubos de polietileno (PE-50) preenchidas com solução fisiológica heparinizada, conectados a um transdutor de pressão acoplado a um amplificador (ETH-2000CB SCIENCES INC) e a um sistema de aquisição e análise de dados (PowerLab, ADInstruments).

A pressão arterial média (PAM) e a freqüência cardíaca (FC) foram obtidas simultaneamente a partir de derivações do sinal de PAP. A PAM foi calculada a partir do registro da pressão arterial pulsátil com a fórmula: PAM = PAdiastólica + 1/3 (PAsistólica - PAdiastólica).

O fluxo sangüíneo muscular ao trem posterior (FSMP) foi mensurado com fluxometria por tempo de trânsito (Transonic) através de uma sonda miniaturizada colocada ao redor da porção final da aorta abdominal (Figura 6), imediatamente acima da bifurcação das artérias ilíacas. A media da condutância vascular do trem posterior (CVMP) foi calculada através da razão do sinal de fluxo sobre o sinal da PAM. Variações percentuais do fluxo sangüíneo do trem posterior e da condutância vascular foram expressas como % do valor basal e calculadas pelas fórmulas:

$$\Delta F\% = (F_{final}-F_{inicial})/F_{inicial} \times 100\%$$

$$\Delta C\% = (C_{final}-C_{inicial})/C_{inicial} \times 100\%$$

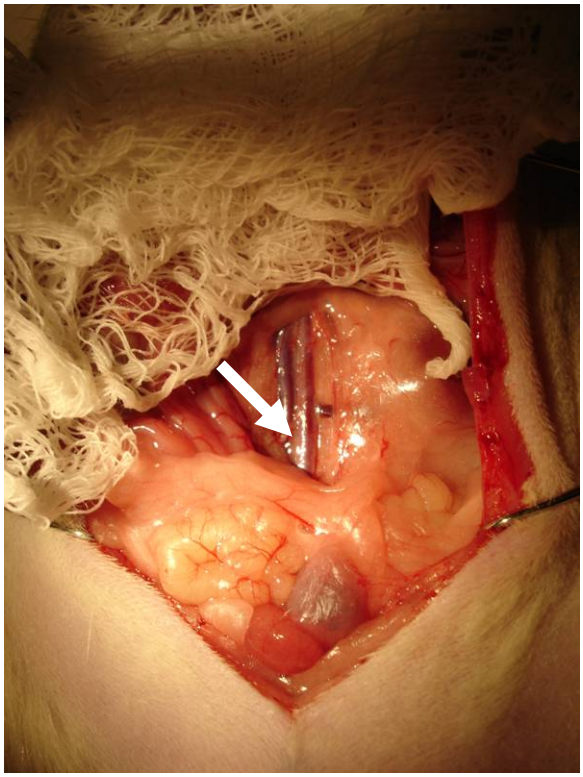


Fig 6 – Região para implantação da sonda na artéria aorta abdominal inferior (seta branca).

Para a estimulação elétrica (EE) da área de defesa hipotalâmica (HDA), os animais foram fixados em um aparelho estereotáxico com a barra nasal fixada a 3,4 mm abaixo da linha interaural. Após os animais serem fixados, foi feito uma incisão longitudinal da pele da cabeça e tecido subcutâneo. Determinado o lócus de introdução dos eletrodos utilizando como referência o Bregma, em seguida realizou-se a trepanação do crânio utilizando-se para isto uma broca odontológica. Perfuramos discretamente a dura-máter com uma agulha hipodérmica para facilitar a introdução do eletrodo, certificando que este incidisse perpendicularmente.

Para a realização das microinjeções no RVL e no NTS utilizamos a barra nasal posicionada a 11 mm abaixo da linha interaural, após a fixação da cabeça

no aparelho estereotáxico, a musculatura posterior da região cervico-occiptal foi retirada expondo o osso occiptal e a membrana atlanto-occiptal. Esta membrana foi seccionada e rebatida expondo o *calamus scriptórus* (CS), o qual utilizamos como referência para as coordenadas estereotáxicas nas microinjeções.

2-ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA DO HIPOTÁLAMO

Os ajustes vegetativos das reações de alerta e defesa foram provocadas pela estimulação elétrica de sítios específicos da região hipotalâmica perifornical com eletrodos bipolares concêntricos (1 mm de diâmetro externo) conectados a um estimulador (Grass) com pulsos quadrados de 0,6 ms de duração, 100 Hz de freqüência e intensidade de 150 μA por 6 s. As coordenadas utilizadas (AP 2,8 a 4,3 mm caudal ao bregma; ML 0,5 a 2,5 mm lateral ao bregma; DV -8,0 a -9,5 mm ventral à dura-máter) tinham como referência o Atlas de Paxinos e Watson (1997). Nestes experimentos pretendíamos explorar sistematicamente estas regiões e estabelecer os sítios capazes de promover respostas de aumento da PA, freqüência cardíaca e vasodilatação muscular.

3-MICROINJEÇÕES NO RVL E NTS

As microinjeções foram realizadas através de um sistema pneumático de pressão (Picospitzer) utilizando-se capilares de vidro com diâmetro interno de (0,5 mm). Os capilares foram estirados (Vertical Peipette Puller – MOD 700C) e as pontas ajustadas a um diâmetro final de 30 a 50 μm. O volume injetado (50 nL) fora controlado pelo deslocamento do menisco no interior da pipeta, através de um

microscópio cirúrgico (DF-Vasconcelos / M-900) dotado de um retículo graduado em uma das lentes oculares.

As microinjeções serão feitas nas seguintes coordenadas:

Núcleo rostroventrolateral (RVL)

AP: 2,5 a 2,7 mm rostral ao CS; ML: 1,9 a 2,1 mm lateral ao CS; DV: 2,5-2,6 mm ventral ao CS.

Núcleo do Trato Solitário (NTS)

As microinjeções serão feitas nas seguintes coordenadas:

AP: 0,5 a 0,8 mm rostral ao CS; ML: 0,5 mm lateral ao CS; DV: 0,3 mm ventral ao CS.

4-HISTOLOGIA

Ao final de cada experimento os sítios de estimulação elétrica no hipotálamo foram marcados por lesões eletrolíticas (DC, 500 µA – 1 mA, 20 s), já os sítios de microinjeção no RVL e no NTS foram marcados pela injeção de 50 nl de uma solução a 2% de azul de Evans. Os animais foram sacrificados com uma dose letal de anestésico e perfundido via transcardíaca com salina (200ml), seguido por folmaldeído 10% (300 a 400 ml). O encéfalo retirado e mantido no mesmo fixador por 18-24 horas e em seguida transferido para uma solução de sacarose 30% por 24 a 48 horas. As regiões de estimulação hipotalâmica, do RVL, e do NTS foram seccionados em cortes coronais de 40 µm de espessura em um micrótomo de congelamento. Os cortes obtidos foram montados em lâminas de vidro e corados pela técnica de vermelho neutro 1%. Os cortes obtidos foram analisados com microscopia óptica em campo claro (Nikon-Optiphot-2) para

observação do sítio de estimulação e microinjeção. A microinjeção de azul de Evans e a lesão eletrolítica estão representadas na Figura 7 abaixo e os cortes histológicos ao final após os protocolos experimentais.

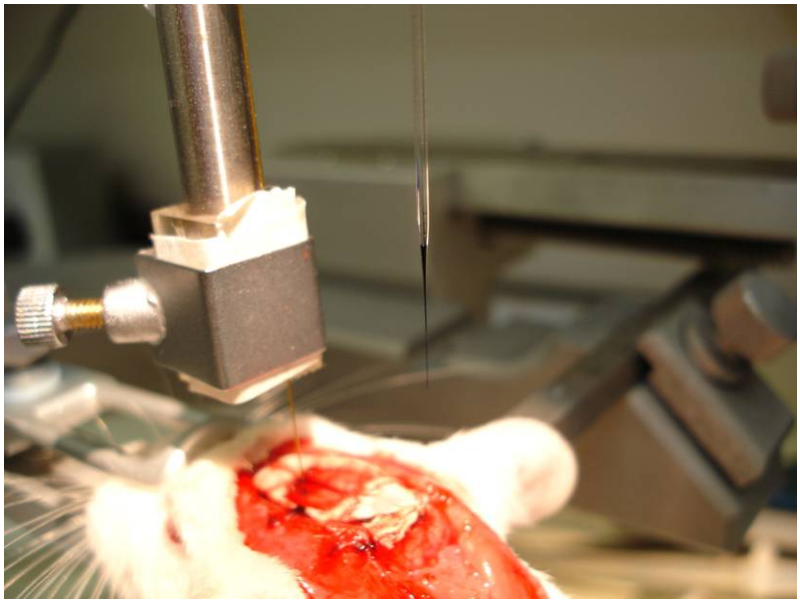


Figura 7 – Representação da lesão eletrolítica no hipotálamo e microinjeção de azul de Evans ao término do experimento.

5-DROGAS UTILIZADAS

A lista abaixo contém os fármacos inicialmente a serem utilizados neste projeto.

Anestésicos

Halotano: anestésico geral – (2% em O_2 100%) – (Halotano; Cristália – Produtos Químicos farmacêuticos Ltda; Itapira; SP, Brasil)

Uretana: 0,6g/kg, i.v. (Sigma Chemical Co)

α-cloralose: 50mg/kg, i.v. (Sigma Chemical Co)

Injeções endovenosas

Solução fisiológica: NaCl 0,9% - estéril

d-tubocurarina: 0,5 mg/kg – Bloqueador Neuromuscular (Sigma Chemical Co)

fentolamina: 1,5mg/kg – antagonista α-adrenérgico (Sigma Chemical Co)

Microinjeções

Solução fisiológica: NaCl 0,9% - estéril

ácido quinurênico: antagonista glutamatérgico ionotrópico não seletivo (Sigma Chemical Co)

α,β-methylene ATP: α,β-Methylene-adenosine-5`-triphosphate agonista para receptores de ATP – P2x

CGS21680: 2-p-(2-Carboxyethyl)phenethylamino-5`-N-ethylcarboxamidoadenosine agonista para receptores de Adenosina – A2a (Tocris)

suramin: antagonista para receptores de ATP – P2x (Tocris)

6-ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para cada episódio de estimulação elétrica do hipotálamo, foram registrados variações máximas de PAM, FC, Fluxo sangüíneo de membros posteriores e Condutância vascular dos membros posteriores. Para avaliação das variações da condutância vascular, utilizamos: 1) área total da resposta, calculada como a área total sob a curva da variação percentual da condutância vascular desde o início da estimulação até o retorno ao valor basal; 2) pico da resposta, através do valor máximo atingido expresso como % em relação ao valor basal.

Os dados foram expressos na forma de média ± erro padrão da média. Na comparação entre os valores basais e as respostas cardiovasculares à estimulação elétrica do hipotálamo durante período controle e o período experimental entre dois grupos, a comparação será feita utilizando-se teste *t* pareado de *Student*. Quando comparados mais de 2 grupos ou situações experimentais utilizaremos análise de variância de uma via seguida pelo pós-teste de Newman-Keuls. O nível de significância estabelecido para comparação das amostras foi $\alpha = 5\%$ ($p < 0,05$).

7-PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

7.1 Efeito do bloqueio de receptores purinérgicos P2x no NTS durante as reações de alerta e defesa

Para verificarmos a participação dos receptores P2x no NTS durante as reações de alerta realizamos a EE da HDA antes e 30 minutos após a microinjeção bilateral de Suramin (100 pmol/50 nl) no NTS.

7.2 Eficácia no bloqueio dos receptores purinérgicos P2x no NTS

Para verificarmos a eficácia do bloqueio dos receptores P2x no NTS e da dose utilizada do respectivo antagonista suramin (100 pmol/50 nl), verificamos os ajustes cardiovasculares durante a microinjeção do agonista P2x α,β-methylene ATP (100 pmol/50 nl) antes e 30 minutos após o bloqueio bilateral do NTS com Suramin.

7.3 Efeito do bloqueio dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos no NTS nos ajustes cardiovasculares devido a EE do Hipotálamo

Ao investigarmos a participação dos receptores glutamatérgicos do NTS intermediário nas reações de alerta e defesa, utilizamos a EE da HDA antes e 30 minutos após a microinjeção bilateral do antagonista ácido quinurênico (5 nmol/50 nl) no NTS.

7.4 Efeito do bloqueio dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos no RVL durante a estimulação química do NTS com agonista purinérgico P2x

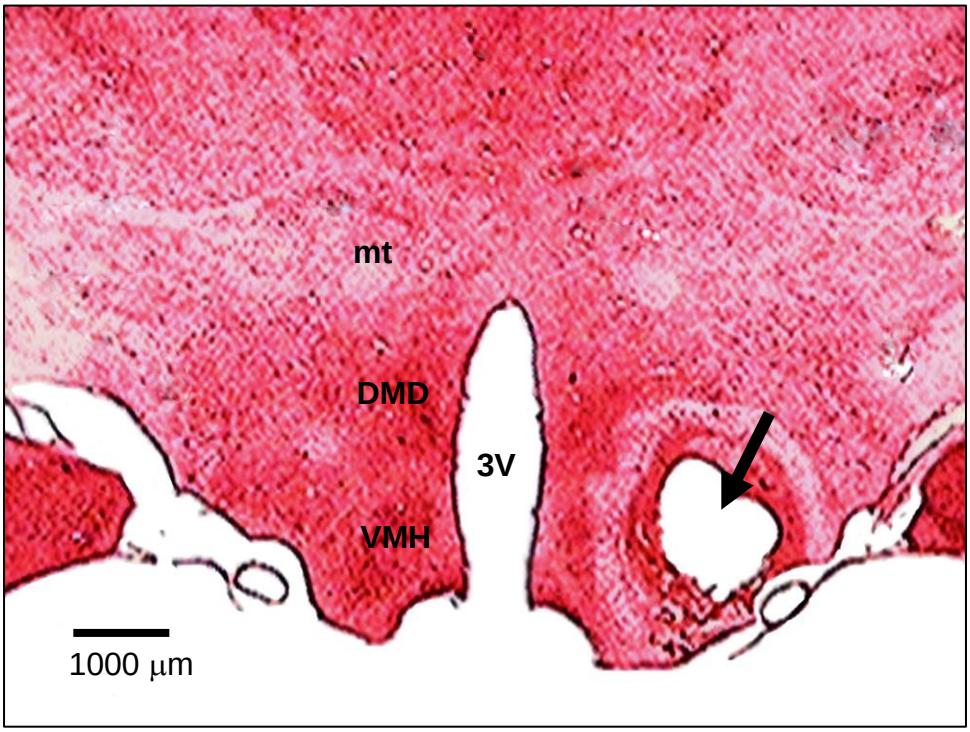
Para verificarmos a participação dos receptores glutamatérgicos no RVL nas respostas hemodinâmicas produzidas pela estimulação química no NTS com o agonista α,β-methylene ATP (100 pmol/50 nl), bloqueamos o RVL bilateralmente o antagonista ácido quinurênico (5 nmol/50 nl) e realizamos estimulação do NTS antes e 30 minutos após o bloqueio bilateral no RVL.

7.5 Participação dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos no RVL durante a estimulação química do NTS com agonista purinérgico A2a

Para verificarmos novamente o papel dos receptores glutamatérgicos no RVL, microinjetamos o agonista A2a - CGS21680 (20 pmol/50 nl) no NTS antes e 30 minutos após o bloqueio bilateral do RVL com o antagonista ácido quinurênico (5 nmol/50 nl).

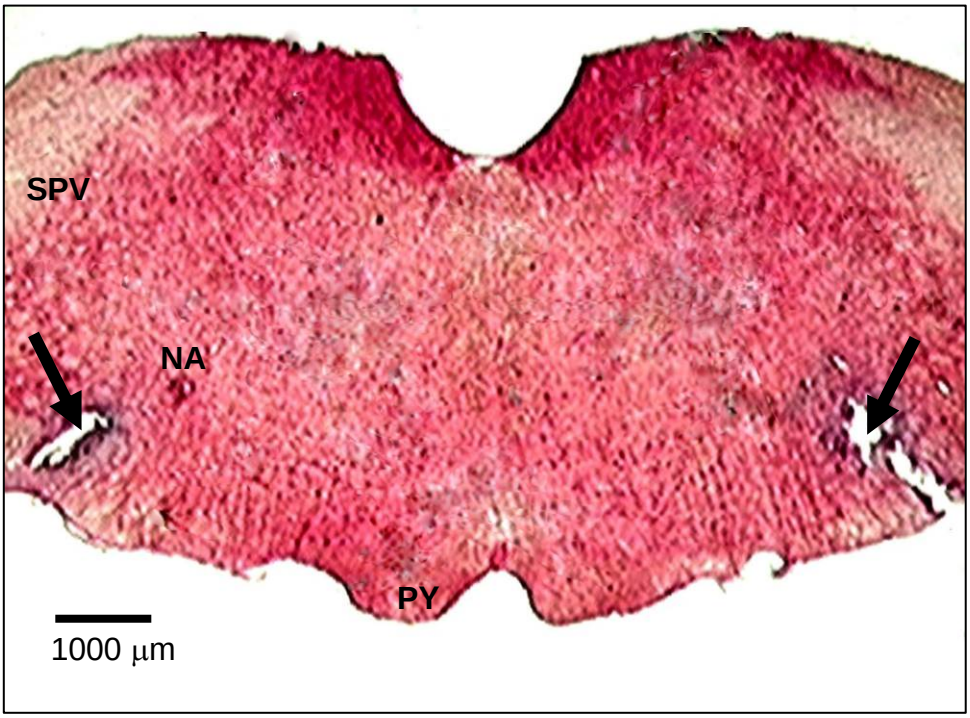
7.6 Relação entre os receptores P2x no NTS e a retirada do tônus simpático nas reações de defesa

Para estudarmos a participação dos receptores α–adrenérgicos periféricos na retirada do tônus simpático, durante as reações de alerta e defesa e durante a ativação dos receptores P2x no NTS, estimulamos eletricamente a HDA e microinjetamos α,β-methylene ATP (100 pmol/50 nl) no NTS antes e 15 minutos após a infusão sistêmica de fentolamina (1,5 mg/kg i.v.). Num segundo momento realizamos novamente a estimulação elétrica da HDA e microinjetamos α,β-methylene ATP (100 pmol/50 nl) no NTS 30 minutos após o bloqueio bilateral do NTS com Suramin.



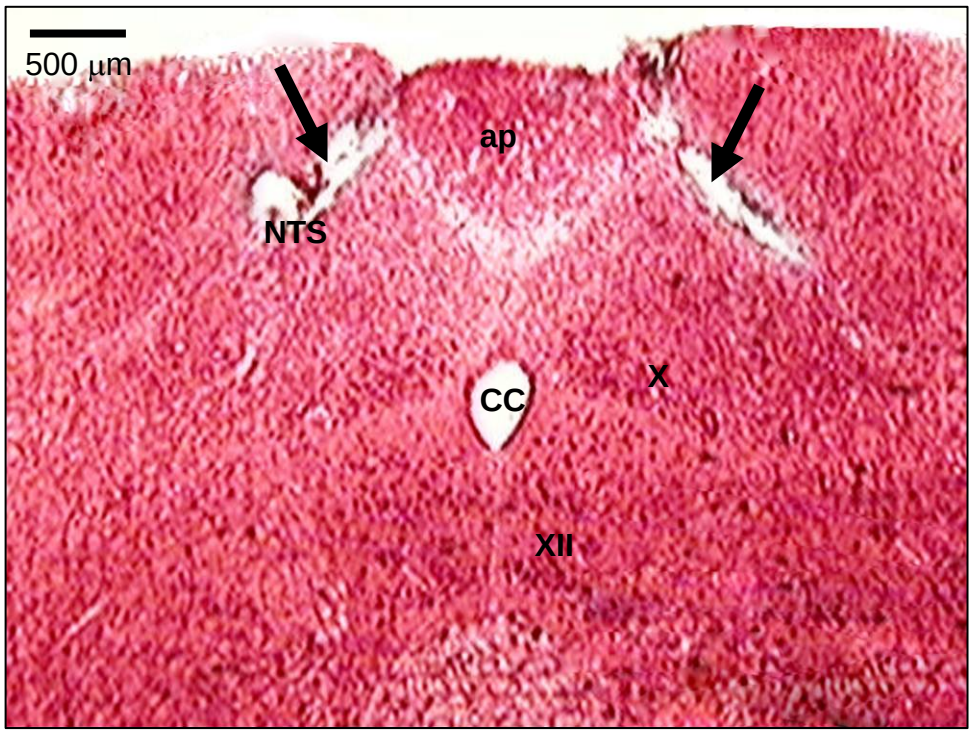
Bregma: -2,80 mm

Fig 8 – Verificação histológica da lesão eletrolítica do sítio de estimulação elétrica do hipotálamo. Fotomicrografia de um corte coronal (40µm) do hipotálamo lateral corado pela técnica de vermelho neutro, mostrando os sítios de EE (seta preta) como indicado pela lesão eletrolítica realizada ao final do experimento. Abreviaturas: mt: trato mamilotalâmico; 3V: terceiro ventrículo, VMH: núcleo hipotalâmico ventromedial, DMD: núcleo hipotalâmico dorsomedial.



Bregma: -11,96 mm

Fig 9 – Verificação histológica do local de microinjeção do núcleo rostroventrolateral (RVL). Fotomicrografia de um corte coronal (40µm) do bulbo de rato corado com vermelho neutro com os locais da injeção (setas) de azul de Evans 2%. Abreviaturas: py: trato cortiço espinal, SPV: núcleo espinal do trigêmeo, NA: núcleo ambíguo.



Bregma: -13,80 mm

Fig 10 – Verificação histológica do local de microinjeção do núcleo do trato solitário (NTS). Fotomicrografia de um corte coronal (40µm) do bulbo de rato corado com vermelho neutro com os locais da injeção (setas) de azul de Evans 2%. Abreviaturas: XII: núcleo hipoglosso, X: núcleo dorsal motor do vago, NTS: núcleo do trato solitário, cc: canal central, ap: área postrema.

RESULTADOS

1-Efeito do bloqueio de receptores purinérgicos P2x no NTS durante as reações de alerta e defesa

Para observarmos a participação dos receptores P2x localizados no NTS nos ajustes cardiovasculares devido à EE do hipotálamo realizamos a microinjeção bilateral do antagonista P2x suramin (100 pmol/50 nl) no NTS de ratos anestesiados e paralisados.

Na Figura 11 observamos, em um animal representativo do grupo, os ajustes cardiovasculares de PAP, FC, PAM e FSMP provocados pela EE da HDA antes (A) e 30 minutos após (B) o bloqueio bilateral do NTS com a microinjeção de suramin.

A EE da HDA produziu hipertensão, taquicardia e aumento do FSMP na situação controle; 30 minutos após o bloqueio bilateral dos receptores P2x no NTS realizamos nova EE da HDA onde o incremento no FSMP foi reduzido, enquanto a hipertensão e a taquicardia permaneceram inalteradas. Na Figura 11 os valores basais de pressão arterial e fluxo sangüíneo permaneceram inalterados após a microinjeção de suramin no NTS enquanto observamos redução nos níveis basais da freqüência cardíaca. A Figura 12 expressa os valores de condutância vascular na forma de % em relação ao valor basal, variando durante a EE da HDA na situação controle e após o bloqueio bilateral do NTS com suramin. Ao início da EE observamos um intenso aumento da CVMP em relação ao seu valor basal reduzindo lentamente após cessar o estímulo, porém o aumento da condutância ainda permaneceu elevado em relação ao seu nível basal até após 90 segundos do início do estímulo. Após a microinjeção bilateral de suramin no NTS a magnitude do pico de resposta máximo reduziu assim como a sua duração.

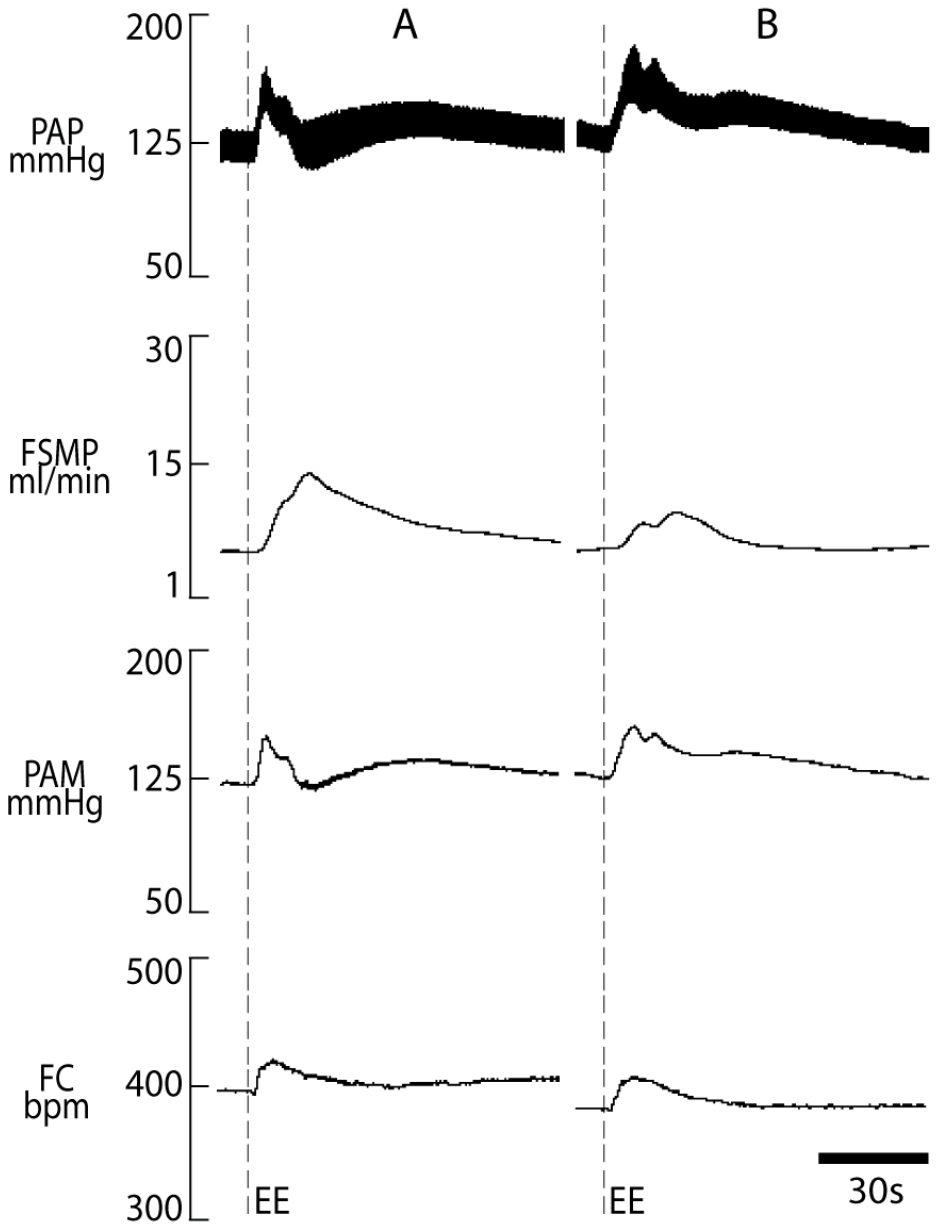


Fig 11 – Registros de pressão arterial pulsátil (PAM), fluxo sangüíneo em membros posteriores (FSMP), pressão arterial média (PAM) e freqüência cardíaca (FC) de um rato anestesiado e paralisado, mostrando ajustes cardiovasculares produzidos pela EE do hipotálamo (150 μA; 0,6 ms; 100 Hz; 6 s) antes (A), após (B) a microinjeção bilateral de suramin (100 pmol/50 nl) no NTS. As barras escuras na parte inferior da figura representam o período de estimulação do hipotálamo.

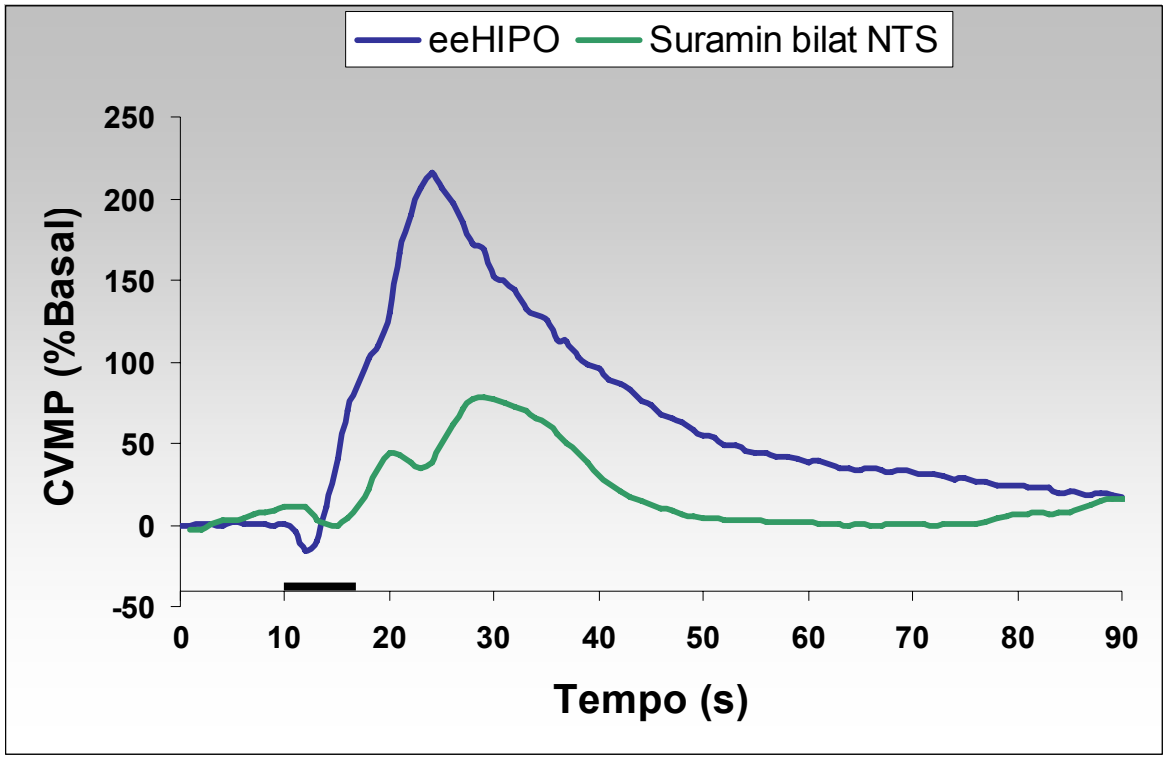


Fig 12 – Efeito da EE do hipotálamo na condutância dos membros posteriores, antes (linha azul), e após a microinjeção bilateral (linha verde) de suramin (100 pmol/50 nl) no NTS. As barras horizontais indicam o período de EE do hipotálamo.

A Tabela I sumariza, neste grupo com 8 animais, os valores basais de PAP, PAM, FC, FSMP e CVMP. Podemos notar que esses parâmetros não se modificaram 30 minutos após o bloqueio bilateral no NTS com suramin. Os gráficos representativos do grupo estão apresentados na Figura 13, demonstrando que após o bloqueio bilateral dos receptores P2x no NTS, as variações da PAM (38±6 vs 32±6 mmHg) e da FC (62±14 vs 32±7 bpm) durante a EE do hipotálamo não se modificaram. A variação de FSMP, por sua vez, diminuiu (172±31 vs 64±24% do basal) após o bloqueio bilateral do NTS com suramin.

Na Figura 14 analisando o aumento médio da condutância vascular dos membros posteriores neste grupo, durante a EE, observamos significativa redução

do pico de resposta máxima de vasodilatação (173±19 vs 28±14% do basal). Analisando a área total sob a curva de condutância podemos notar a redução de aproximadamente 90% deste componente durante a EE da HDA, antes e 30 minutos após o bloqueio bilateral com suramin (3680±618 vs 399±178% do basal) respectivamente.

Tabela I – Média e respectivos erro padrão da média dos valores basais de pressão arterial média (PAM), freqüência cardíaca (FC), fluxo sangüíneo dos membros posteriores (FSMP) e condutância vascular dos membros posteriores (CVMP) antes (controle) e após a microinjeção bilateral de suramin (100 pmol/50 nl) no NTS.

	Controle	***SUR-BIL***
PAM (mmHg)	113±5	114±12
FC (bpm)	396±11	351±19
FSMP (ml/min)	7±1	5±1
CVMP (µl*(min*mmHg)$^{-1}$)	57±7	42±4

N=8

***p<0,05 comparado ao controle**

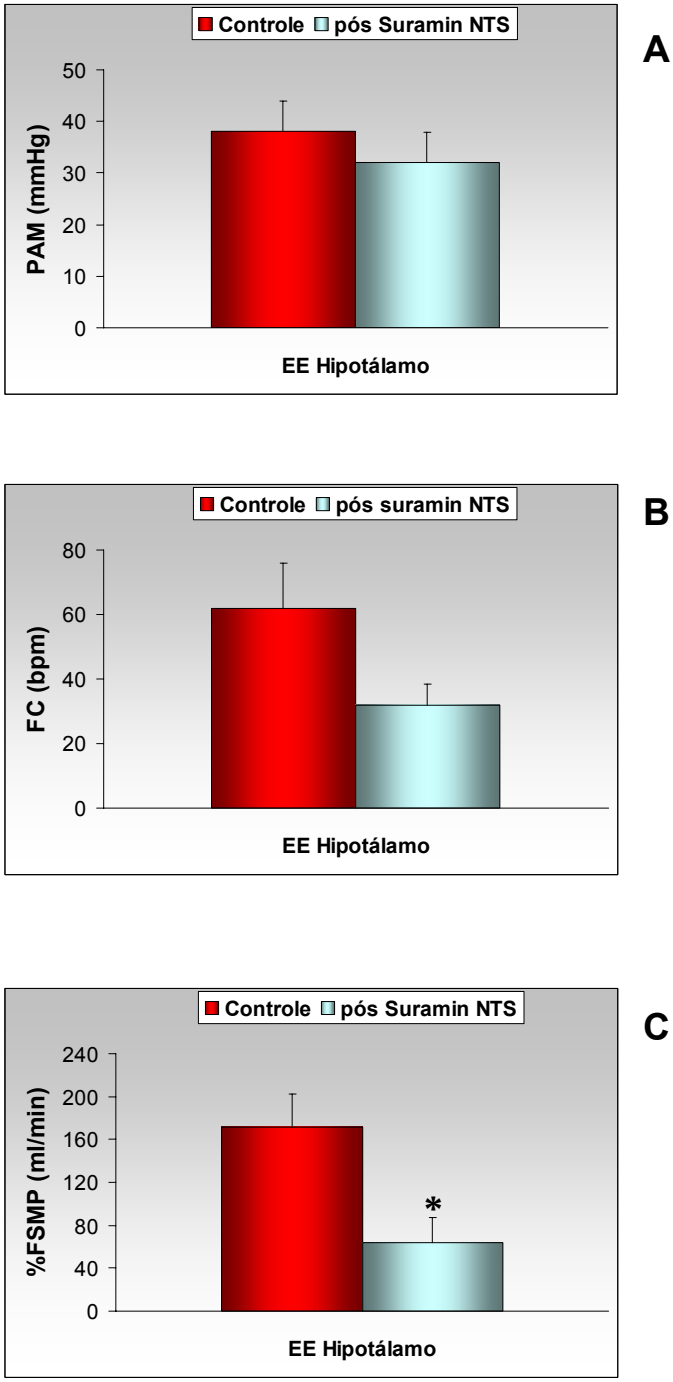


Fig 13 – Média ± EPM das variações de pressão arterial (A), freqüência cardíaca (B) e fluxo sangüíneo dos membros posteriores (C) durante a EE do hipotálamo (150 µA; 0,6 ms; 100 Hz; 6 s), de um grupo de ratos (N = 8) antes (controle) e após (pós suramin NTS) a microinjeção bilateral de suramin (100 pmol/50 nl) no NTS. ***p<0,05 comparado ao controle**

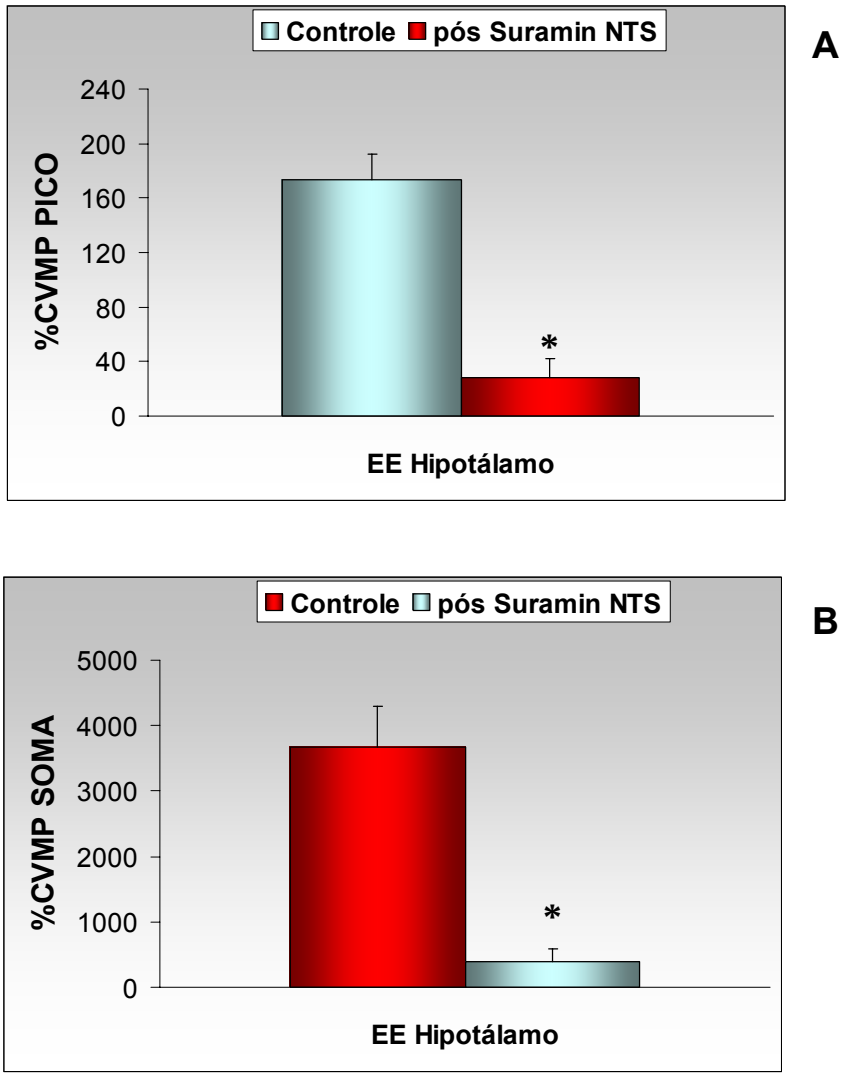


Fig 14 – Média ± EPM das variações máximas de condutância vascular (A) e área total sob a curva de CVMP (B) durante a EE do hipotálamo (150 µA; 0,6 ms; 100 Hz; 6 s), de um grupo de ratos (N = 8) antes (controle) e após (pós suramin NTS) a microinjeção bilateral de suramin (100 pmol/50 nl) no NTS. ***p<0,05 comparado ao controle**

2-Eficácia no bloqueio dos receptores purinérgicos P2x no NTS

Os experimentos anteriores demonstraram a participação dos receptores P2x no NTS, na vasodilatação muscular dos membros posteriores de ratos em reações de alerta e defesa induzidas pela EE do hipotálamo. Para testarmos se o bloqueio estava sendo realmente eficaz, e se a dose do antagonista fora realmente efetiva, microinjetamos o agonista P2x, α,β-methylene ATP, no NTS (100 pmol/50 nl), comparando-se os efeitos provocados antes e após a microinjeção da mesma dose de suramin.

A Figura 15 apresenta o traçado típico de um animal representativo do grupo com ajustes hemodinâmicos de PAP, FC, PAM e FSMP devido à estimulação química do NTS com o agonista P2x, α,β-methylene ATP, antes (A), 30 minutos após o bloqueio bilateral do NTS com o antagonista P2x, suramin, (B) e 80 minutos após a microinjeção de suramin (C).

A microinjeção de α,β-methylene ATP no NTS na situação controle produziu hipotensão, bradicardia e associado ao aumento do FSMP (Figura 15A). Na curva de condutância vascular notamos aumento com um pico de resposta máxima e aumento da área sob a curva representando a intensidade e a duração da vasodilatação respectivamente, expressos na figura 16. Trinta minutos após o bloqueio bilateral do NTS com suramin os valores basais de PAP e PAM permaneceram inalterados enquanto o FSMP e a FC aumentaram (Figura 15B), na Figura 16 observamos redução nos valores basais de CVMP. Durante a microinjeção de α,β-methylene ATP no NTS a hipotensão, a bradicardia e o aumento do FSMP foram praticamente abolidas. A resposta vasodilatadora dos

membros posteriores, com a microinjeção de α,β-methylene ATP após bloqueio bilateral com suramin também foi praticamente abolida (Figura 16). Passado um período de 80 minutos realizamos nova microinjeção de α,β-methylene ATP no NTS onde pudemos presenciar novamente a resposta de aumento da CVMP, demonstrando, dessa forma, a reversão do bloqueio de receptores P2x com suramin.

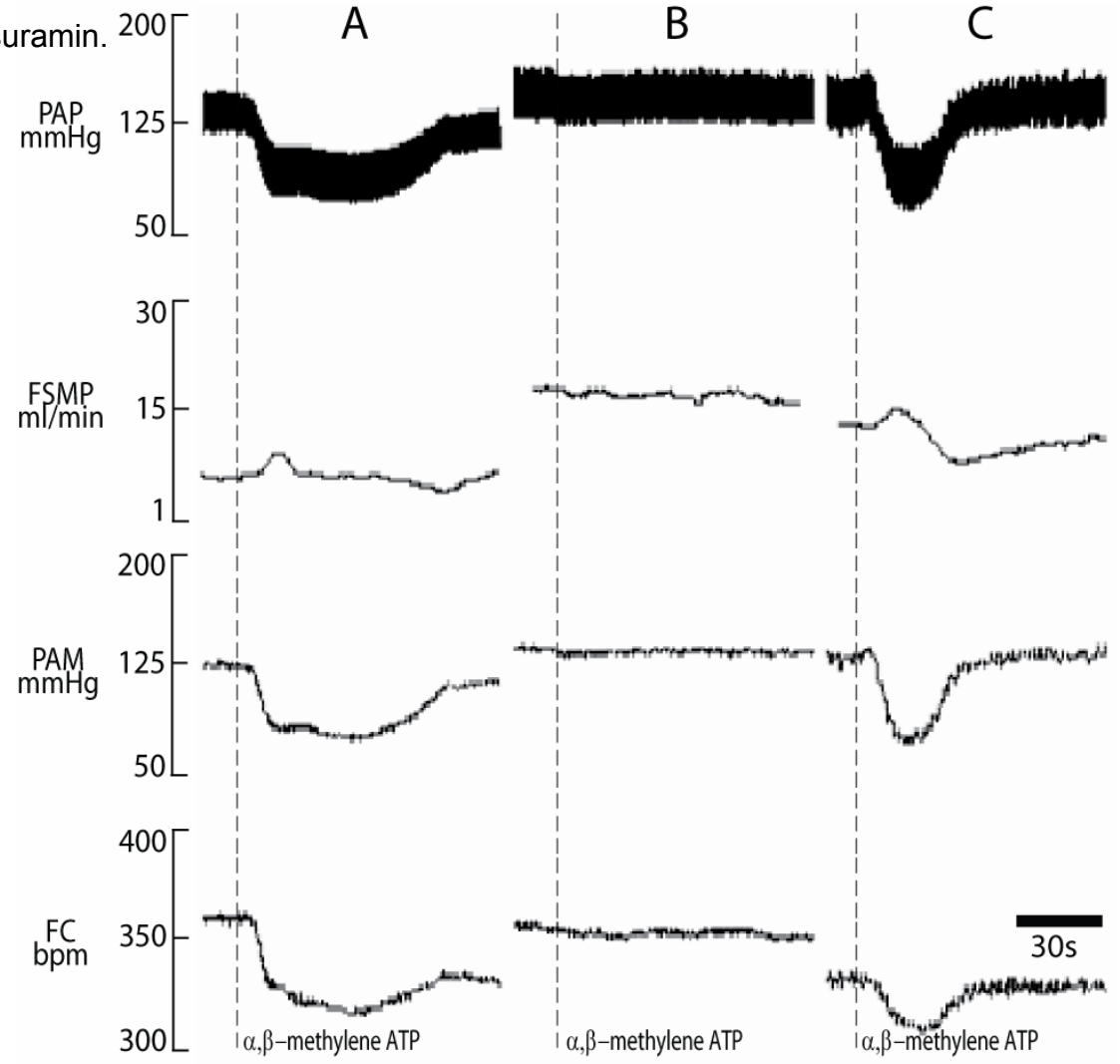


Fig 15 – Registros de pressão arterial pulsátil (PAM), fluxo sangüíneo em membros posteriores (FSMP), pressão arterial média (PAM) e freqüência cardíaca (FC) de um rato anestesiado e paralisado, mostrando ajustes cardiovasculares produzidos pela microinjeção de α,β-methylene ATP (100 pmol/50 nl) no NTS antes (A), após (B) a microinjeção bilateral de suramin (100 pmol/50 nl) no NTS e 80 minutos após o bloqueio (C). As barras escuras na parte inferior da figura representam o período de estimulação química do NTS.

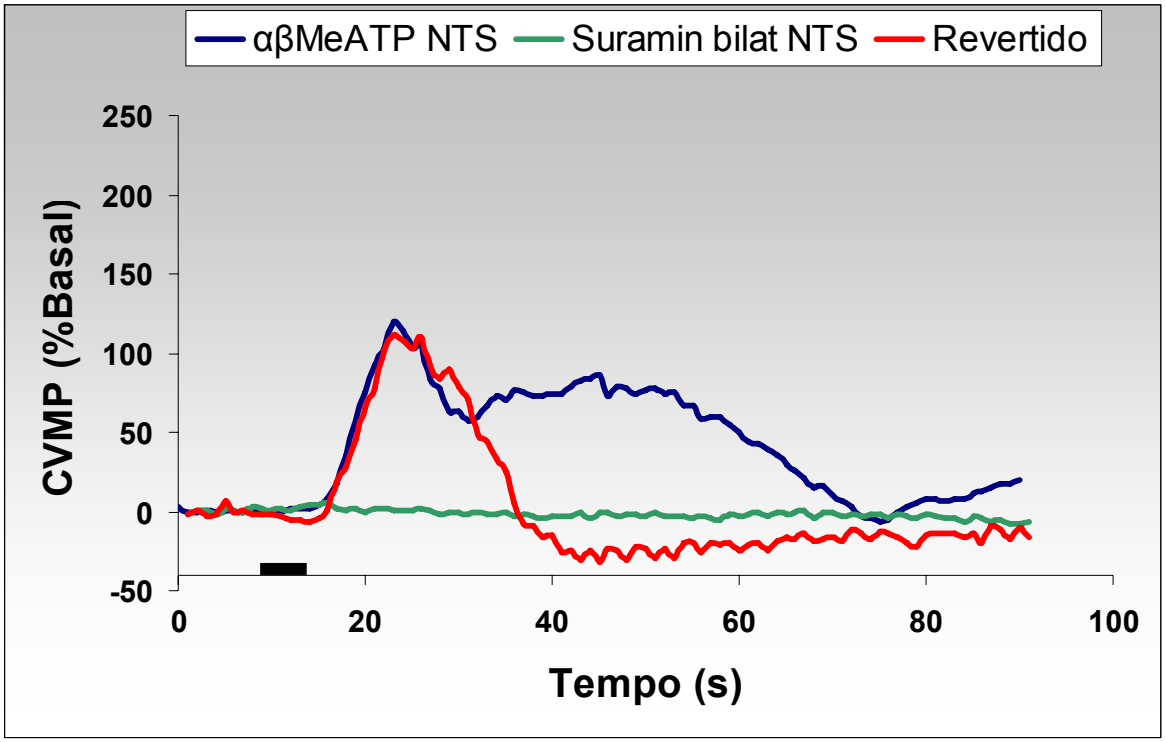


Fig 16 – Efeito da microinjeção de α,β-methylene ATP (100 pmol/50 nl) no NTS na condutância vascular dos membros posteriores, antes (linha azul), após a microinjeção bilateral (linha verde) de suramin (100 pmol/50 nl) no NTS e 80 minutos após o bloqueio (linha vermelho). As barras horizontais indicam o período de estimulação química do NTS.

A análise deste grupo (N = 7) demonstrou que o bloqueio bilateral do NTS com o antagonista suramin diminuiu os valores basais de CVMP, porém os valores basais de PAP, FC, PAM e FSMP permaneceram inalterados (Tabela II).

As médias das variações de PAM, FC e FSMP deste grupo, conseqüentes à estimulação química do NTS, estão representadas na Figura 17. Quando comparadas, a situação após o bloqueio bilateral dos receptores P2x no NTS e a situação controle, a bradicardia (-35±7 vs -29±18 bpm) e o aumento do FSMP (20±10 vs 9±5% do basal) permaneceram inalterados durante a estimulação

química do NTS com α,β-methylene ATP. A resposta hipotensora por sua vez reduziu (-47±5 vs -6±2 mmHg) após o bloqueio bilateral dos receptores P2x em comparação com a situação controle.

Analisando a média do aumento de condutância vascular dos membros posteriores neste grupo (figura 18), conseqüente a microinjeção de α,β-methylene ATP, observamos a redução dos parâmetros da resposta de vasodilatação. A resposta máxima de condutância vascular reduziu (76±15 vs 9±2% do basal) 30 minutos após o bloqueio bilateral com suramin. Da mesma forma a área total sob a curva de condutância reduziu após o bloqueio bilateral indicando diminuição na duração da resposta vasodilatadora (3255±471 vs 219±72 % do basal).

Tabela II – Média e respectivos erro padrão da média dos valores basais de pressão arterial média (PAM), freqüência cardíaca (FC), fluxo sangüíneo dos membros posteriores (FSMP) e condutância vascular dos membros posteriores (CVMP) antes (controle) e após a microinjeção bilateral de suramin (100 pmol/50 nl) no NTS.

	Controle	***SUR-BIL***
PAM (mmHg)	133±7	126±12
FC (bpm)	364±12	354±18
FSMP (ml/min)	13±3	10±2
CVMP (µl*(min*mmHg)$^{-1}$)	99±22	87±23 *

N=7

***p<0,05 comparado ao controle**

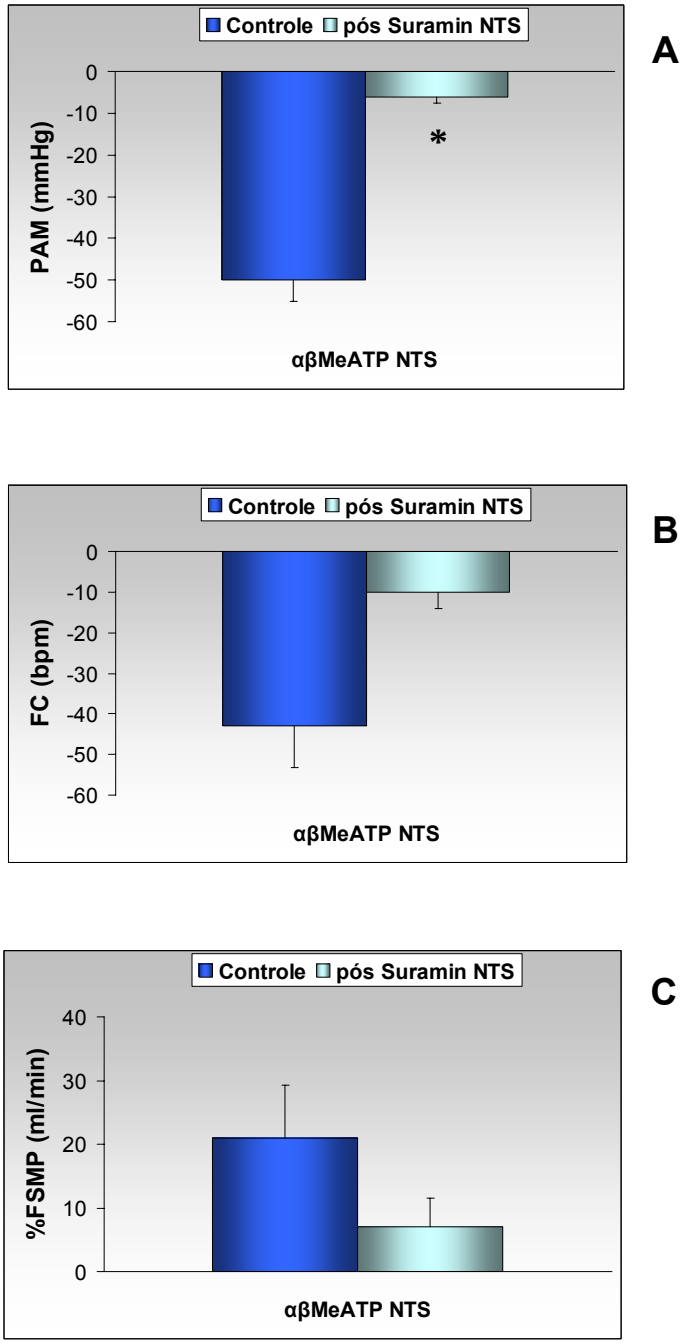


Fig 17 – Média ± EPM das variações de pressão arterial (A), freqüência cardíaca (B) e fluxo sangüíneo dos membros posteriores (C) durante a microinjeção de α,β-methylene ATP (100 pmol/50 nl) no NTS, de um grupo de ratos (N = 7) antes (controle) e após (pós suramin NTS) a microinjeção bilateral de suramin (100 pmol/50 nl) no NTS. ***p<0,05 comparado ao controle**

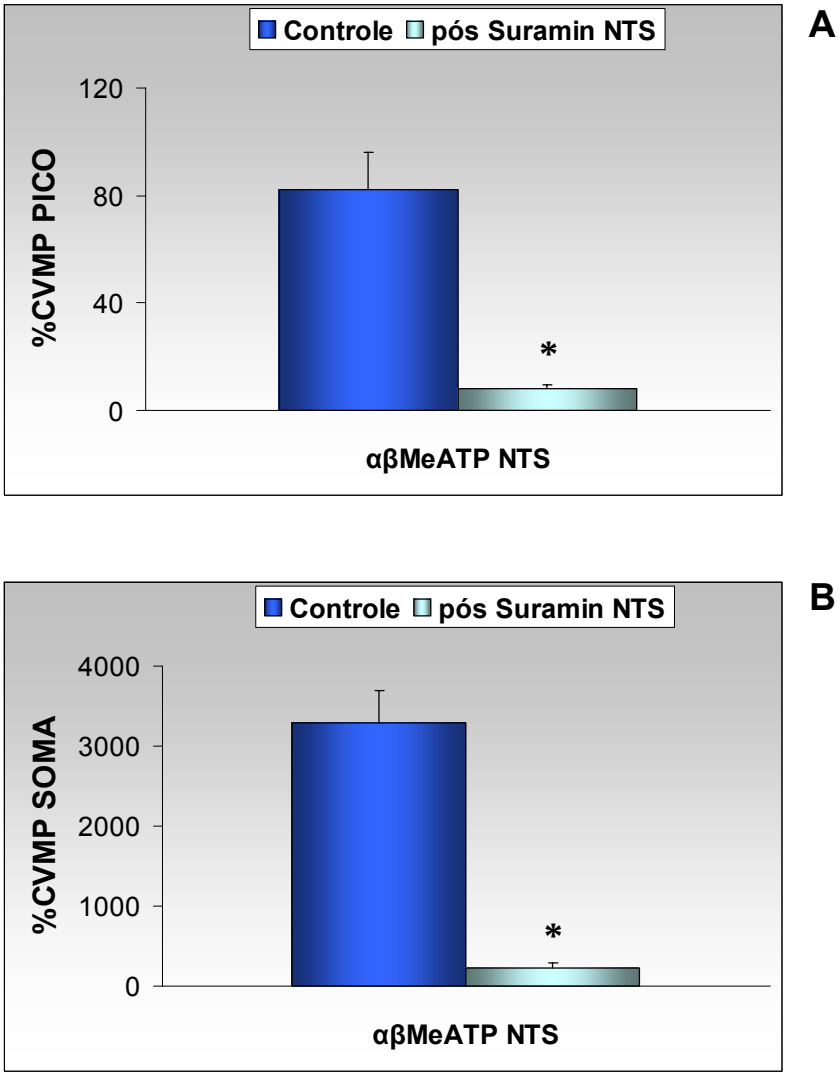


Fig 18 – Média ± EPM das variações máximas de condutância vascular (A) e área total sob a curva de CVMP (B) durante a microinjeção de α,β-methylene ATP (100 pmol/50 nl) no NTS, de um grupo de ratos (N = 7) antes (controle) e após (pós suramin NTS) a microinjeção bilateral de suramin (100 pmol/50 nl) no NTS. ***p<0,05 comparado ao controle**

3-Efeito do bloqueio dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos no NTS nos ajustes cardiovasculares devidos a EE do Hipotálamo

Devida a íntima relação entre receptores purinérgicos e glutamatérgicos, através de modelos envolvendo interneurônios e co-transmissão no NTS, desenvolvemos uma série de experimentos para testar a possível participação dos receptores ionotrópicos glutamatérgicos do NTS na vasodilatação muscular em reações de alerta e defesa.

Para determinarmos a participação de receptores glutamatérgicos ionotrópicos nos fenômenos de vasodilatação muscular provocada por EE da HDA, microinjetamos ácido quinurênico (5 nmol/50 nl), um antagonista não seletivo de receptores glutamatérgicos ionotrópicos, bilateralmente no NTS.

A Figura 19 apresenta as variações de PAP, FC, PAM e FSMP de um animal durante EE hipotalâmica antes (A) e 30 minutos após o bloqueio bilateral do NTS com o antagonista ácido quinurênico (B).

Neste animal a EE da HDA desencadeou hipertensão transitória com taquicardia e aumento do FSMP na situação controle (Figura 19A). Nas curvas de CVMP demonstradas na Figura 20, a EE da HDA desencadeou vasodilatação no leito vascular dos membros posteriores de grande intensidade. Após a microinjeção bilateral de ácido quinurênico no NTS o animal permaneceu em repouso por 30 minutos para estabilização dos parâmetros cardiovasculares. Os níveis basais de PAM e FC aumentaram enquanto o FSMP e a CVMP não modificaram após 30 minutos de bloqueio farmacológico. Durante a EE hipotalâmica os parâmetros de PAP, PAM, FC e FSMP foram bloqueadas com a

microinjeção de ácido quinurênico no NTS (Figura 19B). Nos gráficos de condutância vascular da Figura 20 a curva de condutância controle indica intensa vasodilatação dos membros posteriores, devida a estimulação da HDA, com o bloqueio bilateral a vasodilatação sofreu grande queda no seu pico de resposta máxima e na área sob a curva restando um discreto componente no final do período analisado (Figura 19B).

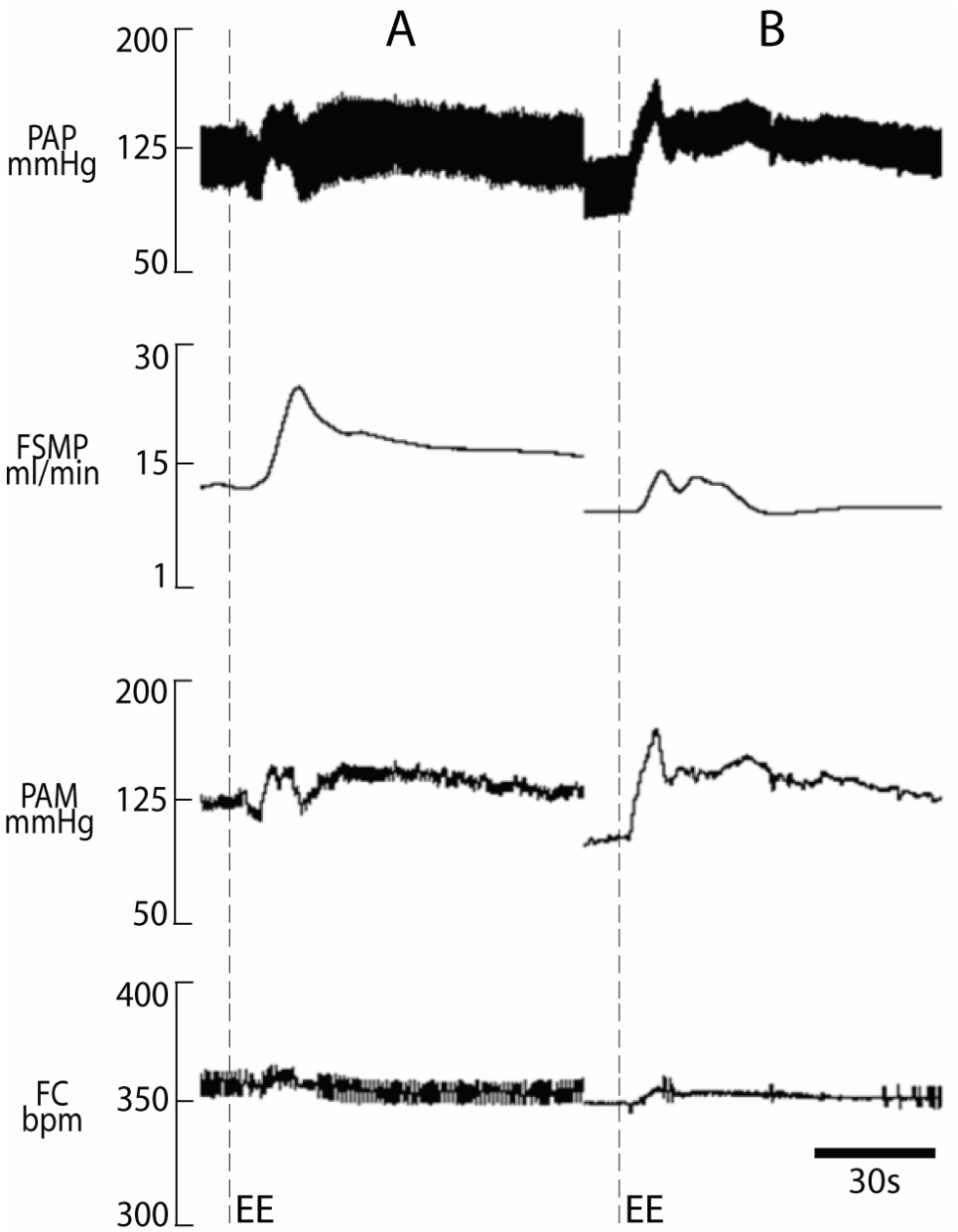


Fig 19 – Registros de pressão arterial pulsátil (PAM), fluxo sangüíneo em membros posteriores (FSMP), pressão arterial média (PAM) e freqüência cardíaca (FC) de um rato anestesiado e paralisado, mostrando ajustes cardiovasculares produzidos pela EE do hipotálamo (150 µA; 0,6 ms; 100 Hz; 6 s) antes (A), após (B) a microinjeção bilateral de ácido quinurênico (5 nmol/50 nl) no NTS. As barras escuras na parte inferior da figura representam o período de estimulação do hipotálamo.

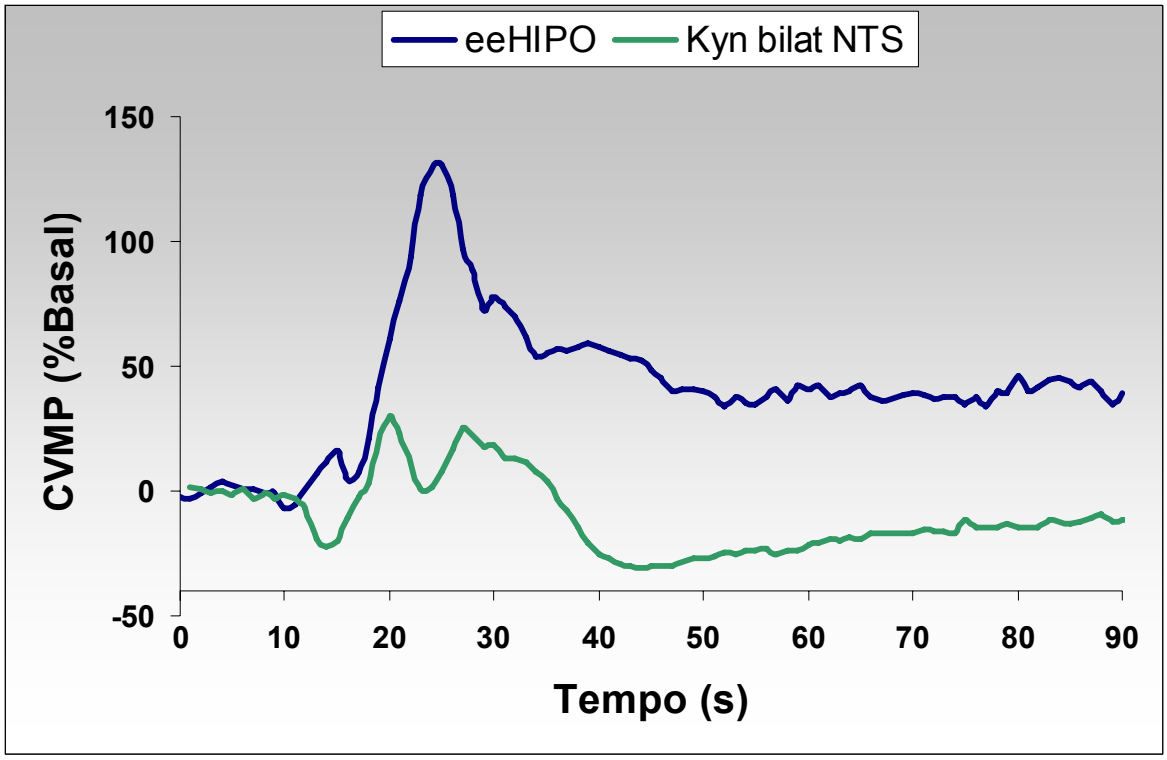


Fig 20 – Efeito da EE do hipotálamo na condutância dos membros posteriores, antes (linha azul), e após a microinjeção bilateral (linha verde) de ácido quinurênico (5 nmol/50 nl) no NTS. As barras horizontais indicam o período de EE do hipotálamo.

Neste grupo (N = 6) a microinjeção bilateral de ácido quinurênico no NTS não provocou nenhuma alteração nos níveis basais de PAM, FC, FSMP e CVMP conforme a Tabela III.

Os gráficos da Figura 21 representam as respostas evocadas com EE do hipotálamo antes e após o bloqueio bilateral do NTS com ácido quinurênico (5 nmol/50 nl). Podemos observar a resposta hipertensora (19±5 vs 24±10 mmHg) não sendo modificada, e podemos notar que o mesmo ocorreu com a taquicardia(15±4 vs 16±3 bpm). Neste grupo o FSMP reduziu de forma significativa com a EE da HDA (92±19 vs 23±11% do basal).

Tabela III – Média e respectivos erro padrão da média dos valores basais de pressão arterial média (PAM), freqüência cardíaca (FC), fluxo sangüíneo dos membros posteriores (FSMP) e condutância vascular dos membros posteriores (CVMP) antes (controle) e após a microinjeção bilateral de ácido quinurênico (5 nmol/50 nl) no NTS.

	Controle	***Kyn bilat***
PAM (mmHg)	102±6	106±11
FC (bpm)	373±31	378±27
FSMP (ml/min)	13±3	15±7
CVMP (µl*(min*mmHg)$^{-1}$)	123±26	150±66

N = 6

***p<0,05 comparado ao controle**

Analisando as variações de CVMP durante a EE hipotalâmica e após o bloqueio do NTS com ácido quinurênico, notamos drástica redução na variação máxima da resposta vasodilatadora (134±22 vs 27±13% do basal) (Figura 22A) e diminuição da área total sob a curva, ou seja, da duração da resposta vasodilatadora (4902±1066 vs 889±600% do basal) na Figura 22B. É de grande interesse destacar que os ajustes cardiovasculares após o bloqueio do NTS com ácido quinurênico foram semelhantes aos padrões encontrados no primeiro grupo experimental, com EE da HDA e bloqueio bilateral do NTS com a microinjeção do antagonista P2x, suramin.

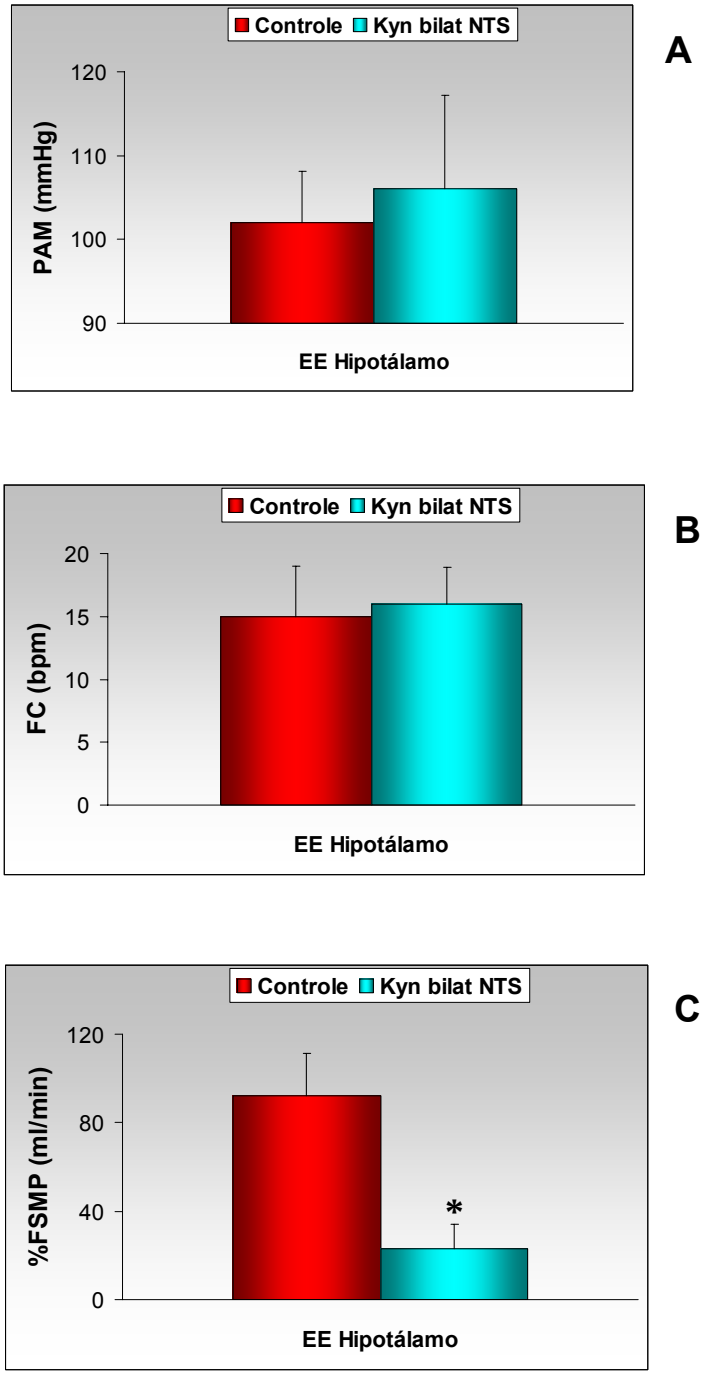


Fig 21 – Média ± EPM das variações de pressão arterial (A), freqüência cardíaca (B) e fluxo sangüíneo dos membros posteriores (C) durante a EE do hipotálamo (150 μA; 0,6 ms; 100 Hz; 6 s), de um grupo de ratos (N = 8) antes (controle) e após (Kyn bilat NTS) a microinjeção bilateral de ácido quinurênico (5 nmol/50 nl) no NTS. ***p<0,05 comparado ao controle**

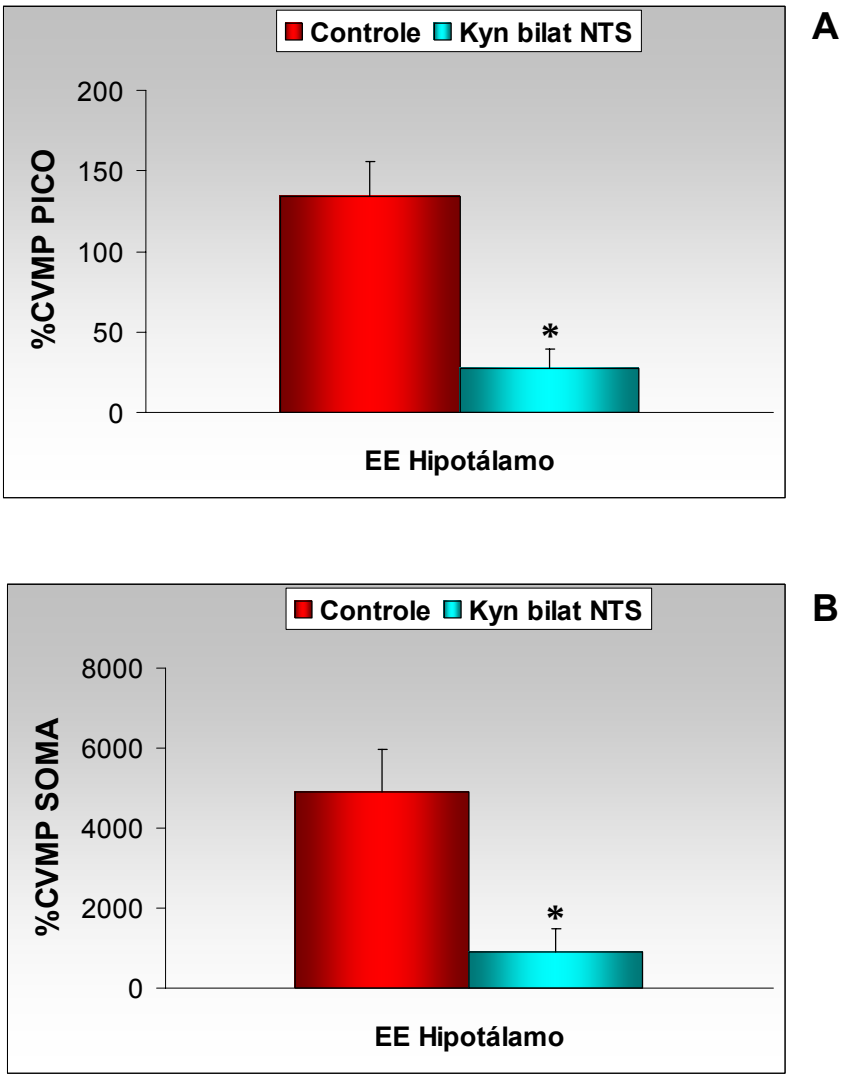


Fig 22 – Média ± EPM das variações máximas de condutância vascular (A) e área total sob a curva de CVMP (B) durante a EE do hipotálamo (150 µA; 0,6 ms; 100 Hz; 6 s), de um grupo de ratos (N = 8) antes (controle) e após (Kyn bilat NTS) a microinjeção bilateral de suramin (100 pmol/50 nl) no NTS. ***p<0,05 comparado ao controle**

4-Efeito do bloqueio dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos no RVL durante a estimulação química do NTS com agonista purinérgico P2x

Nas séries de experimentos descritos anteriormente, determinamos a participação de receptores P2x e de receptores glutamatérgicos ionotrópicos localizados no NTS, nos ajustes cardiovasculares dos comportamentos de alerta e defesa gerados pela estimulação da HDA. Trabalhos anteriores demonstraram a participação do NTS com o núcleo RVL, na superfície ventral do bulbo, nas respostas de vasodilatação muscular esquelética. Com estas evidências buscamos testar se a vasodilatação dos membros posteriores provocadas por estimulação dos receptores purinérgicos do subtipo P2x no NTS, depende da transmissão glutamatérgica no RVL.

Para tanto as respostas a microinjeção de agonista P2x, α,β-methylene ATP, (100 pmol/ 50 nl) no NTS foram testadas antes e após a microinjeção bilateral de ácido quinurênico (5 nm/50 nl) no RVL.

No traçado típico da Figura 23 estão as alterações cardiovasculares de um animal representante do grupo onde foram medidas as variáveis PAP, PAM, FC e FSMP durante a microinjeção de α,β-methylene ATP no NTS antes (A), 30 minutos após o bloqueio bilateral do RVL com o antagonista ácido quinurênico (B) e aproximadamente 90 minutos após a microinjeção com reversão do bloqueio (C).

Na situação controle a microinjeção de α,β-methylene ATP no NTS produziu hipotensão, bradicardia e aumento do FSMP (Figura 23A). O calculo da

CVMP demonstrou vasodilatação com aumento da intensidade (pico de resposta máxima) e duração (área sob a curva) da condutância durante o período de estimulação em relação ao seu nível basal (Figura 24A). Passados 30 minutos de bloqueio bilateral do RVL com ácido quinurênico os valores basais de PAP, PAM, FSMP e CVMP permaneceram inalterados, enquanto houve aumento do nível basal de FC (Figura 23B). Com a estimulação química dos receptores P2x no NTS as respostas transitórias dos componentes de PAP, PAM, FC e FSMP foram totalmente abolidos. A condutância vascular sofreu uma drástica queda abolindo a resposta vasodilatadora frente a microinjeção no NTS. Após um período de 90 minutos realizamos nova microinjeção de α,β-methylene ATP confirmando a reversão do bloqueio dos receptores glutamatérgicos no RVL.

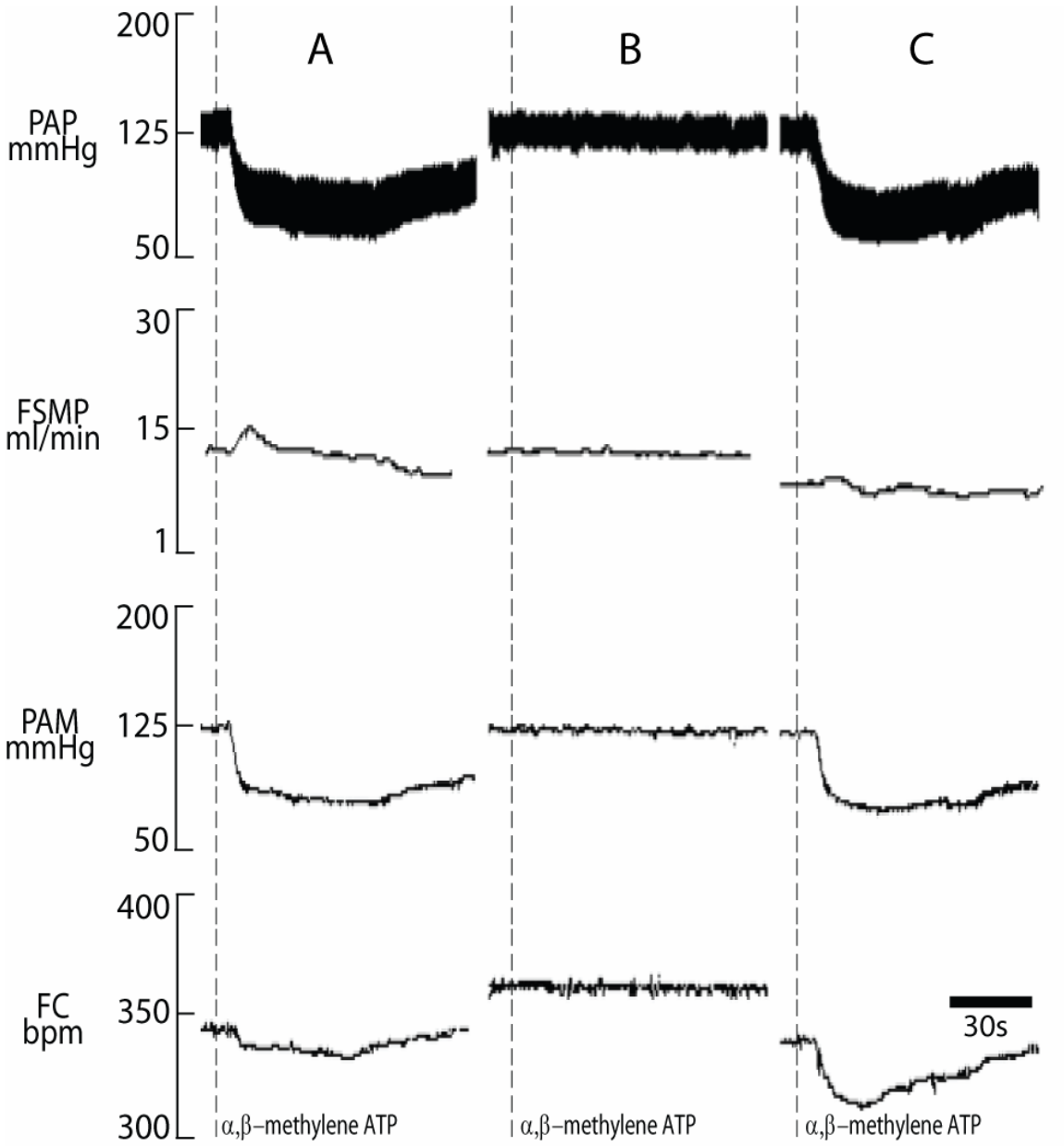


Fig 23 – Registros de pressão arterial pulsátil (PAM), fluxo sangüíneo em membros posteriores (FSMP), pressão arterial média (PAM) e freqüência cardíaca (FC) de um rato anestesiado e paralisado, mostrando ajustes cardiovasculares produzidos pela microinjeção de α,β-methylene ATP (100 pmol/50 nl) no NTS antes (A), após (B) a microinjeção bilateral de ácido quinurênico (5 nmol/50 nl) no RVL e 80 minutos após o bloqueio (C). As barras escuras na parte inferior da figura representam o período de estimulação química do NTS.

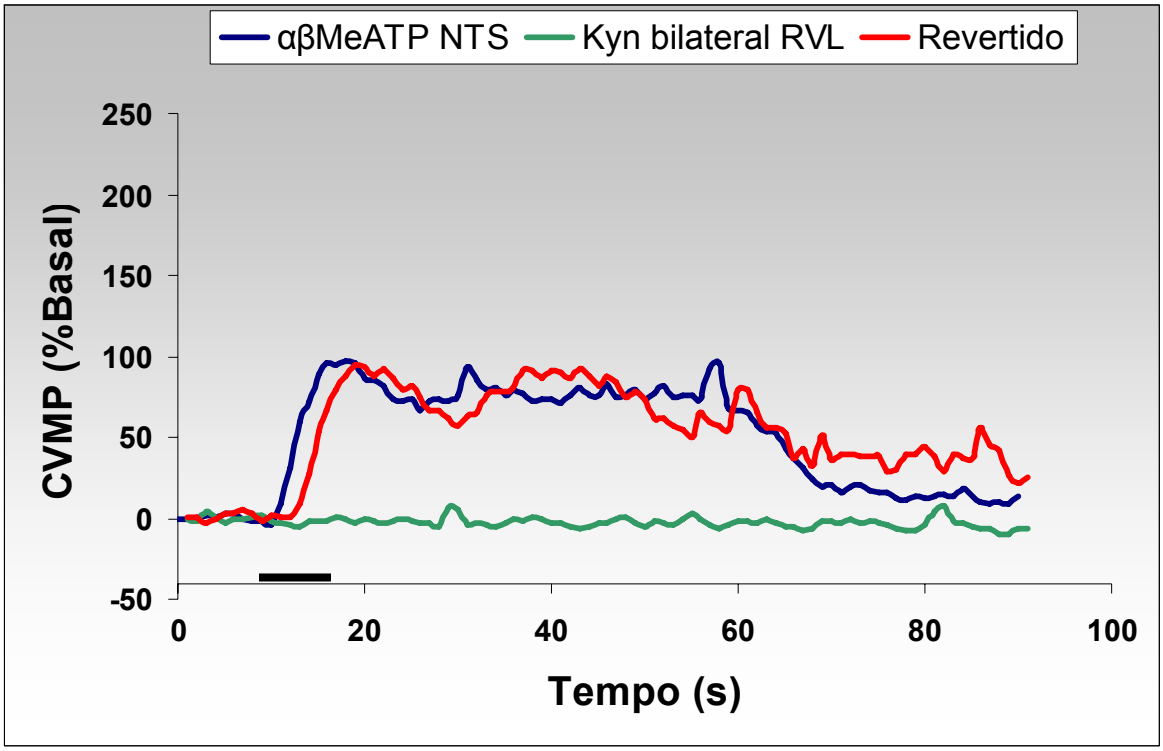


Fig 24 – Efeito da microinjeção de α,β-methylene ATP (100 pmol/50 nl) no NTS na condutância vascular dos membros posteriores, antes (linha azul), após a microinjeção bilateral (linha verde) de ácido quinurênico (5 nmol/50 nl) no RVL e 80 minutos após o bloqueio (linha vermelha). As barras horizontais indicam o período de estimulação química do NTS.

Neste grupo de animais (N = 6) o bloqueio bilateral do RVL com a microinjeção do antagonista ácido quinurênico não foi capaz de alterar os valores basais de PAP, FC e PAM, porém o nível basal do FSMP diminuiu significantemente assim como os valores basais da CVMP apresentados na Tabela IV.

Os valores de PAM, FC e FSMP do grupo, durante a estimulação química do NTS, estão expressos na Figura 25. Durante a microinjeção de α,β-methylene

ATP após o bloqueio bilateral do RVL a hipotensão (-60±6 vs -9±4 mmHg) e o aumento no FSMP (35±8 vs 3±3% do basal) diminuíram de forma significativa enquanto a bradicardia não foi reduzida em comparação com a situação controle (-40±12 vs -21±12 bpm).

A variação máxima da CVMP devido à estimulação dos receptores P2x no NTS foi intensamente reduzida após o bloqueio do RVL (126±17 vs 17±5% do basal). Analisando a área sob a curva na situação controle e 30 minutos após o bloqueio bilateral também verificamos uma drástica redução da resposta de condutância (3514±947 vs 130±66 % do basal) assim como o seu retorno para os níveis basais passados 90 minutos (Figura 26).

Tabela IV – Média e respectivos erro padrão da média dos valores basais de pressão arterial média (PAM), freqüência cardíaca (FC), fluxo sangüíneo dos membros posteriores (FSMP) e condutância vascular dos membros posteriores (CVMP) antes (controle) e após a microinjeção bilateral de ácido quinurênico (5 nmol/50 nl) no RVL.

	Controle	***Kyn-BIL***
PAM (mmHg)	144±7	146±8
FC (bpm)	355±6	359±22
FSMP (ml/min)	7±1	5±1 *
CVMP (µl*(min*mmHg)$^{-1}$)	48±7	36±7 *

N=6

***p<0,05 comparado ao controle**

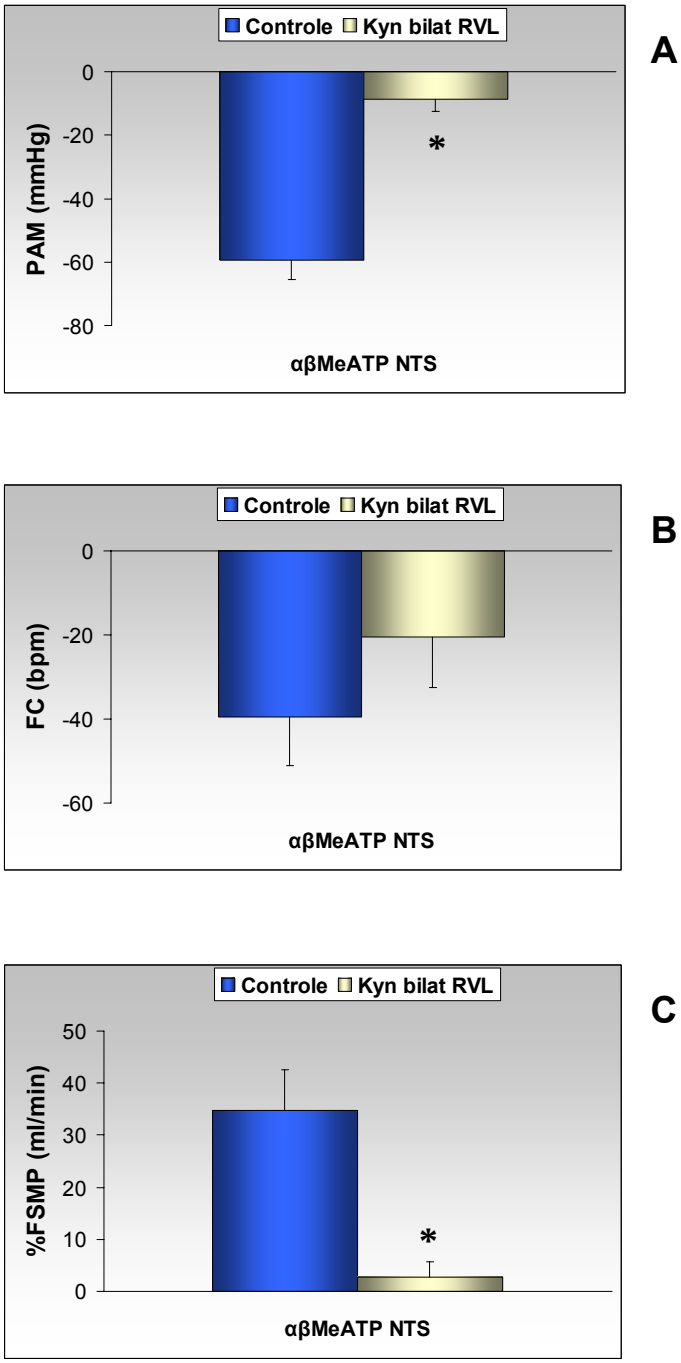
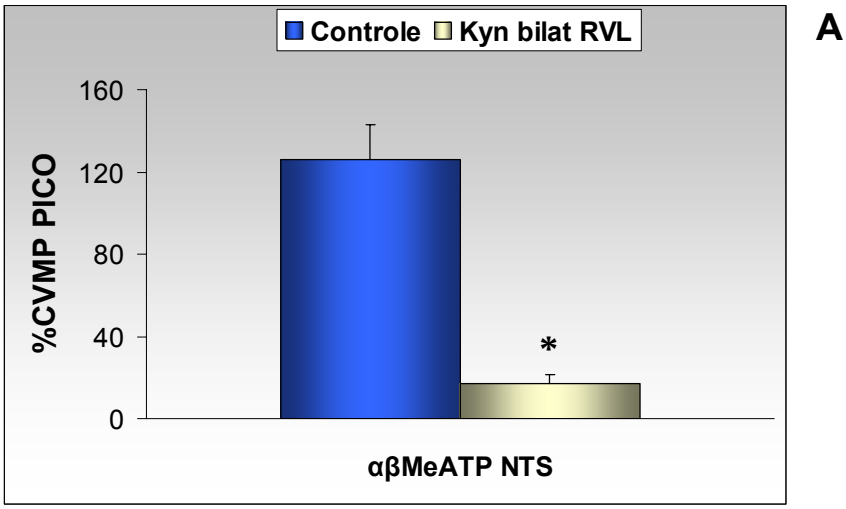


Fig 25 – Média ± EPM das variações de pressão arterial (A), freqüência cardíaca (B) e fluxo sangüíneo dos membros posteriores (C) durante a microinjeção de α,β-methylene ATP (100 pmol/50 nl) no NTS, de um grupo de ratos (N = 6) antes (controle) e após (Kyn bilat RVL) a microinjeção bilateral de ácido quinurênico (5 nmol/50 nl) no RVL. ***p<0,05 comparado ao controle**



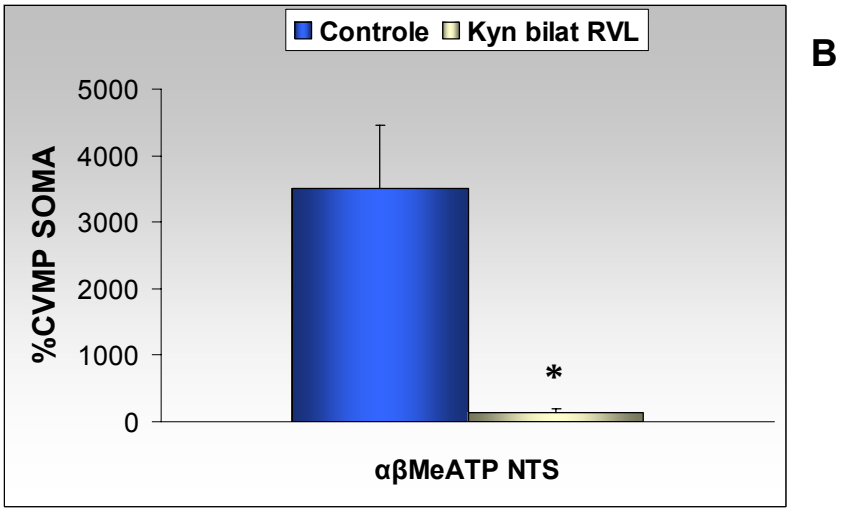


Fig 26 – Média ± EPM das variações máximas de condutância vascular (A) e área total sob a curva de CVMP (B) durante a microinjeção de α,β-methylene ATP (100 pmol/50 nl) no NTS, de um grupo de ratos (N = 6) antes (controle) e após (Kyn bilat RVL) a microinjeção bilateral de ácido quinurênico (5 nmol/50 nl) no RVL. ***p<0,05 comparado ao controle**

5-Participação dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos no RVL durante a estimulação química do NTS com agonista purinérgico A2a

Diversos estudos na literatura sugerem o envolvimento dos subtipos de receptores purinérgicos P2x (ATP) e A2a (Adenosina) na vasodilatação muscular dos membros posteriores de ratos. Dando continuidade no estudo da vasodilatação dos membros posteriores e da interação entre os receptores purinérgicos e glutamatérgicos, procuramos pesquisar os efeitos da ativação dos receptores purinérgicos A2a localizados no NTS sobre as possíveis projeções para o RVL envolvendo o glutamato como neurotransmissor. Estimulando os receptores A2a do NTS com seu respectivo agonista CGS21680 (20 pmol/50 nl) observamos um padrão característico de vasodilatação, e para verificarmos a possível participação do RVL nestas respostas cardiovasculares microinjetamos bilateralmente o antagonista ionotrópico ácido quinurênico (5 nm/50 nl) no RVL.

A Figura 27 apresenta os valores da PAP, FC, PAM e do FSMP de um animal representativo do grupo, nele observamos os ajustes cardiovasculares devido à estimulação química do NTS com o agonista CGS21680 antes (A), 30 minutos após o bloqueio bilateral do RVL com o antagonista ácido quinurênico (B).

Na situação controle a estimulação química do NTS provocou hipotensão, com queda transitória da freqüência cardíaca e discreto aumento do FSMP Figura 27A. Nas curvas de condutância vascular dos membros posteriores na Figura 28 podemos observar vasodilatação nos membros posteriores de moderada intensidade e longa duração. Após a microinjeção bilateral do núcleo RVL com ácido quinurênico houve um intervalo de 30 minutos para bloqueio dos receptores e estabilização dos parâmetros cardiovasculares. Os níveis basais de PAP, PAM,

FC, FSMP e CVMP não modificaram após 30 minutos de bloqueio. Em resposta a microinjeção de CGS21680 no NTS as variações em todos os parâmetros: PAP, PAM, FC, FSMP foram praticamente abolidas. Nos gráficos de condutância da Figura 28 a resposta de aumento transitório da CVMP sob a estimulação dos receptores A2a no NTS foi totalmente reduzida em intensidade e duração.

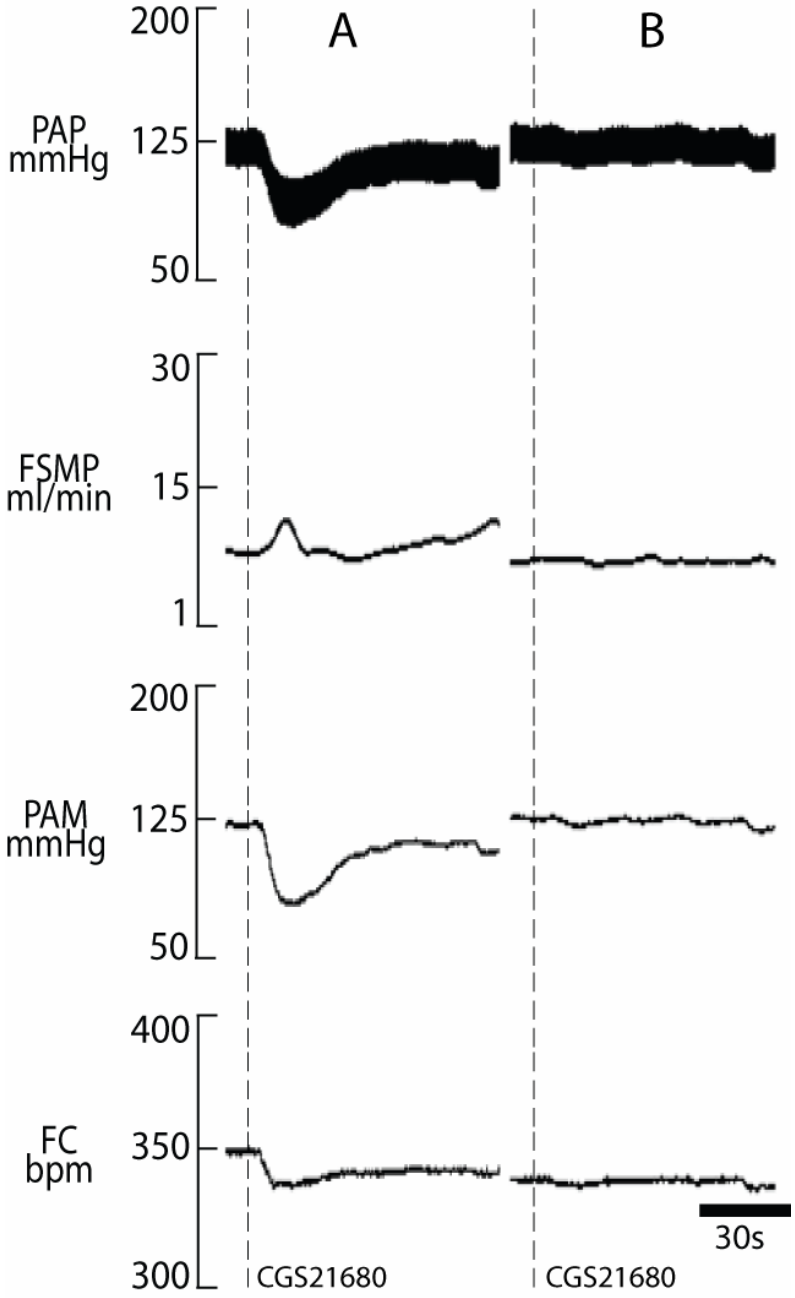


Fig 27 – Registros de pressão arterial pulsátil (PAM), fluxo sangüíneo em membros posteriores (FSMP), pressão arterial média (PAM) e freqüência cardíaca (FC) de um rato anestesiado e paralisado, mostrando ajustes cardiovasculares produzidos pela microinjeção de CGS216880 (20 pmol/50 nl) no NTS antes (A) e após (B) a microinjeção bilateral de ácido quinurênico (5 nmol/50 nl) no RVL. As barras escuras na parte inferior da figura representam o período de estimulação química do NTS.

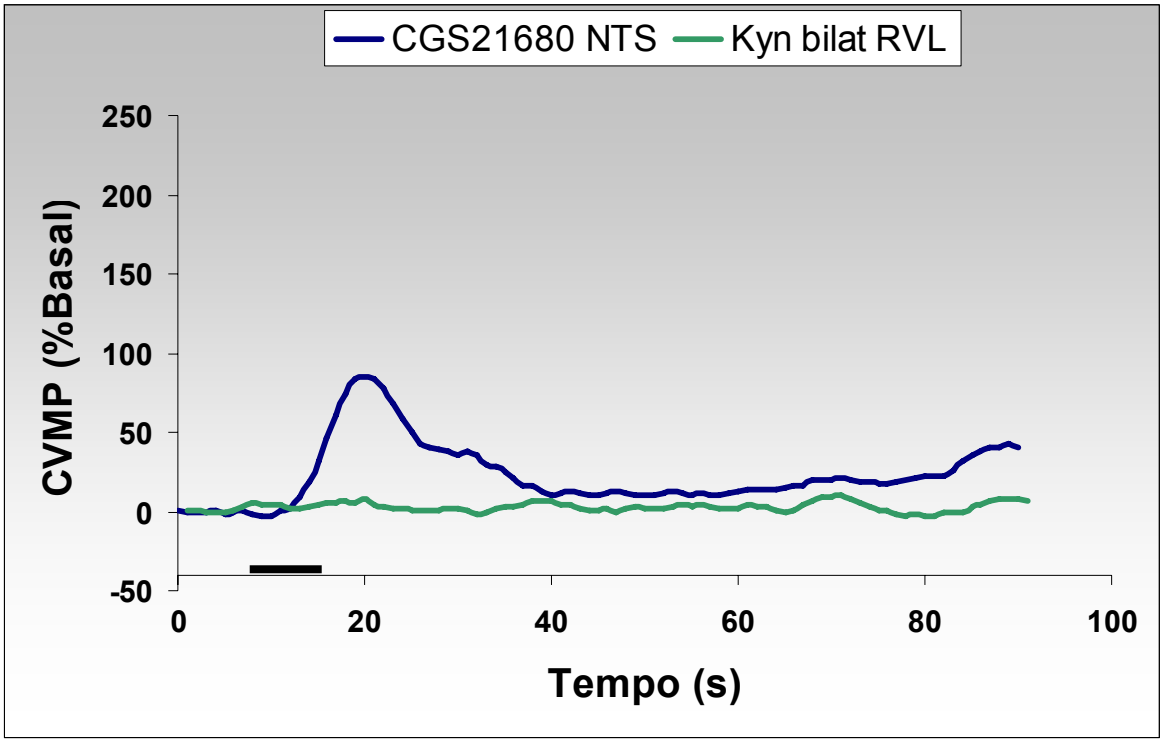


Fig 28 – Efeito da microinjeção de CGS216880 (20 pmol/50 nl) no NTS na condutância vascular dos membros posteriores, antes (linha azul) e após a microinjeção bilateral (linha verde) de ácido quinurênico (5 nmol/50 nl) no RVL. As barras horizontais indicam o período de estimulação química do NTS.

Conforme a Tabela V, neste grupo de animais (N = 6) o bloqueio bilateral dos receptores ionotrópicos glutamatérgicos no RVL com ácido quinurênico (5nmol/50nl) reduziu os níveis basais de FSMP sem alterar os níveis de PAM, FC e CVMP.

A Figura 29 demonstra as variações de PAM, FC e FSMP durante a microinjeção de CGS21680 no NTS. Após o bloqueio glutamatérgico bilateral no RVL a hipotensão ocorrida durante a estimulação do NTS reduziu em relação à situação controle (-41±5 vs -7±2 mmHg), assim como a bradicardia (-33±9 vs -10±3 bpm) e o aumento do FSMP (25±4 vs 5±1% do basal).

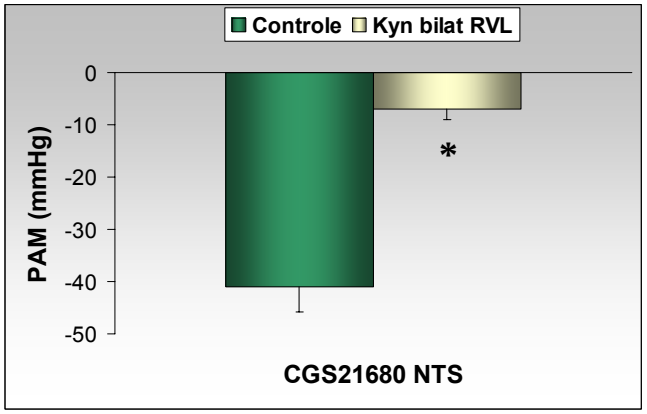
As variações nas curvas de CVMP demonstram após 30 minutos de bloqueio bilateral no RVL que uma nova estimulação do NTS comprovou queda do pico máximo de vasodilatação (81±6 vs 8±2% do basal) e queda da área calculada sob a curva de condutância (1172±179 vs 3±1% do basal) como pode ser observado na Figura 30.

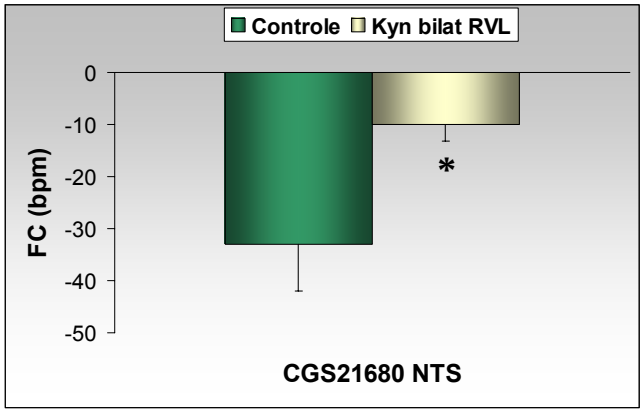
Tabela V – Média e respectivos erro padrão da média dos valores basais de pressão arterial média (PAM), freqüência cardíaca (FC), fluxo sangüíneo dos membros posteriores (FSMP) e condutância vascular dos membros posteriores (CVMP) antes (controle) e após a microinjeção bilateral de ácido quinurênico (5 nmol/50 nl) no RVL.

	Controle	***KYN-BIL***
PAM (mmHg)	128±8	119±12
FC (bpm)	390±26	390±24
FSMP (ml/min)	13±2	8±2 *
CVMP (µl*(min*mmHg)$^{-1}$)	108±61	73±54

N=6

***p<0,05 comparado ao controle**





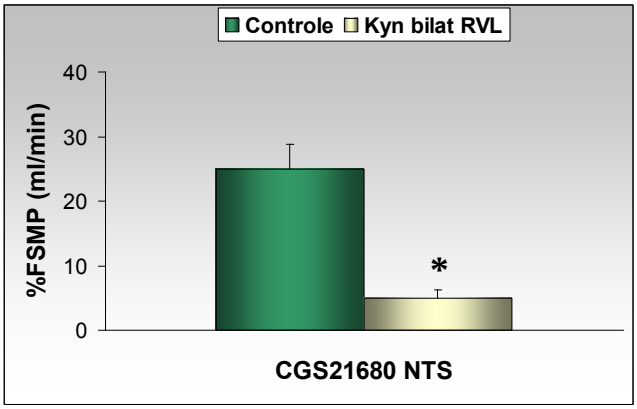


Fig 29 – Média ± EPM das variações de pressão arterial (A), freqüência cardíaca (B) e fluxo sangüíneo dos membros posteriores (C) durante a microinjeção de CGS216880 (20 pmol/50 nl) no NTS, de um grupo de ratos (N = 6) antes (controle) e após (Kyn bilat RVL) a microinjeção bilateral de ácido quinurênico (5 nmol/50 nl) no RVL. ***p<0,05 comparado ao controle**

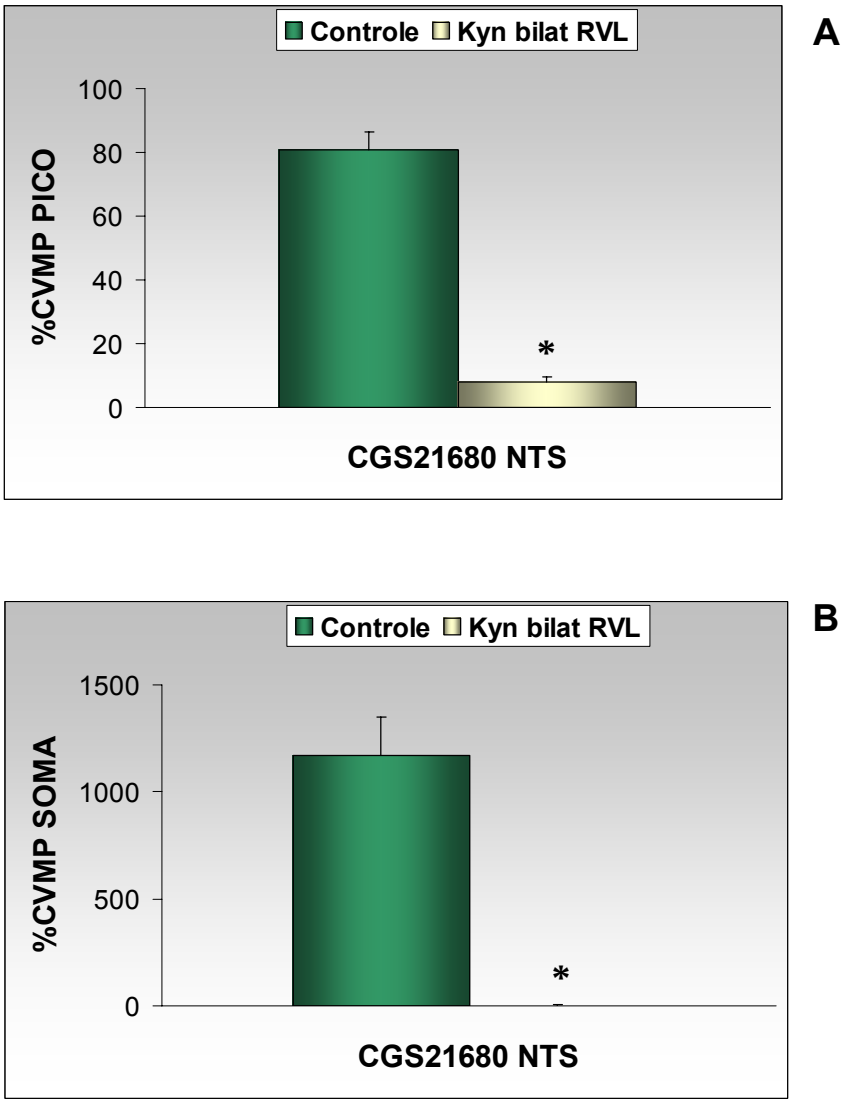


Fig 30 – Média ± EPM das variações máximas de condutância vascular (A) e área total sob a curva de CVMP (B) durante a microinjeção de CGS216880 (20 pmol/50 nl) no NTS, de um grupo de ratos (N = 6) antes (controle) e após (Kyn bilat RVL) a microinjeção bilateral de ácido quinurênico (5 nmol/50 nl) no RVL. ***p<0,05 comparado ao controle**

6-Relação entre os receptores P2x no NTS e a retirada do tônus simpático nas reações de defesa

A estimulação dos receptores P2x no NTS tem demonstrado um padrão de vasodilatação característico nos grupos estudados acima. A vasodilatação dos membros posteriores durante o baroreflexo está integrada no NTS e a estimulação de diversos tipos de receptores mimetiza este padrão de resposta. Sabemos que o principal componente envolvido nessa vasodilatação é a retirada do tônus simpático vasoconstritor. Na tentativa de compreender melhor a relação da retirada do tônus simpático nas respostas vasodilatadoras e sua associação com os receptores P2x no NTS durante o alerta, estudamos o bloqueio de receptores α–adrenérgicos durante a ativação química dos receptores P2x no NTS e durante a EE da HDA.

Para verificarmos o papel dos receptores α–adrenérgicos infundimos sistemicamente fentolamina (1,5 mg/kg) por via endovenosa e para estudarmos participação dos receptores P2x no NTS microinjetamos bilateralmente no NTS o antagonista suramin (100 pmol/50 nl).

A Figura 31 esboça os parâmetros hemodinâmicos de PAP, FC, PAM e FSMP de rato representativo do grupo na situação de EE do hipotálamo no controle (A), 15 minutos após a infusão endovenosa de fentolamina (B) e 30 minutos após a microinjeção bilateral de suramin no NTS (C).

Neste mesmo animal temos um segundo controle demonstrado na Figura 33, com os parâmetros hemodinâmicos de PAP, FC, PAM e FSMP durante a estimulação química dos receptores P2x no NTS com o agonista α,β-methylene

ATP (100 pmol/50 nl) antes (A) e 15 minutos após a infusão endovenosa de Fentolamina (B).

Assim como os padrões replicados nos grupos anteriores, neste animal (representativo do seu grupo) a EE da HDA gerou ajustes cardiovasculares com hipertensão, taquicardia e aumento do FSMP (Figura 31A); a estimulação química dos receptores P2x no NTS realizada por meio da microinjeção de α,β-methylene ATP no NTS evocou hipotensão, bradicardia e discreto aumento do FSMP (Figura 33A). Na curva de CVMP este animal apresentou vasodilatação muscular em ambas situações controle, porém de forma mais intensa durante a EE da HDA (Figuras 32 e 34). Trinta minutos após a administração sistêmica de fentolamina o nível basal de PAM diminuiu, enquanto os demais parâmetros cardiovasculares se mantiveram inalterados. Com a EE da HDA após o bloqueio dos receptores α-adrenérgicos houve queda no aumento do FSMP, uma taquicardia por um período mais prolongado e queda na magnitude da resposta de vasodilatação (Figura 32). Ao realizarmos a microinjeção de α,β-methylene ATP todas as variáveis cardiovasculares sofreram importantes reduções próximas de serem abolidas (Figura 33). Nestas condições a condutância vascular sofrera drástica redução na resposta máxima de condutância e na área sob a curva (Figura 34).

Seguindo nosso roteiro experimental realizamos o bloqueio bilateral dos receptores P2x no NTS através da microinjeção bilateral de suramin no NTS. Os níveis basais permaneceram constantes com exceção de um aumento no nível basal do FSMP. A resposta vasodilatadora reduziu predominantemente em pico comparado com as situações controle e pós fentolamina (1,5 mg/kg) durante a EE

hipotalâmica. Uma vez que as respostas foram abolidas quando estimulamos quimicamente os receptores P2x no NTS após o bloqueio com fentolamina, não observamos nenhuma diferença após o bloqueio bilateral do NTS com suramin.

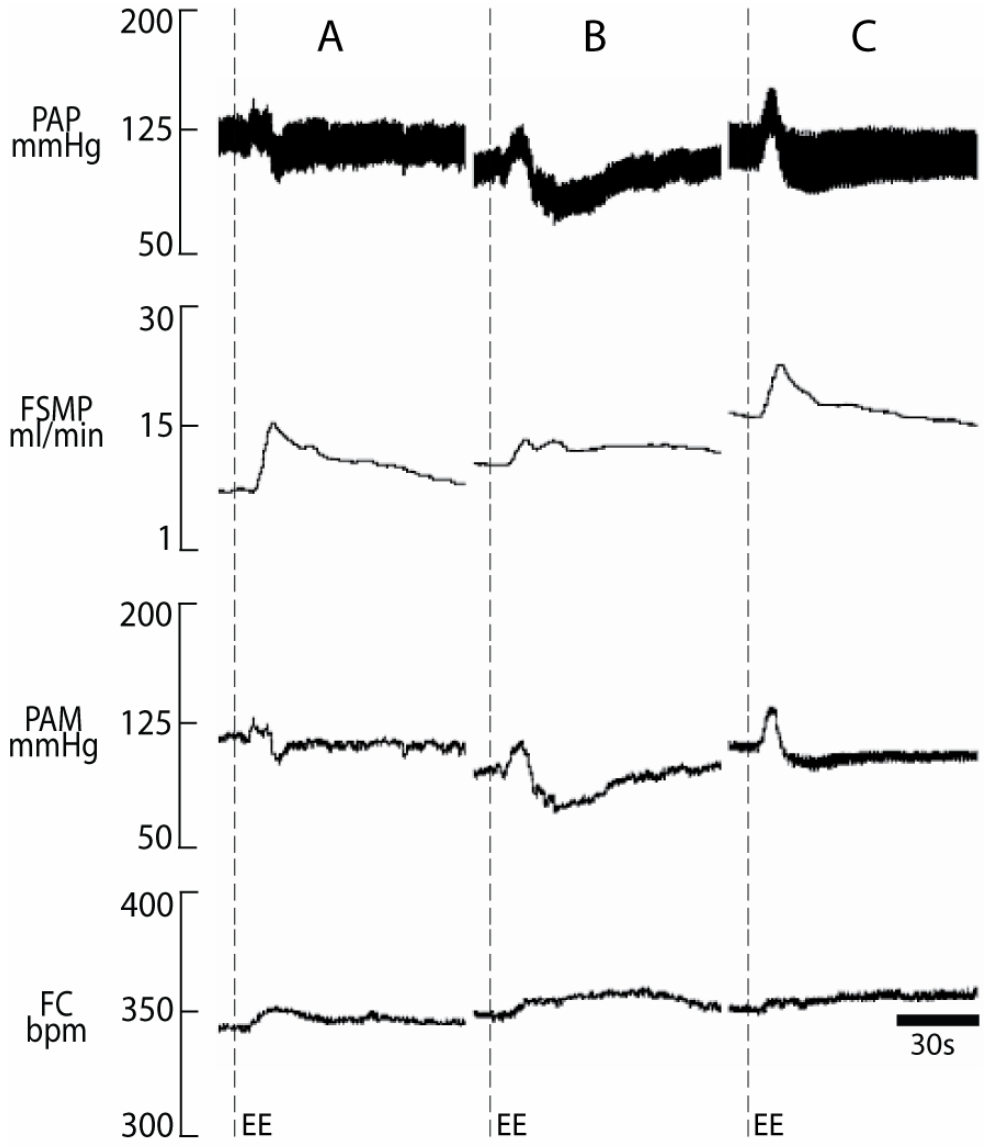


Fig 31 – Registros de pressão arterial pulsátil (PAM), fluxo sangüíneo em membros posteriores (FSMP), pressão arterial média (PAM) e freqüência cardíaca (FC) de um rato anestesiado e paralisado, mostrando ajustes cardiovasculares produzidos pela EE do hipotálamo (150 µA; 0,6 ms; 100 Hz; 6 s) antes (A), após a administração de fentolamina 1,5 mg/kg, i.v. (B) e após a microinjeção bilateral de suramin (100 pmol/50 nl) no NTS (C). As barras escuras na parte inferior da figura representam o período de estimulação do hipotálamo.

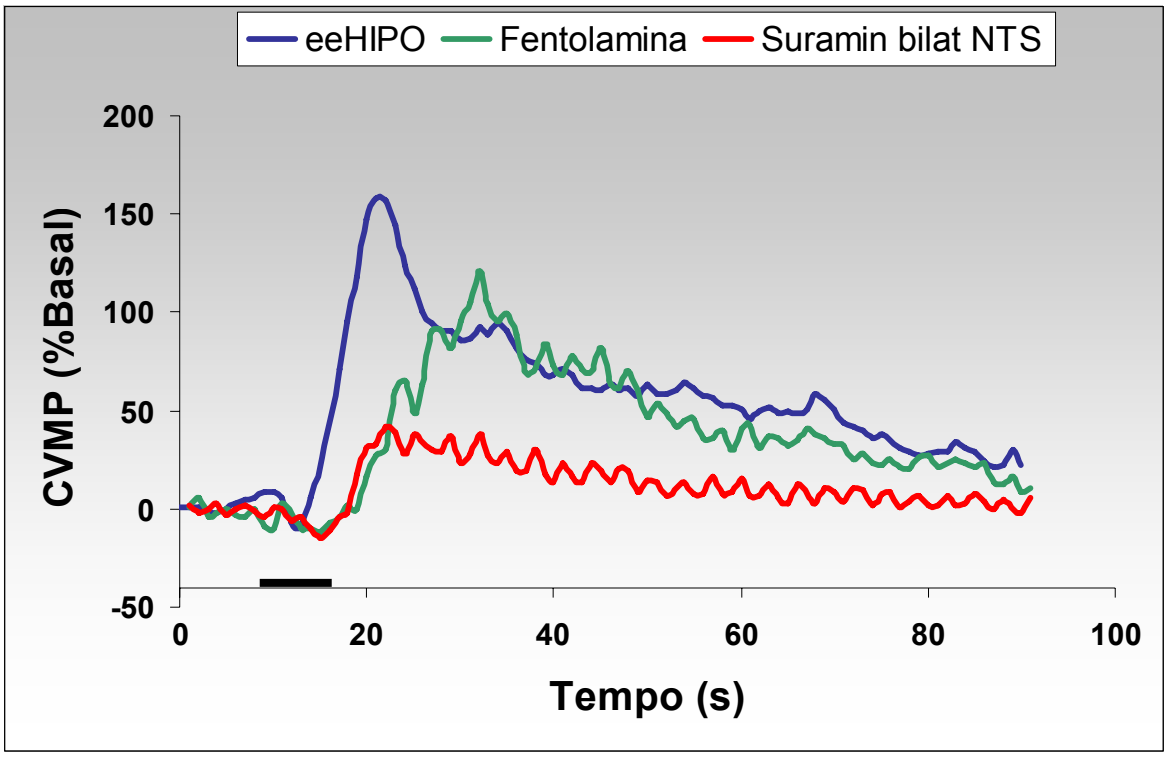


Fig 32 – Efeito da EE do hipotálamo na condutância dos membros posteriores, antes (linha azul), após a administração de fentolamina 1,5 mg/kg, i.v. (linha verde) e após a microinjeção bilateral de suramin (100 pmol/50 nl) no NTS (linha vermelha). As barras escuras na parte inferior da figura representam o período de estimulação do hipotálamo.

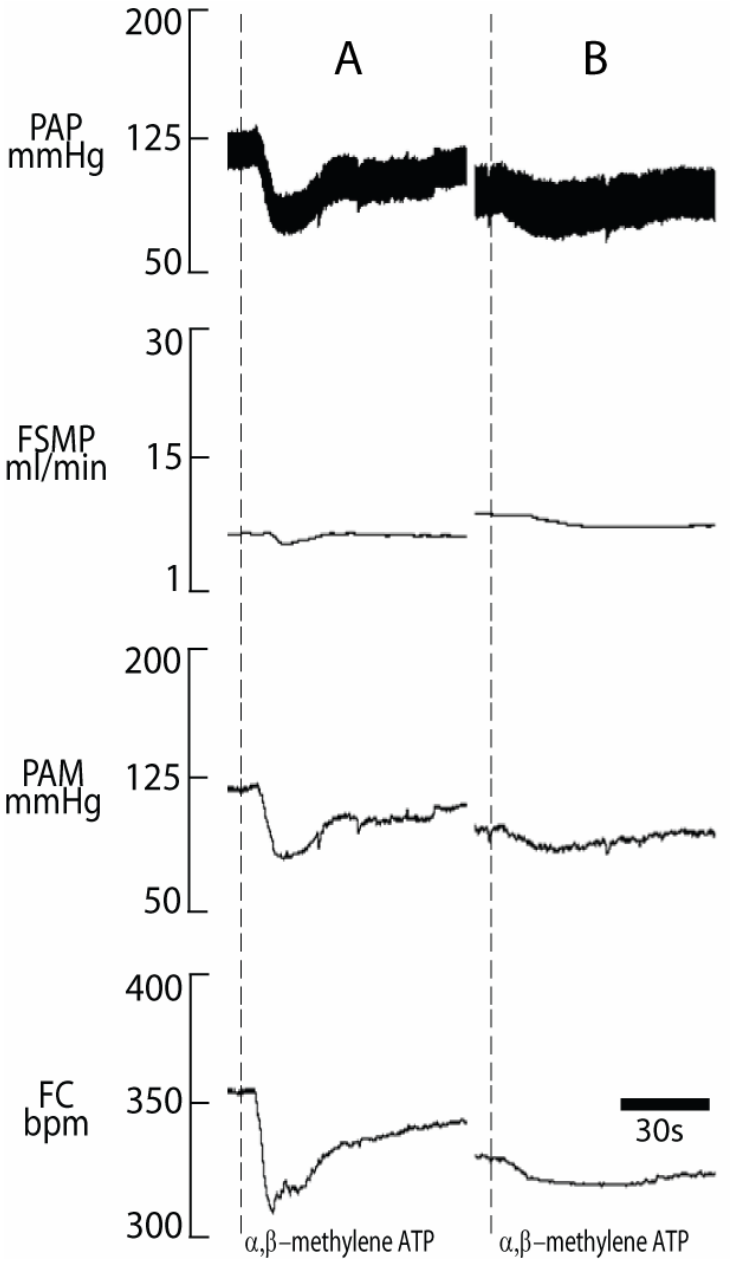


Fig 33 – Registros de pressão arterial pulsátil (PAM), fluxo sangüíneo em membros posteriores (FSMP), pressão arterial média (PAM) e freqüência cardíaca (FC) de um rato anestesiado e paralisado, mostrando ajustes cardiovasculares produzidos pela microinjeção de α,β-methylene ATP (100 pmol/50 nl) no NTS antes (A) e após (B) a administração de fentolamina 1,5 mg/kg, i.v. As barras escuras na parte inferior da figura representam o período de estimulação química do NTS.

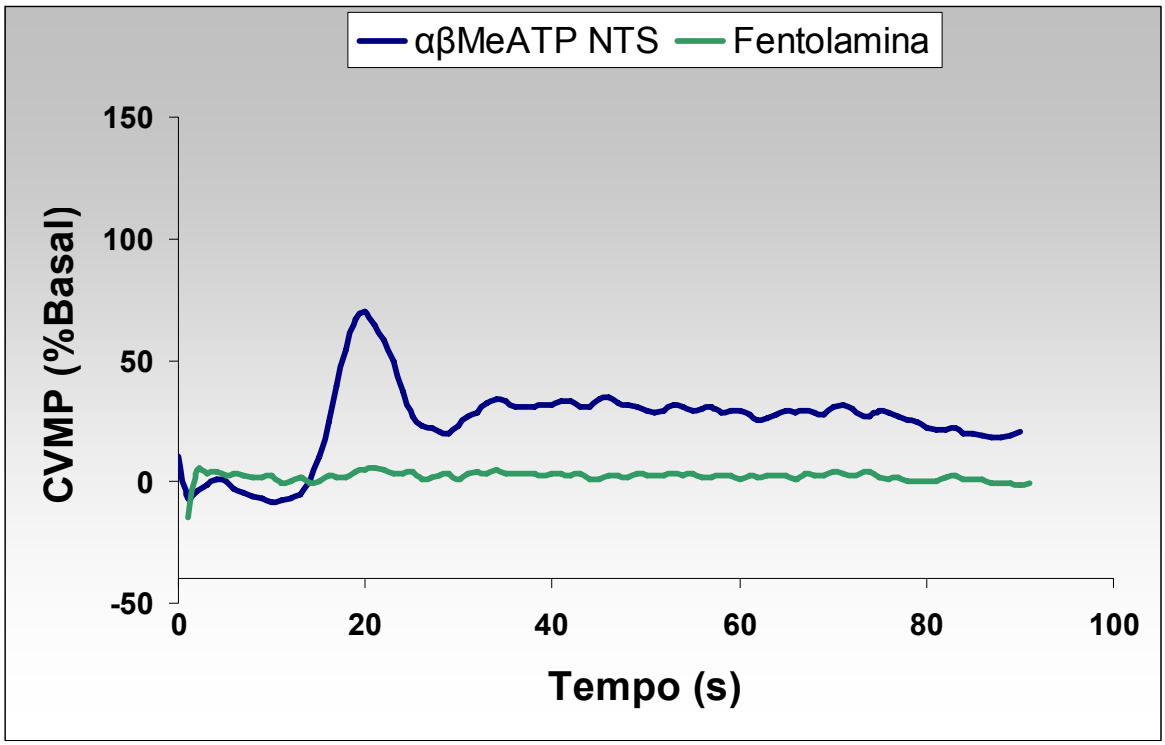


Fig 34 – Efeito da microinjeção de α,β-methylene ATP (100 pmol/50 nl) no NTS na condutância vascular dos membros posteriores, antes (linha azul) antes (A) e após (linha verde) a administração de fentolamina 1,5 mg/kg, i.v. As barras escuras na parte inferior da figura representam o período de estimulação química do NTS.

A análise deste grupo de animais (N = 5) indicou 15 minutos após a administração de Fentolamina, que os níveis basais de PAM reduziram enquanto as demais variáveis não se modificaram. Trinta minutos após o bloqueio dos receptores P2x no NTS nenhuma mudança ocorrera em nenhuma das variáveis cardiovasculares em relação à situação pós fentolamina conforme está expresso na Tabela VI.

Na Figura 35 temos os gráficos de variação dos parâmetros hemodinâmicos deste grupo antes e após a administração de fentolamina e num terceiro momento após a microinjeção bilateral de suramin no NTS. Quando evocamos os ajustes cardiovasculares por meio da EE hipotalâmica, após a infusão de fentolamina, a hipertensão (19±5 vs17±6 mmHg) e a taquicardia (24±5 vs 25±4 bpm) não sofreram alterações conforme visto na Figura 35. Enquanto isso a reposta de aumento do FSMP em resposta à EE da HDA sofreu uma redução (129±28 vs 62±11% do basal). Após o bloqueio bilateral do NTS com suramin não observamos diferenças significativas nas respostas de hipertensão (17±6 vs 18±5 mmHg), taquicardia (25±4 vs 25±6 bpm) e FSMP (62±11 vs 39±8% do basal) sob EE.

Como fora mencionado acima o segundo controle foi realizado por meio da estimulação química dos receptores P2x no NTS seguido da infusão sistêmica de fentolamina. Após o bloqueio dos receptores α-adrenérgicos a hipotensão evocada

pela microinjeção de α,β-methylene ATP no NTS foi reduzida (-38±4 vs -12±2 mmHg) assim como o aumento do FSMP foi drasticamente reduzido (25±10 vs 0±0% basal). A bradicardia sofreu uma queda, porém não chegando a ser significativa (-75±29 vs -40±19 bpm). Estes resultados estão expressos na Figura 37.

A Figura 36 possui as curvas de condutância vascular deste grupo resultante da EE do hipotálamo antes e após o bloqueio sistêmico com fentolamina e da microinjeção bilateral de suramin no NTS. O bloqueio realizado com a administração de fentolamina reduziu o pico de resposta máxima (174±28 vs 94±27% do basal), mas não alterou a área sob a curva de forma significativa (4997±1057 vs 2481±893% basal). Após a inativação dos receptores P2x com a microinjeção de suramin o pico máximo de vasodilatação (94±27 vs 49±4% do basal) não foi alterado mesmo a duração da resposta de condutância (2481±893 vs 854±212 % do basal) também permaneceu inalterada. Quando comparamos as duas situações pós fentolamina e pós suramin no NTS não há diferenças significativas das respostas de vasodilatação, apenas observamos uma redução significante da área sob a curva quando comparamos ambas situações com a situação controle (4997±1057 vs 854±212 % do basal).

Após o bloqueio dos receptores α-adrenérgicos com a administração endovenosa de fentolamina a vasodilatação dos membros posteriores induzida pela estimulação química dos receptores P2x no NTS foi praticamente abolida, havendo diminuição do pico de resposta máxima (61±10 vs 12±3 % do basal) e da

área sob a curva (1478±398 vs 162±106 % do basal) conforme está demonstrado nos gráficos de barras da Figura 38.

Tabela VI – Média e respectivos erro padrão da média dos valores basais de pressão arterial média (PAM), freqüência cardíaca (FC), fluxo sangüíneo dos membros posteriores (FSMP) e condutância vascular dos membros posteriores (CVMP) antes (controle), após administração sistêmica de fentolamina 1,5 mg/kg, i.v. e após a microinjeção bilateral de suramin (100 pmol/50 nl) no NTS.

	Controle	***Fentolamina***	***SUR-BIL***
PAM (mmHg)	116±4	78±7 *	88±8 *
FC (bpm)	398±16	392±30	378±27
FSMP (ml/min)	8±1	6±1	12±3
CVMP (µl*(min*mmHg)$^{-1}$)	69±13	80±13	128±34

N=8

***p<0,05 comparado ao controle**

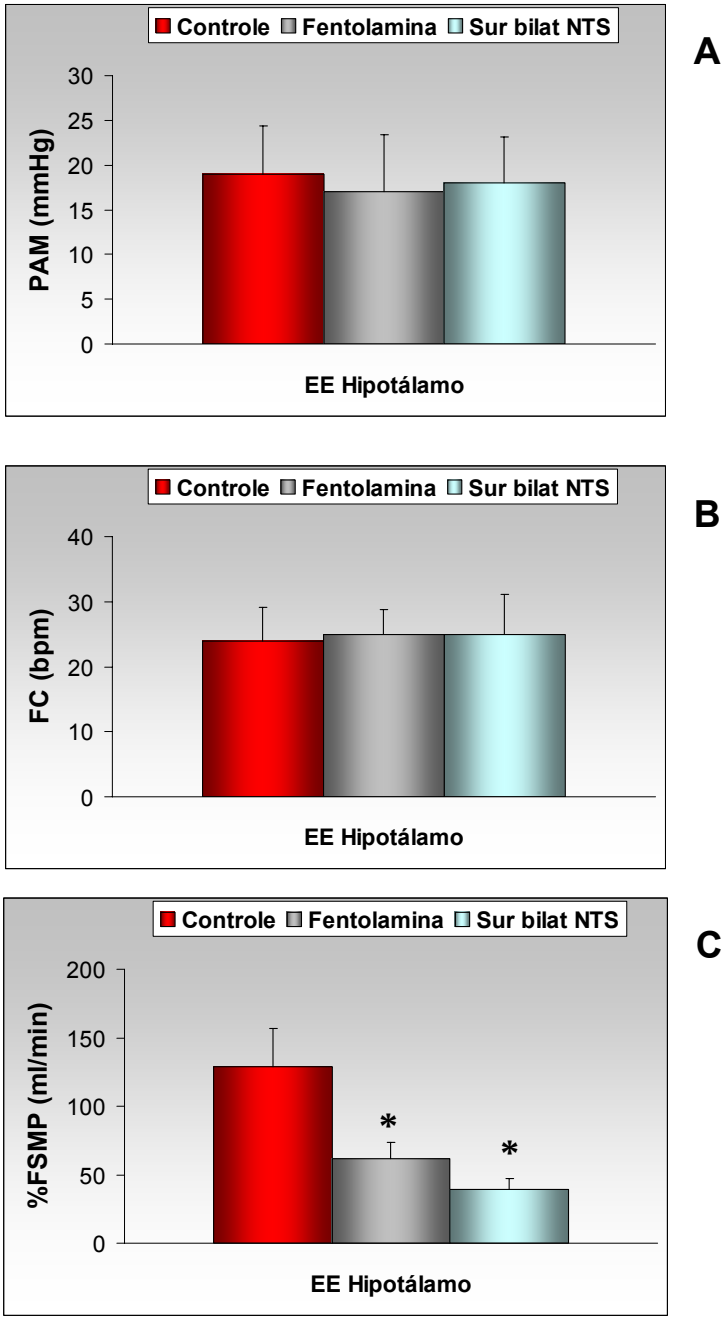
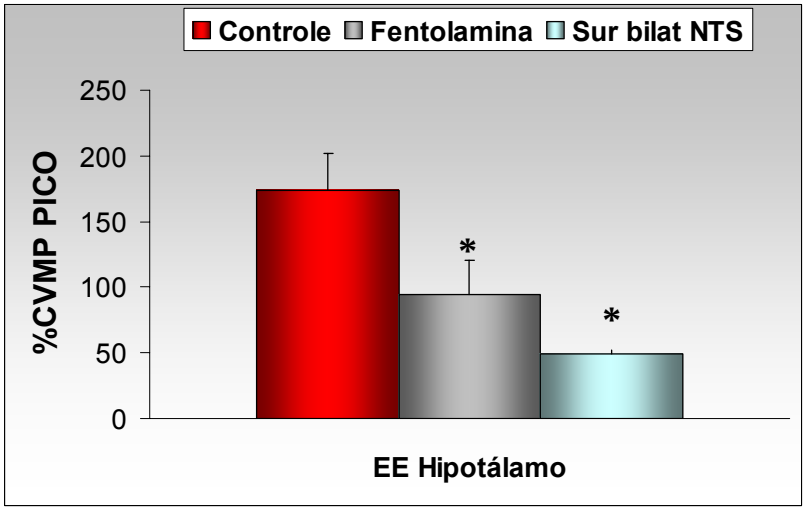


Fig 35 – Média ± EPM das variações de pressão arterial (A), freqüência cardíaca (B) e fluxo sangüíneo dos membros posteriores (C) durante a EE do hipotálamo (150 μA; 0,6 ms; 100 Hz; 6 s), de um grupo de ratos (N = 5) antes (controle), após a administração de fentolamina 1,5 mg/kg, i.v. (Fentolamina) e após a microinjeção bilateral de suramin (100 pmol/50 nl) no NTS (Sur bilat NTS). ***p<0,05 comparado ao controle**



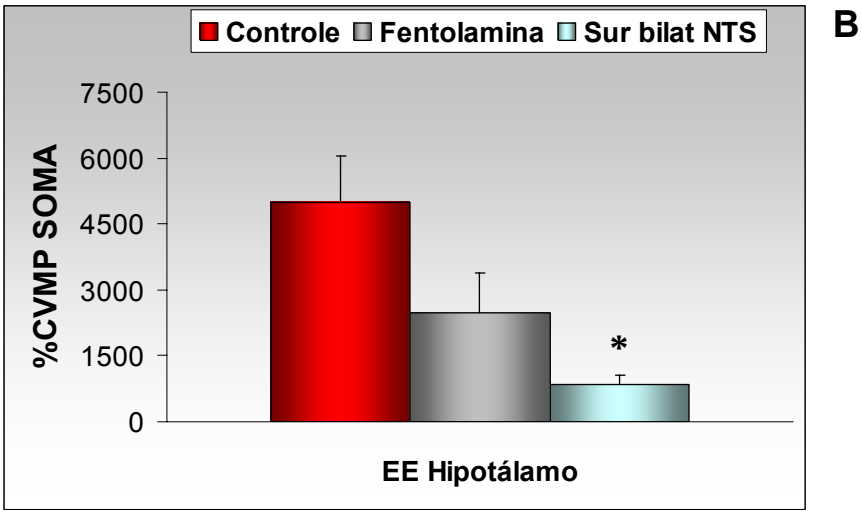


Fig 36 – Média ± EPM das variações máximas de condutância vascular (A) e área total sob a curva de CVMP (B) durante a EE do hipotálamo (150 µA; 0,6 ms; 100 Hz; 6 s), de um grupo de ratos (N = 5) antes (controle), após a administração de fentolamina 1,5 mg/kg, i.v. (Fentolamina) e após a microinjeção bilateral de suramin (100 pmol/50 nl) no NTS (Sur bilat NTS). ***p<0,05 comparado ao controle**

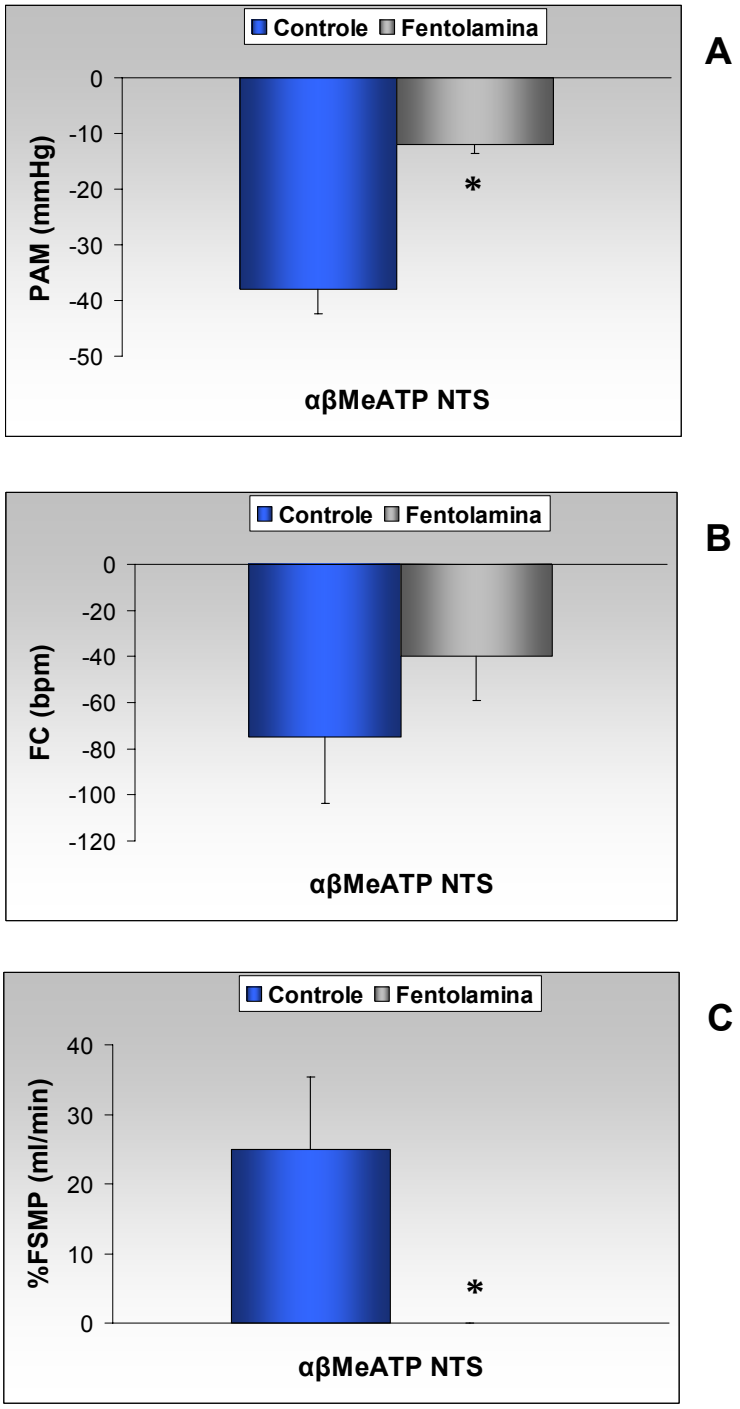


Fig 37 – Média ± EPM das variações de pressão arterial (A), freqüência cardíaca (B) e fluxo sangüíneo dos membros posteriores (C) durante a microinjeção de α,β-methylene ATP (100 pmol/50 nl) no NTS, de um grupo de ratos (N = 5) antes (controle) e após (Fentolamina) a administração de fentolamina 1,5 mg/kg, i.v. ***p<0,05 comparado ao controle**

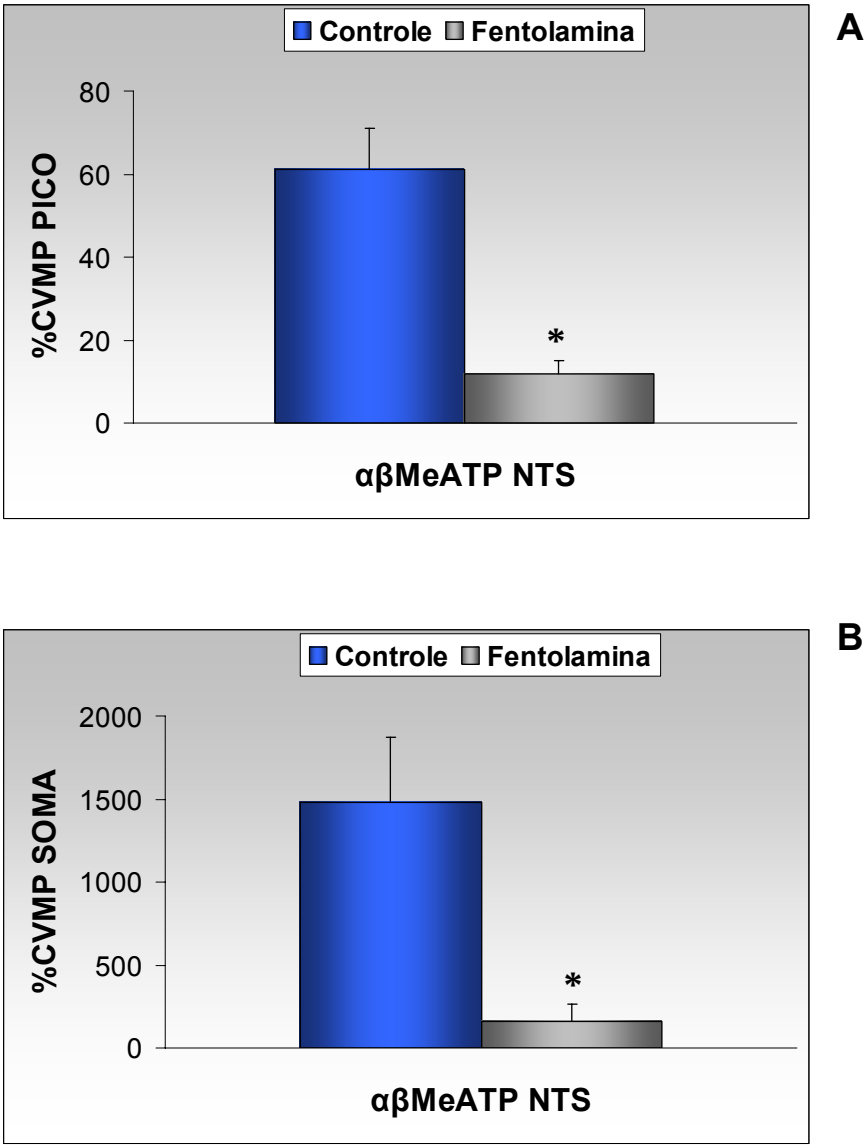


Fig 38 – Média ± EPM das variações máximas de condutância vascular (A) e área total sob a curva de CVMP (B) durante a microinjeção de α,β-methylene ATP (100 pmol/50 nl) no NTS, de um grupo de ratos (N = 5) antes (controle) e após (Fentolamina) a administração de fentolamina 1,5mg/kg, i.v. ***p<0,05 comparado ao controle**

DISCUSSÃO & CONCLUSÕES

Em ratos anestesiados, paralisados e ventilados artificialmente a estimulação elétrica do hipotálamo provocou ajustes cardiovasculares semelhantes àqueles observados nas reações de alerta e defesa. Entre esses ajustes destacamos uma intensa vasodilatação muscular para a musculatura esquelética dos membros posteriores. É provável que esta vasodilatação não esteja restrita ao território dos membros posteriores, mas represente uma resposta vasodilatadora para todo o leito vascular dos músculos esqueléticos.

Nestas mesmas condições a microinjeção de agonistas purinérgicos P2x (α,β-methylene ATP) e A2a (CGS21680) no NTS também produziu uma vasodilatação no mesmo território, porém de menor intensidade e duração. Estas evidências são compatíveis com a hipótese da existência de vias centrais envolvidos na produção de vasodilatação muscular durante os comportamentos de alerta e defesa, essas vias dependem de integrações com núcleos vasomotores no tronco cerebral. A inativação farmacológica de receptores purinérgicos no NTS e glutamatérgicos no RVL promove reduções substanciais desse componente vasodilatador, demonstrando a participação desses receptores na resposta vasodilatadora dos membros posteriores em ratos. O hipotálamo parece constituir uma das estruturas nervosas de maior importância na vasodilatação muscular observado em reações de defesa, aparentemente a área de defesa hipotalâmica (HDA) atuaria, em parte, estimulando neurônios purinérgicos localizados no NTS. A ativação desses receptores no NTS parece envolver a ativação de neurônios no RVL por meio de sinapses glutamatérgicas. Estudando os núcleos vasomotores do tronco cerebral pudemos demonstrar que possivelmente existe uma relação entre a ativação dos receptores purinérgicos no NTS e projeções glutamatérgicas para o RVL,

mediando respostas de vasodilatação muscular. Finalmente demonstramos a interação dos receptores purinérgicos ionotrópicos P2x no NTS com a retirada do tônus simpático nas repostas vasodilatadoras da reação de alerta.

Em 1970 Burnstock (Revisado em Ralevic e Burnstock, 1998) propôs o papel do ATP e seus derivados na neurotransmissão do sistema nervoso denominando-a de “purinérgica”, porém seu papel no sistema nervoso ainda se restringia somente ao sistema nervoso periférico. Em seguida Wu e Phillis (1978) evidenciaram em seus estudos a distribuição uniforme do ATP nos cérebros de ratos, evidenciando e propondo a participação da transmissão purinérgica no sistema nervoso central.

Numa série de trabalhos Scislo e colaboradores (Scislo & O´Leary, 2002; Scislo & O´Leary, 1998; Scislo et al., 2002) demonstraram que estes receptores estavam intimamente relacionados com supostas vias neurais do tronco cerebral ativadas durantes ajustes cardiovasculares. Mensurando a pressão arterial, a freqüência cardíaca e a atividade simpática neural em ratos anestesiados, caracterizaram os efeitos da estimulação química e do bloqueio desses receptores no NTS. Quando os receptores A1 são estimulados existe uma simpatoexcitação com aumento da pressão arterial, bradicardia e aumento da atividade simpática lombar, renal e adrenal. A estimulação do subtipo A2a provoca hipotensão e bradicardia com aumento da atividade nervosa simpática para adrenal, o segmento lombar manteve-se inalterado enquanto houve diminuição na região renal, nesses achados os autores observaram que a duração dessas respostas durava em torno de 30 minutos. Finalmente estimulação química dos receptores P2x no NTS provocou queda transitória da pressão arterial, bradicardia e redução da atividade simpática em todos os

territórios mensurados. A estimulação dos subtipos de receptores purinérgicos A1, A2a e P2x no NTS demonstrou envolver alterações na atividade simpática de diferentes territórios com padrões distintos de ajustes no fluxo sanguineo regional. Além desse fator, a ativação desses diferentes subtipos purinérgicos pode participar em diferentes momentos desses ajustes.

A ativação de receptores P2x no NTS é capaz de desencadear intensa e rápida vasodilatação em território muscular nos membros posteriores de ratos anestesiados (Barraco et al., 1996) enquanto os receptores A2a participam em ajustes vasodilatadores de menor magnitude e longa duração (Barraco et al., 1996; Kitchen et al., 2001). O subtipo P2x está envolvido com uma simpatoinibição generalizada demonstrando fortes evidências de estar envolvido com um componente de ajuste rápido do fluxo sangüíneo enquanto receptores A2a, por sua vez, apresentam um aumento da atividade neural para adrenal resultando no fenômeno vasodilatador prolongado.

Esta série de trabalhos estudou a atividade simpática na regulação simpática do fluxo sangüíneo de diversos territórios viscerais. Quando unimos esses dados com outros achados envolvendo a análise do fluxo sangüíneo, obtemos fortes evidências de um possível circuito no tronco cerebral responsável pela regulação da vasodilatação em membros posteriores de ratos, o qual é dependente de ativações purinérgicas.

Uma categoria de comportamentos na qual também observamos importante vasodilatação no leito muscular são as reações de defesa e alerta, presente em situações como de “luta ou fuga”.

Em 1962 Abrahams e colaboradores demonstraram que a estimulação elétrica das áreas de defesa hipotalâmica em gatos anestesiados

desencadeava ajustes comportamentais semelhantes às reações de alerta e defesa (Abrahams et al., 1962). Nestes experimentos os ajustes vegetativos eram semelhantes entre si independente da natureza do estímulo estressor, demonstrando que a estimulação elétrica era um meio confiável para replicar os padrões comportamentais observados nas reações de defesa.

Em estudos com ratos anestesiados de Yardley e Hilton (1986,1987) utilizaram a estimulação da HDA para evocar ajustes cardiovasculares com aumento da pressão arterial, aumento da freqüência cardíaca e vasodilatação muscular nos membros posteriores. Estudos mais recentes de (Davisson et al., 1997; Possas et al., 1997; Cravo et al., 2003; Ferreira-Neto et al., 2005) indicam a vasodilatação como resultante de três principais mecanismos: 1) retirada do tônus simpático vasoconstritor, 2) liberação de catecolaminas pela medula da adrenal, 3) liberação de óxido nítrico e fatores nitrosilados.

Os ajustes hemodinâmicos observados neste trabalho decorrentes à EE da HDA foram compatíveis não somente com os padrões descritos acima, mas com padrões observados por outros autores que estimularam a mesma área hipotalâmica (Kiely e Gordon, 1994; St Lambert et al., 1997). Nosso estudo utilizou sistematicamente como parâmetro do sítio de estimulação elétrica, a área ventral à lâmina medial externa, perifornicial e lateral ao terceiro ventrículo.

A existência de possíveis vias da HDA se projetando para o NTS na superfície dorsal do bulbo já está relatada na literatura (Spyer et al., 1997). Segundo este modelo os sítios do NTS que estariam recebendo as projeções da HDA participariam em ajustes hemodinâmicos por estimulação da mesma. Diversos autores aceitam a teoria de comunicação entre áreas hipotalâmicas e

o NTS. Segundo esses autores, ativando as respostas de alerta a HDA mobiliza o sistema cardiorespiratório por meio de inibição do barorreflexo (Mifflin et al., 1988; Sevóz-Couche et al., 2003) enquanto o quimiorreflexo estaria sendo facilitado (Spyer et al., 1997; Rocha et al., 2006) permitindo o desenvolvimento da hipertensão e hiperventilação que acompanham estas reações.

O subtipo de receptor A1 para adenosina está densamente concentrado nas regiões caudais do NTS, sugerindo uma importante participação dos receptores A1 na modulação dos ajustes cardiovasculares (St Lambert et al., 1996; Carretiero & Fior-Chadi, 2004). St Lambert e colaboradores (1994,1996,1997) pesquisaram o bloqueio desses receptores no NTS em situações de estimulação elétrica (EE) hipotalâmica e observaram redução parcial na resposta hipertensora. Os receptores A1 do NTS estariam envolvidos, ao menos em parte, no ajuste transitório da pressão arterial nas situações de alerta sem influir sobre a regulação da freqüência cardíaca e do fluxo sangüíneo muscular.

A transmissão purinérgica no NTS está relacionada com fenômenos de vasodilatação muscular. A ativação dos receptores purinérgicos por meio de microinjeção dos seus respectivos agonistas produz vasodilatações de diferentes características, seja pela regulação do tônus vasomotor ou pela liberação de catecolaminas. No entanto poucos estudos analisaram o papel dos receptores P2x (ATP) e A2a (adenosina) na vasodilatação muscular provocada pela EE do hipotálamo. A maioria destes trabalhos buscou determinar a participação dos receptores A1 no componente pressor (St

Lambert et al., 1994, 1996, 1997; Spyer et al., 1997, De Paula & Machado, 2001).

Dale et al (2002) demonstrou, por meio da implantação de um sensor para adenosina e seus compostos derivados, rápida e intensa liberação de adenosina em regiões intermediárias do NTS provocado pela EE do hipotálamo. Estudos com autorradiografia e imuno-histoquímica (Tuyau et al., 1997; Kanjhan et al., 1999; Thomas et al., 2000; Yao et al., 2001) também mostraram uma alta densidade de receptores P2x e A2a em outras regiões mais intermediárias e rostrais do NTS. No rato, os sítios onde estão localizados os receptores purinérgicos do NTS intermédio coincidem com as regiões responsáveis pelas aferências do barorreflexo (Dias et al., 2005) e com os sítios de resposta cardiovascular frente a microinjeção de glutamato (Colombari et al., 1996; Sapru, 2002).

Em nossos experimentos a estimulação elétrica da HDA gerou uma vasodilatação no leito muscular esquelético de membros posteriores compatível com resultados de outros trabalhos (Yardley & Hilton, 1986; Cravo et al., 2003; Ferreira-Neto et al., 2005). A microinjeção de suramin (antagonista P2x de amplo espectro) bilateralmente no NTS provocou redução intensa da resposta vasodilatadora durante a estimulação elétrica do hipotálamo. É importante notar que este bloqueio reduziu a curva de condutância vascular em pico e área sob a curva, isto é, nos componentes de intensidade e duração da vasodilatação. Estes dados vão de encontro com a hipótese proposta na literatura de que receptores P2x estariam relacionados primordialmente com um componente de ajuste rápido dos parâmetros hemodinâmicos (Scislo & O´Leary, 2000).

Para excluirmos a possibilidade de nossos resultados serem devidos à ineficácia do bloqueio sobre os receptores P2x no NTS ou apenas uma eficácia parcial, realizamos a estimulação química desses receptores nos mesmos sítios com a microinjeção do seu respectivo agonista α,β-methylene ATP, mimetizando o papel do ATP antes e após o bloqueio bilateral do NTS com suramin.

O suramin está descrito na literatura como um antagonista P2x1, P2x2, P2x3, P2x5, P2x7 e P2y2. Pelo fato de possuir um amplo espectro, muitos autores discutem a possibilidade de haver um bloqueio em receptores glutamatérgicos. De fato Ralevic et al (1999) demonstraram em neurônios do RVL que a microinjeção de suramin, 200 mM, há um bloqueio dos receptores glutamatérgicos desses neurônios, porém o mesmo não ocorre quando se utilizava 20 mM. Paton et al (2002) utilizaram no NTS suramin na quantidade 2mM (a mesma utilizada em nosso estudo) bloqueando a ativação dos receptores P2x pelo agonista α,β-methylene ATP, sem perturbar a atividade do nervo frênico e a freqüência cardíaca e sem bloquear as respostas evocadas pela microinjeção de agonistas glutamatérgicos dos subtipos NMDA e AMPA. Outros trabalhos descrevem microinjeções no NTS com uma quantidade até cinco vezes maiores (10 mM) para realizar o bloqueio dos receptores P2x (Scislo et al., 1998, Ergene et al., 1994). De modo a evitar efeitos inespecíficos sobre a transmissão glutamatérgica, em nosso estudo optamos por utilizar a dose proposta por Paton e seus colaboradores.

Os resultados obtidos em nosso protocolo demonstraram que o suramin foi capaz de abolir as respostas cardiovasculares provocadas pela microinjeção do agonista P2x. Em diversos experimentos pudemos observar uma reversão

das respostas após 80 min da microinjeção de suramin quando realizamos a estimulação com α,β-methylene ATP. Isto permite descartar a hipótese de que a redução na resposta vasodilatadora observada após suramin fosse devida a um bloqueio inespecífico ou lesão dos neurônios do NTS.

O agonista P2x α,β-methylene ATP é farmacologicamente seletivo para receptores purinérgicos ionotrópicos dos subtipos P2x1-P2x3, sobre os quais também são bloqueados com o antagonista suramin. O α,β-methylene ATP possui uma propriedade farmacológica diferente do ATP que favorece nosso estudo, o ATP extracelular é facilmente convertido em adenosina dificultando uma análise mais precisa dos resultados. O fato de o composto α,β-methylene ATP não ser catabolizável certifica uma ação exclusiva sobre os receptores ionotrópicos para o ATP. Ensaios experimentais anteriores demonstraram que a catabolização do ATP em adenosina é um fator complicador da análise dos padrões cardiovasculares em situações de microinjeção no NTS de ratos acordados. Estes autores necessitaram utilizar um bloqueio englobando variados tipos de antagonistas para excluir efeitos sobre outros receptores, como de adenosina e do glutamato (De Paula et al., 2004). Além disso, a microinjeção no NTS de α,β-methylene ATP (100 pmol/50 nl) utilizada neste estudo já fora previamente descrita como sendo suficiente para desencadear uma vasodilatação muscular de magnitude máxima estudando o seu comportamento dose-resposta (Barraco et al., 1996).

O bloqueio observado em nossa série de experimentos condiz com as observações descritas na literatura (Ergene et al., 1994; Scislo et al.,1998; Paton et al., 2002) em que a dose de suramin utilizada em nosso estudo bloqueou receptores P2x frente à microinjeção do agonista α,β-methylene ATP.

É importante ressaltar a incapacidade do Suramin bloquear todos os subtipos de receptores P2x, tais como os receptores P2x4, P2x6 e os receptores P2y, com exceção do P2y2. Diante disso não podemos excluir a hipótese de a vasodilatação restante, decorrente da EE da HDA após o bloqueio com suramin, ser devida aos subtipos de receptores remanescentes (não bloqueados pelo Suramin) assim como ao papel dos receptores A2a (adenosina) e glutamatérgicos na vasodilatação, como será discutido a seguir.

Em experimentos com ratos anestesiados, Scislo e O´Leary (2000) concluíram que os ajustes rápidos no sistema cardiovascular observada na estimulação dos receptores P2x no NTS subpostremal eram mediados por neurônios glutamatérgicos na mesma região do NTS. Nesse estudo a situação controle foi caracterizada por uma hipotensão, bradicardia e queda da atividade simpática para os segmentos renal e adrenal. Bloqueando os receptores glutamatérgicos do NTS com ácido quinurênico, praticamente aboliu-se os ajustes hemodinâmicos rápidos (fase primária da resposta) provocados pela microinjeção de α,β-methylene ATP no NTS. Neste mesmo trabalho, o ácido quinurênico não foi capaz de bloquear o componente de longo prazo da resposta, nem os ajustes cardiovasculares prolongados devido à estimulação dos receptores A2a com o agonista CGS21680. Segundo esses autores os receptores P2x, responsáveis pelo componente rápido de redução da atividade simpática renal e para a adrenal, estariam localizados em interneurônios purinérgicos no NTS, estimulando uma via eferente glutamatérgica, ou estariam atuando no mesmo neurônio por meio de co-transmissão com o glutamato. Burnstock (1999, 2004) já havia proposto modelos de cotransmissão do ATP envolvendo liberação de diversos tipos de neurotransmissores e

neuromoduladores, como o neuropeptídeo Y, a noradrenalina, o polipeptídeo vasoativo intestinal, o GABA entre outros e até mesmo com o glutamato. Outros autores também discutiram uma possível interatividade entre os receptores purinérgicos e glutamatérgicos no NTS. Farmacologicamente já foi demonstrado que o suramin é uma droga potencialmente capaz de bloquear receptores de glutamato (Gu et al., 1998; Nakatsuka & Gu, 2001; Suzuki et al., 2004). Em experimentos anteriores observamos uma vasodilatação remanescente após o bloqueio bilateral do NTS com Suramin durante a estimulação elétrica do hipotálamo. Um dos principais componentes relacionado à vasodilatação remanescente poderia ser atribuído aos receptores glutamatérgicos.

Se o modelo proposto por Scislo e O´Leary (2000) estiver correto os receptores para glutamato são os principais responsáveis pela via eferente purinérgica do NTS nos ajustes cardiovasculares. Seguindo este raciocínio, em reações de alerta e defesa o bloqueio dos receptores P2x ou dos receptores glutamatérgicos deve provocar reduções semelhantes nos ajustes cardiovasculares. Microinjetando ácido quinurênico bilateralmente no NTS e, após isso, estimulando o hipotálamo eletricamente, obtivemos bloqueio parcial da vasodilatação muscular dos membros posteriores de ratos. Os resultados deste grupo indicaram uma redução na magnitude da resposta vasodilatadora em proporções muito próximas à redução encontrada no primeiro grupo experimental com suramin.

A semelhança entre o grupo de bloqueio do NTS com suramin e com ácido quinurênico, ambos frente a estimulação hipotalâmica, encontrado em nossos ensaios experimentais suporta o mecanismo de interação purinérgica-

glutamatérgica proposto por Scislo e seus colaboradores (Scislo e O`Leary 2000), assim como o modelo de co-transmissão proposto por Burnstock (1999, 2004). É interessante ressaltar que nossos dados reforçam esse mecanismo proposto, porém destacamos o fato de nossos experimentos remeterem exclusivamente aos ajustes vasodilatadores presenciado nos comportamentos de defesa.

Outro foco de interesse em nosso estudo foi analisar a interação entre o NTS e o núcleo RVL nas respostas vasodilatadoras. Guertzenstein et al (1978) realizaram experimentos administrando glicina no núcleo RVL de ratos e assim bloquearam os ajustes cardiovasculares evocados nas reações de alerta e defesa, reduzindo principalmente o tônus vasoconstritor simpático. Muitos estudos posteriores descreveram o RVL como centro vasomotor, representando o braço eferente de ajustes cardiovasculares gerados pela estimulação de aferentes cutâneos e musculares (Stornetta et al., 1989; Kiely & Gordon 1994; Possas et al., 2001). Dentre os diversos ajustes cardiovasculares Possas e colaboradores (2001) observaram uma resposta vasodilatadora muscular no membro posterior ipsolateral quando estimulavam eletricamente o nervo ciático de ratos anestesiados. Segundo esses autores a vasodilatação por redução do tônus vasoconstritor simpático decorrente da inibição seletiva de neurônios do RVL por sinapses GABAérgicas.

De fato Cravo et al (1991) haviam demonstrado que a regulação do barorreflexo, em situações de estimulação do nervo aórtico depressor, dependia de projeções inibitórias das porções rostrais da área caudoventrolateral do bulbo (CVL) para o RVL por uma modulação simpatoinibitória. Estes autores realizaram essa diferenciação topográfica entre

os dois núcleos microinjetando e lesando essas regiões com ácido caínico. Este composto é excitotóxico em tecido nervoso o qual é capaz de excitar receptores para cainato e em seguida lesa o sítio de injeção.

Meeley e colaboradores (1985), na tentativa de descobrir a origem da inibição tônica GABAérgica sobre os neurônios adrenérgicos C1 do RVL, concluiram que projeções do NTS para o RVL não são GABAérgicas, mas neurônios GABAérgicos podem estar contidos no próprio RVL inibindo os neurônios da área C1.

Posteriormente Cravo et al (2003) microinjetaram ácido quinurênico, um antagonista ionotrópico não seletivo para receptores glutamatérgicos, no RVL bloqueando a resposta vasodilatadora nos membros posteriores de ratos durante a EE hipotalâmica. Nossos resultados demonstraram que a vasodilatação muscular e os ajustes cardiovasculares provenientes da estimulação de receptores P2x ou dos receptores A2a no NTS dependem de projeções glutamatérgicas para o RVL. A inativação funcional dos receptores glutamatérgicos no RVL com ácido quinurênico aboliu a hipotensão, a bradicardia e a vasodilatação dos membros posteriores provocados pela microinjeção de α,β-methylene ATP ou de CGS21680 no NTS intermédio.

Em conjunto, os nossos resultados e os estudos prévios sobre a participação do RVL nos ajustes hemodinâmicos confirmam uma possível projeção direta do NTS para o RVL sem a intermediação do núcleo CVL. Aparentemente esta via estaria envolvida nos fenômenos de vasodilatação, foi demonstrado anteriormente por Cravo et al (2003) que o bloqueio do RVL não alterou os ajustes transitórios de pressão arterial (hipertensão) e freqüência cardíaca (taquicardia) na EE do hipotálamo. No entanto, a vasodilatação dos

membros posteriores evocada pela estimulação química dos receptores P2x no NTS foi totalmente abolida juntamente com os componentes hipotensor e bradicárdico, devido ao bloqueio do RVL com ácido quinurênico.

Esse bloqueio implica na possibilidade de as projeções diretas do NTS para o RVL propostas por Meeley et al (1985) estarem envolvidas nos ajustes cardiovasculares de pressão, freqüência e fluxo sangüíneo por ativação de receptores purinérgicos. Nas reações de alerta e defesa, por outro lado, este mecanismo participaria somente no componente de vasodilatação muscular. Neste modelo o glutamato estimularia interneurônios GABAérgicos localizados no próprio RVL.

Segundo nossa hipótese, o controle da vasodilatação muscular ocorre por meio independentes mecanismos de controles da pressão arterial e da freqüência cardíaca nas reações de alerta provenientes da ativação da HDA. Entretanto, no tronco cerebral, este modelo está integrado aos mecanismos de ajuste da freqüência cardíaca e pressão arterial. Finalmente no NTS a ativação deste mecanismo vasodilatador pela ativação de receptores purinérgicos, liberaria glutamato nas suas terminações nervosas localizadas no RVL, excitando interneurônios GABAérgicos localizados do próprio RVL. A ativação GABAérgica seria responsável pelos componentes bradicádico e hipotensor observados, resultantes da inibição de projeções eferentes do RVL.

Os componentes centrais envolvidos nos ajustes cardiovasculares de vasodilatação em território muscular analisados até este ponto se restringem aos núcleos RVL e NTS do tronco cerebral e a área de defesa hipotalâmica. Em virtude disso outra perspectiva de nosso estudo foi tentar compreender a

relação entre a estimulação dos receptores P2x localizados no NTS e os possíveis componentes periféricos responsáveis pela vasodilatação do alerta.

Yardley e Hilton (1987) haviam estudado os componentes presentes na vasodilatação muscular dos membros posteriores de ratos associando a adrenalectomia bilateral com a administração endovenosa de guanetidina durante a EE hipotalâmica. Esta associação aboliu a vasodilatação muscular, porém devido ao aumento nos níveis basais de condutância vascular outros mecanismos vasodilatadores estariam possivelmente sendo mascarados. Durante a emissão dos comportamentos de defesa observamos uma vasodilatação composta por dois componentes. A primeira etapa consiste numa fase rápida desse ajuste e resume-se na retirada do tônus simpático vasoconstritor (Ferreira-Neto et al., 2005), semelhante a simpatoinibição observada no barorreflexo por Scislo et al (1998a), enquanto o segundo componente é uma resposta prolongada. A fim de demonstrar a participação dos receptores α-adrenérgicos na retirada do tônus simpático vasoconstritor, Ferreira-Neto e colaboradores administraram sistemicamente fentolamina, um antagonista competitivo para receptores α1 e α2 (Ferreira-Neto et al., 2005). Nesse estudo o bloqueio dos receptores α-adrenérgicos associado à adrenalectomia reduziu a magnitude da vasodilatação em aproximadamente 150%. A participação dos receptores P2x do NTS em ajustes cardiovasculares foi discutida por Scislo e colaboradores (2001). A ativação dos receptores P2x no NTS produz ajustes hemodinâmicos semelhantes aos ajustes com microinjeção de glutamato no mesmo local e com a estimulação do barorreflexo induzido por meio da infusão de nitroprussiato e fenilefrina (Scislo et al., 1998a). Esses autores encontraram uma simpatoinibição com hipotensão,

bradicardia e queda na atividade simpática nos segmentos lombar, renal e adrenal. Barraco et al (1996) obteve resultados similares mensurando fluxo sangüíneo para o território muscular e observando intensa vasodilatação para os membros posteriores de ratos. Este mesmo grupo ainda demonstrou com a microinjeção de suramin no NTS, o bloqueio da bradicardia em resposta à estimulação do baroreflexo (Scislo et al., 1998b).

Os trabalhos desses autores corroboram na vasodilatação dos membros posteriores por meio da retirada do tônus simpático vasoconstritor ser devido a ativação de receptores P2x no NTS. A partir dessas informações a transmissão purinérgica no NTS poderia contribuir para o mecanismo vasodilatador durante as reações de alerta e defesa na primeira fase (rápida) da resposta vasodilatadora, assim como na vasodilatação em resposta à ativação do barorreflexo. Este mecanismo inclui interações da HDA para o NTS, ativação de receptores purinérgicos no NTS, projeções glutamatérgicas para o RVL e a ativação de mecanismos vasodilatadores mediados por esse núcleo.

Em nosso estudo a administração sistêmica de fentolamina reduziu parcialmente a resposta vasodilatadora devido a EE do hipotálamo e aboliu a vasodilatação induzida pela microinjeção de α,β-methylene ATP no NTS. Uma vez abolida a vasodilatação pela estimulação química de receptores P2x no NTS podemos inferir uma relação direta entre a ativação desses receptores e a retirada do tônus simpático vasoconstritor α-adrenérgico. Nas reações de alerta conseqüente à EE hipotalâmica observamos que, após o bloqueio dos receptores α-adrenérgicos com fentolamina, a microinjeção bilateral do NTS com suramin não reduziu significativamente a resposta vasodilatadora. Entretanto nas condições experimentais observadas não podemos atribuir uma

relação direta dos receptores P2x no NTS com receptores α-adrenérgicos, na vasodilatação muscular em situações de alerta e defesa. Apesar dos bloqueios em nossos resultados não serem significativamente diferentes observamos redução na área sob a curva de condutância e no pico de resposta máxima do nosso grupo entre as situações com fentolamina e suramin. Isto representa uma diminuição na duração e na intensidade da resposta vasodilatadora mesmo que não significativa.

Nossos achados mostraram que a fentolamina foi capaz de reduzir parcialmente a resposta vasodilatadora máxima frente à EE da HDA, mas a área sob a curva de condutância não sofreu redução significativa. Ferreira-Neto et al (2005) descreve, após o bloqueio com fentolamina, uma discreta redução do pico máximo de vasodilatação muitas vezes não significativa de latência prolongada. Nossos resultados correspondem com o aumento da latência na resposta vasodilatadora, porém o mesmo não ocorre em relação ao pico máximo de resposta. Segundo esses autores a não redução do pico máximo de vasodilatação muscular, assim como o aumento da latência de resposta expresso pelo intervalo de ascensão da curva de condutância e o momento da estimulação, seria decorrente de uma compensação pela liberação de catecolaminas da medula da adrenal. Todavia em nosso estudo utilizamos ratos anestesiados com infusão sistêmica de uretana e α-cloralose enquanto esses autores realizaram experimentos em ratos anestesiados com tiopental sódico, que possui propriedades simpatomiméticas.

Como já foi discutido anteriormente, Mifflin et al (1988) demonstraram vias descendentes do hipotálamo incidindo sobre sítios aferentes do barorreflexo no NTS, dando indício a uma inibição do baroreflexo nas situações

de alerta. Embora tenhamos observado uma vasodilatação muscular acompanhada de hipertensão e taquicardia, é necessário destacar que tanto na ativação do barorreflexo quanto nas reações de defesa constatamos vasodilatação em membros posteriores. Esses fatos reforçam nossa hipótese de vias provenientes da HDA exclusivas para regulação da vasodilatação e independente das vias responsáveis pela freqüência cardíaca e pressão arterial (Cravo et al., 2003). Segundo estes autores esta via poderia ser inclusive uma projeção direta do hipotálamo para o RVL por meio de interneurônios GABAérgicos intrínsecos do próprio RVL.

Nossos resultados parecem confirmar a relação envolvendo projeções da HDA para o RVL na vasodilatação em reações de alerta e defesa, porém descarta a possibilidade delas ocorrerem exclusivamente para o RVL uma vez que o bloqueio no NTS com suramin ou com ácido quinurênico no NTS reduziu as respostas de vasodilatação. Neste caso propomos que a resposta de vasodilatação poderia depender 1) de outro sitio de integração além do NTS; 2) de outros tipos de receptores envolvidos com a regulação da vasodilatação localizados no NTS ou não; 3) parcialmente de vias para o NTS e vias diretas para o RVL. Independente da complexidade dessas integrações nos núcleos vasomotores do tronco cerebral, todas essas possibilidades dependem do núcleo RVL como braço eferente das respostas vasodilatadoras nas reações de alerta e defesa. O seguinte modelo proposto na página seguinte representa as possíveis conclusões desta série de estudos (Figura 39).

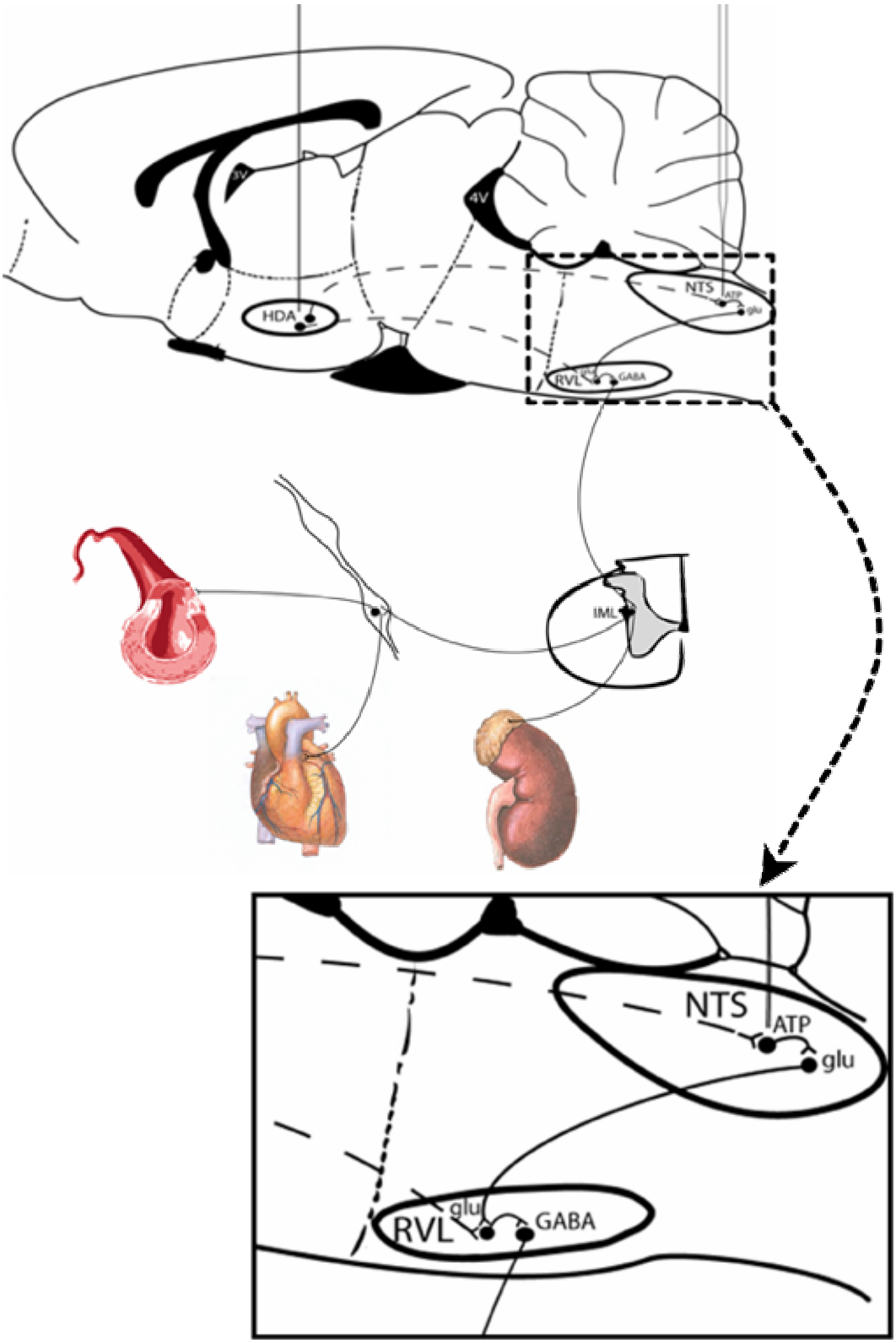


Fig 39 – Possíveis vias centrais envolvidas na regulação simpática da vasodilatação muscular durante as reações de alerta e defesa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abrahams, V.C., Hilton, S.M., Malcolm, J.L. Sensory connexions to the hypothalamus and midbrain and their role in the reflex activation of the defence reaction. *J. Physiol.* 164:1-16, 1962

2. Barraco, R.A., O´Leary, D.S., Scislo, T.J. Activation of purinergic subtypes in the nucleus tractus solitarius elicits specific regional vascular response patterns. *J. Auton. Nerv. Sys.* 59:11-124, 1996

3. Barraco, R.A., Phillis, J.W. Subtypes of adenosine receptors in the brainstem mediate opposite blood pressure responses. *Neuropharmacology* 30:403-407, 1991

4. Burnstock, G. Purinergic Cotransmission. *Brain Res. Bull.* 50:355-357, 1999

5. Burnstock, G. Cotransmission. *Curr. Op. Pharmacol.* 4:47-52, 2004

6. Bauer, R.M., Iwamoto, G.A., Waldrop T.G. Ventolateral medullary neurons modulate pressor reflex to muscular contraction *Am. J. Physiol.* 257:1154-1161, 1989

7. Bazil, M.K., Gordon, F.J. Spinal NMDA receptors mediate pressor responses evoked from the rostral ventrolateral medulla. *Am. J. Physiol.* 260:267-275, 1991

8. Brown, D.L., Guyenet, P.G. Electrophysiological study of cardiovascular neurons in the rostral ventrolateral medulla in rats *Circ.Res*. 56:359-369, 1985

9. Canesin, R.O., Bonagamba, L.G.H., Machado, B.H. Bradycardic and hypotensive responses to microinjection of L-glutamate into the lateral aspect of the commissural NTS are blocked by an NMDA receptor antagonist. *Brain Res.* 852:68-75, 2000

10. Carretiero, D.C., Fior-Chadi, D.R. Adenosine A1 receptor distribution in the nucleus tractus solitarii of normotensive and spontaneously hypertensive rats. *J. Neural Transm.* 111:465-473, 2004

11. Ciriello, J., Hochstenbach, S.L., Roder, S. Central projections of baroreceptor and chemoreceptor afferent fibers in the rat. In: Nucleus of the solitary tract. Edited by I. Robin A. Barroco. Boca Raton, FL: CRC Press, Inc. 1994, pp. 35-50.

12. Colombari, E., Menani, J.V., Talman, W.T. Commissural NTS contributes to pressor responses to glutamate injected into the medial NTS of awake rats. *Am. J. Physiol. Reg. Integr. Comp. Physiol.* 270:1220-1225, 1996

13. Colombari, E., Davisson, R.L., Shaffer, R.A., Talman, W.T., Lewis, S.J. Hemodynamic effects of L-glutamate in NTS of conscious rats: A possible role of vascular nitrosyl factors. *Am. J. Physiol.* 274:1066-1074, 1998

14. Cravo S.L., Possas O.S., Ferreira-Neto, M.L. Rostral vetrolateral medulla: An integrative site for muscle vasodilation during defense-alerting reactions. *Cel. Mol. Neurobiol.* 23:579-595, 2003

15. Cravo, S.L., Morrison, S.F., Reis, D.J. Differentiation of two cardiovascular regions within caudal ventrolateral medulla. *Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol.* 261: 985-994, 1991

16. Dale, N., Gourine, A.V., Bulmer, L.D., ThomasT. Rapid adenosine release in the nucleus tractus solitarii during defence response in rats: Real-time measurement in vivo. *J. Physiol.* 544:149-160, 2002

17. Dampney, R.A.L. Functional organization of central pathways regulating the cardiovascular system. *Physiol. Rev.* 74:323-364 1994

18. Davisson, R.L., Johnson, A.K., Lewis, S.J., Nitrosyl factors mediate active neurogenic hindquarter vasodilation in conscious rats. *Hypertension* 23:962-966, 1994

19. Davisson, R.L., Possas, O.S., Murphy, S.P., Lewis, S.J. Neurogenically-derived nitrosyl factors mediate lumbar sympathetic vasodilation in hindlimb vasculature of the rat. *Am. J. Physiol*. *Heart Circ. Physiol.* 272: 2369-2376, 1997

20. De Paula, P.M., Machado, B.H. Antagonism of adenosine A_1 receptors in the NTS does not affect the chemoreflex in awake rats. *Am. J. Physiol*. *Regul. Integr. Comp. Physiol* 281:2072-2078, 2001

21. De Paula, P.M., Antunes, V.R., Bonagamba, L.G.H., Machado, B.H. Cardiovascular responses to microinjection of ATP into the nucleus tractus solitarii of awake rats. *Am. J. Physiol*. *Regul. Integr. Comp. Physiol* 287:1164-1171, 2004

22. Dias, A.C., Colombari, E. Central nitric oxide modulates hindquarter vasodilation elicited by AMPA receptor stimulation in the NTS of conscious rats. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 290: 1330-1336, 2006

23. Dias, A.C.R., Vitela, M., Colombari, E., Miffilin, S.W. Nitric Oxide modulation of glutamatergic, baroreflex, and cardiopulmonary transmission in the nucleus of the solitary tract. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* 288:256-262, 2005

24. Dias, A.C.R., Talman, W.T., Colombari, E. Hemodynamic effects elicited by microinjection of glutamatergic agonists into NTS of conscious rats. *Am. J. Physiol. Heart Circ Physiol* 281:1026-1034, 2001

25. Ergene, J., Bumbar, J.C., O´Leary, D.S., Barraco, R.A. Activation of P2-purinoceptors in the nucleus tractus solitarius mediate depressor responses. *Neurosc. Lett.* 174:188-192, 1994

26. Feldberg, W., Guertzenstein, P.G. A vasopressor effect obtained by drugs acting on the ventral surface of the brain stem *J.Physiol*. 258:337-355, 1976

27. Ferreira-Neto, M.L., Possas, O.S., Cravo, S.L. Role of rostral ventrolateral medulla (RVL) in the muscle vasodilation induced by hypothalamic stimulation. *Physiologist* 43:265, 2000

28. Ferreira-Neto, M.L., Possas, O.S., Cravo, S.L. Evidence for a role of nitric oxide in hindlimb vasodilation induced by hypothalamic stimulation in anesthetized rat. *An. Acad. Bras. Cienc.* 77:245-257, 2005

29. Foley, C.M., Moffit, J.A., Hay, M., Hasser, E.M. Glutamate in the nucleus of the solitary tract activates both ionotropic and metabotropic glutamate receptors. *Am. J. Physiol*. 275:1858-1866, 1998

30. Frigero, M., Bonagamba, L.G.H., Machado, B.H. The gain of the baroreflex is reduced by microinjection of NMDA receptor antagonists into the nucleus tractus solitarii of awake rats. *J. Auton. Nerv. Sys*. 79:28-33, 2000

31. Granata, A.R., Ruggiero, D.A., Park, D.H., Joh, T.H., Reis, D.J. Braimstem area with C1 epinephrine neurons mediates baroreceptor vasodepressor responses. *Am. J. Physiol*.248:547-567, 1985

32. Granata, AR, Reis, DJ Release of [^{3}H] L-glutamic (L-Glu) acid and [^{3}H] D-aspartatic (D-Asp) acid in the area of nucleus tractus solitarius in vivo produced by stimulation of vagus nerve. *Brain Res.* 259:77-93, 1983

33. Gu, J.G., Bardoni, R., Magherini, P.C., MacDermott, A.B. Effects of the P2-purinoceptor antagonists suramin and pyridoxal-phosphate-6-azophenyl—disulphonic acid on glutamatergic synaptic transmission in rat dorsal horn neurons of the spinal cord. *Neurosci. Lett.* 253:167-170, 1998

34. Guertzenstein, P.G., Lopes, O.U. Cardiovascular responses evoked from the nicotine sensitive area on the ventral surface of the medulla oblongata in the cat. *J. Physiol.* 347:345-360, 1984

35. Guertzenstein, P.G., Hilton, S.M., Marshall, J.M., Timm, R.J. Experiments on the origin of the vasomotor tone. *J. Physiol.* 275:78-79, 1978

36. Guyenet, P.G. The sympathetic control of blood pressure. *Nate Rev Neurosci.* 7:335-346, 2006

37. Hermes, S.M., Mitchel, J.L., Aicher, S.A. Most neurons in the nucleus tractus solitarii do not send collateral projections to multiple autonomic targets in the rat brain. *Exp. Neurol.*, 2006 no prelo

38. Kanjhan, R., Housley, G.D., Burton, L.D., Christie, D.L., Kippenberger, A., Thorne, P.R., Luo, L., Ryan, A.F. Distribution of the P2x2 receptor subunit of the ATP-gated ion channels in the rat central nervous system. *J Comp Neurol* 407:11-32, 1999

39. Kiely, J.M., Gordon, F.J. Role of rostral ventrolateral medulla in centrally mediated pressor responses. *Am. J. Physiol.* 267:1549-1556 1994

40. Kitchen, A.M., Collins, H.L., DiCarlo, S.E., Scislo, T.J., O´Leary, D.S. Mechanisms mediating NTS P2x receptor-evoked hypotension: cardiac output vs. total peripheral resistance. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 281:2198-2203, 2001

41. Kitchen, A.M., Scislo, T.J., O´Leary, D.S. NTS A_{2a} purinoceptor activation elicits hindlimb vasodilation primarily via β–adrenergic mechanism. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 278:1775-1782, 2000

42. McClure, J.M., O´Leary, D.S., Scislo, T.J. Stimulation of NTS A1 adenosine receptors evokes counteracting effects on hindlimb vasculature *Am J Physiol Heart CircPhysiol* 289:2536–2542, 2005

43. Meeley, M.P., Ruggiero, D.A., Ishitsuka, T., Reis, D.J. Sympathoexcitatory neurons in the C1 adrenergic area of the rostral ventrolateral medulla (RVL) are tonically inhibited by gamma-aminobutyric acid (GABA). *Neurosci. Lett.* 58:83-9, 1985

44. Mifflin, S.W., Spyer, K.M., Withington-Wray, D.J. Baroreceptor imputs to the nucleus tractus solitarius in the cat: Modulation by the hypothalamus. *J. Physiol.* 399:369-387, 1988

45. Moore, P.K., Wallace, P., Gaffen, Z., Hart, S.L., Babbedge, R.C. Characterization of the novel nitric oxide synthase inhibitor 7-nitro indazole and related indoles: Antinociceptive and cardiovascular effects. *Br. J. Pharmacol*. 110:219-224, 1993

46. Morrison, S.F., Milbner, T.A., Reis, D.J. Reticulospinal vasomotor neurons of the rat rostral vetrolateral medulla: Relationship to sympathetic nerve activity and the C1 adrenergic cell group. *J. Neurosci*. 8:1286-1301, 1989

47. Nakatsuka, T., Gu, J.G. ATP P2X receptor-mediated enhancement of glutamate release and evoked EPSCs in dorsal horn neurons of the rat spinal cord. *J. Neurosci.* 21: 6522-6531, 2001

48. Paxinos, G., Watson, C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, 2nd ed., Academic Press. 1986

49. Paton, J.F.R., De Paula, P.M., Spyer, K.M., Machado, B.H., Boscan, P. Sensory afferent selective role of P2 receptors in the nucleus tractus solitarii for mediating the cardiac component of the peripheral chemoreceptor reflex in rats. *J. Physiol.* 543: 995-1005, 2002

50. Phillis, J.W., Scislo, T.J., O´Leary, D.S. Purines and the nucleus tractus solitarius: Effect on cardiovascular and respiratory function. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 24:738-742, 1997

51. Possas O.S., Lewis S.J., NO containing factors mediate hindlimb vasodilation produced by superior laryngeal nerve stimulation. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 273:234-243, 1997

52. Possas O.S., Lopes O.U., Cravo S.L., Glutamatergic and GABAergic imputs to the RVL mediate cardiovascular adjustments to noxious stimulation. *Am. J. Physiol.* 280:434-440, 2001

53. Ralevic, V., Burnstock, G. Receptors for purines and pyrimidines *Pharmacol. Rev*. 50:413-492, 1998

54. Ralevic, V., Thomas, T., Burnstock, G., Spyer, K.M. Characterization of P2 receptors modulating neural activity in rat rostral ventrolateral medulla. *Neuroscience*. 94:867-878, 1999

55. Rocha, I., Brás-Rosario, L., Amparo-Barros, M., Silva-Carvalho, L. Angiotensin AT1 receptor antagonist losartan and the defence reaction in the anaesthetised rat. Effect on the carotid chemoreflex. *Exp. Physiol.* 88:309-314, 2003

56. Ross, C.A., Ruggiero, D.A., Reis, D.J. Projections from the nucleus tractus solitarii to the rostral ventrolateral medulla. *J. Com. Neurol*. 242:511-534, 1985

57. Ross, C.A., Ruggiero, D.A., Park, D.H., Joh, T.H., Sved, A.F., Fernandez-Pardal, J., Saavedra, J.M., Reis, D.J. Tonic vasomotor control by the rostral ventrolateral medulla: Effect of electrical or chemical estimulation of the area containing C1 adrenaline neurons on arterial pressure, heart rate, and plasma catecholamines and vasopressin. *J. Neurosci.* 4:479-494, 1984

58. Ruggiero, D.A., Cravo, S.L., Golanov, E., Gómez, R., Anwar, M, Reis, D.J. Adrenergic and non-adrenergic spinal projections of a cardiovascular-active pressor area of medulla oblongata: Quantitative topographic analysis. *Brain Res.* 663:107-120, 1994

59. Ruggiero, D.A., Giuliano, R., Anwar, M., Stornetta, R., Reis, D.J. Anatomical substrates of cholinergic-autonomic regulation in the rat. *J Comp Neurol.* 292:1-53, 1990

60. Sapru, H.N. Glutamate circuits in selected medullo-spinal areas regulating cardiovascular function. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 29:491-496, 2002

61. Silva-Carvalho, L., Dawid-Milner, M.S., Goldsmith, G.E., Spyer, KM. Hypothalamic modulation of the arterial chemoreceptor reflex in the anesthetized cat: role of the nucleus tractus solitarii. *J. Physiol.* 487:751-760, 1995

62. Scislo, T.J., O´Leary, D.S. Diferential control of renal vs. adrenal sympathetic nerve activity by NTS A_{2a} and P_{2x} purinoceptors. *Am. J. Physiol*. *Heart Circ Physiol* 275:2130-2139, 1998

63. Scislo, T.J., Augustyniak, R.A., O´Leary, D.S. Differential arterial baroreflex regulation of renal, lumbar and adrenal sympathetic nerve activity in the rat. Am. J. Physiol. 275:995-1002, 1998a

64. Scislo, T.J., Ergene, E., O´Leary, D.S. Impaired arterial baroreflex regulation of the heart rate after blockade of P2 – purinoceptors in the nucleus tractus solitarius. *Brain. Res. Bull.* 47:63-67, 1998b

65. Scislo, T.J., O´Leary, D.S. Differential role of ionotropic glutamatergic mechanisms in responses to NTS P_{2x} and A_{2a} receptors stimulation. *Am. J. Physiol. Heart Circ Physiol* 278:2057-2068, 2000

66. Scislo, T.J., Kitchen, A.M., Augustyniac, R.A., O´Leary, D.S. Differential patterns of sympathetic responses to selective stimulation of nucleus tractus solitarius purinergic receptor subtypes. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 28:120-124, 2001

67. Scislo, T.J., O´Leary, D.S. Mechanisms mediating regional sympathoactivatory responses to stimulation of NTS A1 adenosine receptors. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* 283:1588-1599, 2002

68. Scislo, T.J., Nobusuke, T., O´Leary, D.S. Differential role of nitric oxide in regional sympathetic responses to stimulation of NTS A2a adednosine receptors. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* 288:638-649, 2005

69. Sevóz-Couche, C., Comet, M.A., Hamon, M., Laguzzi, R. Role of nucleus tractus solitarius 5-HT3 receptors in the defense reaction-induced inhibition of the aortic baroreflex in rats. *J. Neurophysiol.* 90:2521-2530, 2003

70. Spyer, K.M., St Lambert, J.H., Thomas, T. Central nervous system control of cardiovascular function: Neural mechanisms and novel modulators *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 24:743-747: 1997

71. Spyer, K.M., Thomas, T. A role for adenosine in modulating cardio-respiratory responses: A mini-review. *Brain Res. Bull.* 53:121 -124, 2000

72. St. Lambert, J.H., Thomas, T., Burnstock, G., Spyer, K.M. A source of adenosine involved in cardiovascular responses to defense area stimulation. *Am. J. Physiol.* 272:195-200, 1997

73. St. Lambert, J.H., Dashwood, M.R., Spyer, K.M. Role of brainstem adenosine A1 receptors in the cardiovascular response to hypothalamic defence area stimulation in the anesthetized rat. *Br. J. Pharmacol.* 117:277-282, 1996

74. St. Lambert, J.H., Dawid-Milner, M.S., Silva-Carvalho, L., Spyer, K.M. Action of adenosine receptor antagonists on the cardiovascular response to defence area stimulation in the rat. *Br. J. Pharmacol.* 113:159-164, 1994

75. Stornetta, R.L., Morrison, S.F., Ruggiero, D.A., Reis, D.J. Neurons in the rostral ventrolateral medulla mediate the somatic pressor reflex. *Am. J. Physiol.* 256:448-462, 1989

76. Sun, M.K., Guyenet, P.G. Hypothalamic and glutamatergic imput to medullary sympathoexcitatory neurons in rat. *Am. J. Physiol*. 251:798-810, 1986

77. Suzuki, E., Kessler, M., Montgomery, K., Arai, A.C. Divergent effects of the purinoceptor antagonists suramin and pyridoxal-5`-phosphate-6-(2`-naphthylazo-6`-nitro-4`,8`-disulfonate) (PPNDS) on α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4- isoxazolepropionic acid (AMPA) receptors. *Mol. Pharmacol.* 66:1738-1747, 2004

78. Takaoka, F., Machado, B.H. Cardiovascular responses to microinjection of AMPA into the rostral comissural nucleus tractus solitarius of awake rats. *Auton. Neurosc. Basic and Clinical.* 107:114-119, 2003

79. Thomas, T., St Lambert, J.H., Dashwood, M.R., Spyer, K.M. Localization and action of adenosine A2a receptors in regions of the brainstem important in cardiovascular control. *Neuroscience* 95:513-518, 2000

80. Timo-Iaria, C. Fisiologia do sistema nervoso. Em: *Fisiologia Básica* Ed. Margarida M. Aires editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, Brasil 1985

81. Tuyau, M., Hansen, M.A., Coleman, M.J., Dampney, R.A., Balcar, V.J., Bennet, M.R. Autoradiograph of [^{3}H] α,β-methylele ATP binding sites in medulla oblongata and spinal cord of the rat. *Neurochem Int* 30:159-169, 1997

82. Wu, P.H., Phillis, J.W. Distribuition and release of adenosine triphosphate in rat brain. *Neurochem. Res.* 3:563-571, 1978

83. Yao, S.T., Barden, J.A., Lawrence, J. On the immunohistochemical distribution of ionotropic P2x receptors in the nucleus tractus solitarius of the rat. *Neuroscience* 108:673-685, 2001

84. Yardley, C.P., Hilton, S.M., Vasodilation in hindlimb skeletal muscle evoked as part of the defence reaction in the rat. *J. Auton. Nerv. Syst.* 19:127-136, 1987

85. Yardley, C.P., Hilton, S.M., The hypothalamic and brainstem areas from which the cardiovascular and behavioural components of the defence reaction are elicited in the rat. *J. Auton. Nerv. Syst.* 15:227-244, 1986

ABSTRACT

The electrical stimulation (ES) of the hypothalamus in the rat produces a well-defined pattern of cardiovascular adjustments including hypertension, tachycardia and skeletal muscle vasodilation. These hemodynamic responses can also be observed in natural conditions during fight and/or flight behaviors. However the neural pathways and possible neurotransmitters involved remain largely unknown. In this study we sought to determine the role of purinergic and glutamatergic receptors into the nucleus tractus solitarius (NTS) in the cardiovascular responses induced by hypothalamic ES, also we aimed to analyze the role of glutamatergic neural pathways from the NTS to the rostral ventrolateral medulla (RVLM) in these responses. Male Wistar rats (250–350 g) were anesthetized (urethane 600 mg/kg + α-chloralose 50 mg/kg, iv), paralyzed (d-tubocurarine 0.5 mg/kg, iv) and artificially ventilated. Mean arterial blood pressure (MAP), heart rate (HR) and hindquarter blood flow (HQBF) were recorded. Hindquarter vascular conductance (HQVC) was calculated as the ratio HQBF/MAP and expressed as percentage of baseline. Hypothalamic ES (6s trains, 0.6 ms square pulses, 100 Hz, 150 µA) evoked a transitory hypertension, tachycardia and hindlimb muscle vasodilation. After bilateral microinjections of suramin (100 pmol /50 nl), a non-specific P2x receptor antagonist, into the NTS the hindlimb vasodilation was reduced (173±19.0 vs 28±14.1% of baseline), even so the transitory hypertension and tachycardia remained unchanged. A similar vasodilation reduction (134±21.5 vs 27±12.7% of baseline) was observed after microinjections of kynurenic acid bilaterally at the same NTS sites. Microinjections of the P2x receptor agonist α,β-methylene ATP (100 pmol/50 nl) into the NTS produced hypotension, bradycardia and hindlimb muscle vasodilation. Bilateral microinjections of suramin at the same

NTS site reduced the hypotension (-47±4.5 vs -6±2.0 mmHg) and the vasodilation (76±15.2 vs 9±2.1% of baseline). After bilateral microinjection of kynurenic acid into the RVLM, both hypotension (-60±6.1 vs -9±3.7 mmHg) and the vasodilation response (126±16.9 vs 17±4.6% of baseline) induced by α,β-methylene ATP into the NTS were reduced. The A2a agonist CGS21680 (20 pmol/50 nl) into the NTS produced a long-lasting hypotension, bradycardia and hindlimb vasodilation. Bilateral RVLM glutamatergic blockade reduced the hypotension (-41±4.7 vs -7±1.9 mmHg), the tachycardia (-33±9.0 vs -10±3.1 bpm) and the muscle vasodilation (81±5.6 vs 8±1.5% of baseline) when CGS21680 was injected into the NTS. Therefore the results suggest that in alerting defense reaction, hindquarter vasodilation is mediated by NTS P2x and also by glutamatergic receptors into the intermediate NTS. Cardiovascular responses evoked by either P2x or A2a receptors stimulation in the NTS are mediated by glutamatergic synapses into the RVLM probably through activation of inhibitory interneurones in this area.