

# **HILDEBRANDO CANDIDO FERREIRA NETO**

**Estudo da interação entre ATP e glutamato em neurônios do núcleo paraventricular do hipotálamo e sua relação com a resposta simpatoexcitatória induzida por alterações na osmolaridade**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de doutor em Ciências.

Área de concentração: Fisiologia Humana

Orientador: Prof. Dr. Vagner Roberto Antunes

Versão original

São Paulo  
2014

## RESUMO

Ferreira-Neto HC. Estudo da interação entre ATP e glutamato em neurônios do núcleo paraventricular do hipotálamo e sua relação com a resposta simpatoexcitatória induzida por alterações na osmolaridade. [tese (Doutorado em Fisiologia Humana)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2014.

Os receptores P2X de ATP são expressos em neurônios do núcleo para ventricular do hipotálamo (PVN) que se projetam para o bulbo ventrolateral rostral (RVLM). Neste estudo avaliamos os mecanismos celulares da interação ATP-glutamato em neurônios pré-simpáticos do PVN, e investigamos se o acoplamento entre receptores purinérgicos e glutamatérgicos contribuiria para a atividade destes neurônios e da atividade simpática induzida por hiperosmolaridade. Utilizamos como técnicas metodológicas a imunohistoquímica e abordagens eletrofisiológicas de *whole-cell patch-clamp* e registro eletroneurográfico na preparação *in situ* de rato decorticado artificialmente perfundido para determinar o efeito da ativação de receptores P2 e a possível interação entre a sinalização purinérgica e glutamatérgica nas mudanças na atividade simpática lombar (ANSL) induzidas por estímulo osmótico. Registros de *whole-cell patch clamp* obtidos de neurônios PVN-RVLM mostraram que ATP (100  $\mu$ M, 1 min, aplicado no banho) induziu aumento da frequência de potenciais de ação (89%), um efeito bloqueado por ácido quinurênico (KYN, 1 mM) ou PPADS (10  $\mu$ M). A microinjeção unilateral de ATP no PVN aumentou a ANSL de maneira dose-dependente (1 nmol: 38 $\pm$ 6 %, 2.5 nmol: 72 $\pm$ 7 %, 5 nmol: 96 $\pm$ 13 %). Este aumento foi significativamente atenuado pelo bloqueio de receptores P2 (PPADS) e receptores glutamatérgicos (KYN) ou uma combinação de ambos. O aumento na ANSL promovido pela microinjeção de L-glutamato no PVN não foi afetado pela previa injeção de PPADS. O bloqueio seletivo de receptores não-NMDA (CNQX), mas não de receptores NMDA (AP5), atenuou o efeito simpatoexcitatório do ATP no PVN. A aplicação de ATP *per se* não alterou a função sináptica glutamatérgica, no entanto, as correntes glutamatérgica dependentes da aplicação focal de L-glu (1 mM, n=10) ou AMPA (50  $\mu$ M, n=13) foram aumentadas na presença de ATP (L-glu amplitude: 110%, L-glu área: 217%; AMPA amplitude: 33%, AMPA área: 52%). A potenciação das correntes mediadas por receptores AMPA dependente de ATP foram bloqueadas pelo PPADS (n=12) e pela quelação de Ca<sup>2+</sup> intracelular (BAPTA, n=10). Adicionalmente, um estímulo hiperosmótico agudo ativou neurônios do PVN que expressam receptores P2X<sub>2</sub>. Além disso, a estimulação hiperosmótica de neurônios PVN-RVLM (manitol 1%, + 60 mOsmol/L, n=8) potenciou as respostas induzidas pela aplicação de AMPA (53%), um efeito bloqueado por PPADS (n=6). Finalmente, demonstramos que os receptores P2 do PVN receptores são importantes para a resposta simpatoexcitatória induzida por hiperosmolaridade. Em conjunto, nossos dados suportam a hipótese de um acoplamento funcional entre receptores P2 e AMPA

(provavelmente de localização extrasináptica) em neurônios PVN-RVLM, o qual estimula a atividade de neurônios pré-simpáticos do PVN e aumenta a ANSL. Concluímos que este acoplamento e interação purino-glutamatérgica em neurônios do PVN desempenha um importante papel na resposta simpatoexcitatória promovida por alteração aguda de osmolaridade.

**Palavras-chave:** Núcleo Paraventricular do hipotálamo. RVLM. Atividade simpática. ATP. Receptores purinérgicos. L-Glutamato. AMPA. Hiperosmolaridade.

## ABSTRACT

Ferreira-Neto HC. Study of the interaction between ATP and glutamate in neurons of the paraventricular nucleus of the hypothalamus and its relationship with the sympathoexcitatory response induced by changes in osmolarity. [Ph. D. thesis (Human Physiology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2014.

P2X receptors are expressed on rostral ventrolateral medulla (RVLM) projecting paraventricular nucleus (PVN) neurons. Here, we evaluated precise cellular mechanisms underlying the ATP-glutamate interaction in PVN neurons, and assessed whether purinergic-glutamatergic receptor coupling contributed to osmotically-driven presympathetic PVN neuronal activity and sympathoexcitation. We used immunohistochemistry and electrophysiological approaches with whole-cell patch-clamp and an in situ arterially perfused rat preparation to determine the effect of P2 receptor activation and the putative interaction between purinergic and glutamatergic neurotransmitter systems within the PVN to modulate the lumbar SNA (LSNA) induced by osmotic stimulation. Whole-cell patch clamp recordings obtained from PVN-RVLM neurons showed that ATP (100  $\mu$ M, 1 min, bath applied) induced an increase in firing rate (89%) an effect blocked by kynurenic acid (1 mM) or PPADS (10  $\mu$ M). Unilateral microinjection of ATP into the PVN induced a dose-related increase in the LSNA (1 nmol: 38 $\pm$ 6 %, 2.5 nmol: 72 $\pm$ 7 %, 5 nmol: 96 $\pm$ 13 %). This increase was significantly attenuated by blockade of P2 receptors (PPADS) and glutamate receptors (kynurenic acid, KYN) or a combination of both. The increase in LSNA elicited by L-glutamate microinjection into the PVN was not affected by a previous injection of PPADS. Selective blockade of non-NMDA receptors (CNQX), but not NMDA receptors (AP5), attenuated the ATP-induced sympathoexcitatory effects at the PVN level. While ATP *per se* did not affect glutamate synaptic function, glutamate currents evoked by focal application of L-glu (1 mM, n=10) or AMPA (50  $\mu$ M, n=13), in the presence of ATP, were increased in magnitude (L-glu amplitude: 110%, L-glu area: 217%; AMPA amplitude: 33%, AMPA area: 52%). ATP potentiation of AMPA currents were blocked by PPADS (n=12) and by chelation of intracellular Ca<sup>2+</sup> (BAPTA, n=10). In addition, acute hyperosmotic stimulation activates P2X<sub>2</sub> receptors expressing neurons in the PVN. Furthermore, a hyperosmotic stimulus (mannitol 1%, + 60 mOsmol/L, n=8) potentiated AMPA responses (53%), an effect blocked by PPADS (n=6). Finally, we demonstrated that P2 receptors in the PVN are important for osmotically-driven sympathoexcitatory responses. Taken together, our data support a functional coupling between P2 and AMPA receptors (likely of extrasynaptic location) in PVN-RVLM neurons, which stimulate presympathetic PVN neuronal activity and increases LSNA. This coupling is

engaged in response to an acute hyperosmotic stimulus, which we propose to contribute to osmotically-driven sympathoexcitatory responses by the PVN.

**Keywords:** Paraventricular nucleus of the hypothalamus. RVLM. Sympathetic activity. ATP. Purinergic receptors. L-Glutamate. AMPA. Hyperosmolarity.

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 O controle da osmolaridade plasmática

O corpo humano é composto por cerca de 70% de água, sendo que a maior parte deste volume está no sangue juntamente com hemáceas, leucócitos, plaquetas, proteínas e diferentes eletrólitos. Nesse sentido, a manutenção do volume circulante bem como da concentração dos diferentes íons e, conseqüentemente, da osmolaridade plasmática é essencial para funcionamento celular e do organismo como um todo. Nos humanos a osmolaridade plasmática é finamente controlada e mantida de limites estreitos, entre 285-295 mOsmol/L, por meio da ingestão, absorção e excreção de água e eletrólitos.

A regulação da osmolaridade dos fluidos corporais é finamente regulada pela integração dos sistemas renal, cardiovascular e neuroendócrino (Share, Claybaugh, 1972). O aumento agudo da osmolaridade plasmática induz uma série de respostas que incluem liberação de neuromoduladores, tais como vasopressina (VP) e angiotensina II (AngII), aumento da atividade simpática e elevação da pressão arterial (Bealer, 2000; Hatzinikolaou et al., 1980, 1981; Stocker et al., 2005; Weiss et al., 1996). Uma parcela destas respostas é mediada por meio da ativação de neurônios do núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN), os quais recebem projeções excitatórias de núcleos centrais que contém os osmorreceptores localizados próximos dos ventrículos encefálicos em locais desprovidos de barreira hematoencefálica, denominados órgãos circumventriculares (CVOs) (Antunes–Rodrigues et al., 2004; Bourque, Oliet, 1997; Kizer et al., 1976; Stocker et al., 2008; Thrasher, 1985; Weindl, 1973). Os osmorreceptores detectam pequenas alterações na osmolaridade plasmática (Bourque, Oliet, 1997) e alteram o padrão de disparos de neurônios que se projetam para o PVN (Stocker et al., 2008).

Muitos neurotransmissores no PVN estão envolvidos nas respostas do sistema nervoso autônomo induzidas por estímulo hiperosmótico agudo. Nesse sentido, Chen e Toney (2001) demonstraram que o aumento na atividade simpática renal após ativação osmótica central é mediada, pelo menos em parte, por um mecanismo que envolve a ativação de receptores  $AT_1$  de angiotensina II no PVN. Além disso, sabe-se que

sinapses glutamatérgicas em neurônios do PVN tem um papel importante na resposta do nervo simpático renal promovida por elevações de osmolaridade (Badoer et al., 2003). Corroborando estes resultados, Antunes et al. (2006) observaram que a simpatoexcitação lombar induzida por estímulo osmótico agudo é bloqueada após o antagonismo de receptores ionotrópicos glutamatérgicos. Mais recentemente, Son et al. (2013) demonstraram que um desafio osmótico agudo aumenta a atividade simpática renal, o qual é atenuado com o prévio antagonismo dos receptores  $V_{1a}$  de vasopressina no PVN, afirmando o conceito de que a liberação dendrítica deste neuropeptídeo é um outro mecanismo importante na regulação da atividade simpática e no controle da osmolaridade.

## **1.2 Núcleo Paraventricular do Hipotálamo (PVN) e Atividade Simpática**

O PVN é considerado um importante núcleo integrador para a regulação das funções neuroendócrina, autonômicas e respiratória (Coote et al., 1998; Dampney, 1994; Dampney et al., 2005; Guyenet, 2006; Swanson, Sawchenko, 1983). O PVN é composto por neurônios magnocelulares neuroendócrinos que se projetam para a hipófise posterior e são responsáveis pela liberação de vasopressina (VP) e ocitocina (OT) tanto na circulação sistêmica bem como em regiões cerebrais específicas (Bergquist, Ludwig, 2008; Landgraf, Ludwig, 1991; Pow, Morris, 1989; Raggenbass, 2008). Além dos neurônios magnocelulares, o PVN também possui uma população de neurônios parvocelulares neuroendócrinos que se projetam para hipófise anterior e são responsáveis pela síntese e liberação do hormônio liberador de corticotrofina (CRH) e do hormônio liberador de tireotrofina (TRH) (Ghamari-Langroudi et al., 2010; Lennard et al., 1993). Por fim, o PVN possui uma população de neurônios parvocelulares que fazem sinapse com neurônios pré-motores simpáticos localizados no bulbo rostral ventrolateral (RVLM) e/ou neurônios simpáticos pré-ganglionares da coluna intermediolateral (CIML) da medula espinal (Pyner, Coote, 1999; 2000; Sawchenko, Swanson, 1982; Shafton et al., 1998) e diversas outras áreas do SNC.

O PVN é composto por uma complexa rede neuronal de neurotransmissores excitatórios e inibitórios, além de numerosas projeções para diversas áreas do SNC que

são importantes na regulação das funções desempenhadas pelo sistema nervoso autônomo, especialmente o simpático (Kenney et al., 2003). Nesse sentido, muitos trabalhos já avaliaram o papel de diferentes neurotransmissores no PVN sobre o nível de atividade simpática eferente e, um exemplo, foram estudos nos quais se observou que a microinjeção de aminoácidos excitatórios no PVN de animais acordados e anestesiados aumentou o nível de atividade simpática eferente, assim como a pressão arterial (PA), além de aumentar as concentrações plasmáticas de adrenalina e noradrenalina (Kannan et al., 1989; Katafuchi et al., 1988; Martin, Haywood, 1992). Muitas evidências também mostram um papel tônico inibitório do sistema GABAérgico em neurônios do PVN na regulação da atividade simpática. Nesse sentido, foi demonstrado que a microinjeção de muscimol (agonista de receptor GABA<sub>A</sub>), reduz a ANS renal em ratos anestesiados, enquanto que a administração de bicuculina (antagonista de receptor GABA<sub>A</sub>) no PVN aumentou a ANS renal e esplâncnica, a PA, a frequência cardíaca e a concentração plasmática de adrenalina e noradrenalina (Kenney et al., 2001; Martin et al., 1991; Tagawa, Dampney, 1999; Zhang, Patel, 1998). Além disso, sabe-se que existem outros neurotransmissores/neuromoduladores no PVN que podem influenciar o nível da atividade simpática, como por exemplo, o óxido nítrico (NO) (Zhang, Patel, 1998).

### **1.3 Neurotransmissão purinérgica**

O trifosfato de adenosina (ATP) é classicamente reconhecido como uma fonte intracelular de energia, porém, há algum tempo esta purina e seus metabólitos têm sido sugeridos como moléculas de sinalização extracelular (Burnstock, 1972). O ATP foi primeiramente proposto como transmissor em neurônios sensoriais, e posteriormente estabelecido como transmissor em nervos motores e em alguns neurônios do SNC. As principais ações do ATP como neurotransmissor são via ativação dos purinoreceptores do tipo P2, os quais são divididos em duas principais classes denominados receptores purinérgicos metabotrópicos P2Y e ionotrópicos P2X (Abbracchio, Burnstock, 1994; Burnstock, 2007). Os receptores purinérgicos P2Y são receptores acoplados à proteína G (G<sub>q/11</sub>, G<sub>s</sub>, G<sub>i</sub> e G<sub>1/o</sub>) e apresentam 8 subtipos diferentes (P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub>, P2Y<sub>6</sub>, P2Y<sub>11</sub>, P2Y<sub>12</sub>, P2Y<sub>13</sub>, P2Y<sub>14</sub>). Os receptores P2Y podem ser ativados por nucleotídeos



trifosfatos, nucleotídeos difosfatos, assim como por purinas e/ou pirimidinas dependendo do subtipo de receptor. A ativação de receptores P2Y desencadeia uma cascata de sinalização intracelular que envolve a ativação da fosfolipase C (PLC) e liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  de estoques intracelulares ou afeta a atividade da adenilato ciclase e altera os níveis de adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (AMPc). Já os receptores P2X são canais iônicos dependentes de ligante, permeáveis ao  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$ . Baseado na clonagem e expressão dos receptores purinérgicos em várias linhagens celulares, sete diferentes subtipos de receptores P2X ( $\text{P2X}_1$  –  $\text{P2X}_7$ ) já foram identificados. Os diferentes subtipos de receptores P2X tem sido classificados pelo seu grau de dessensibilização, seletividade por agonistas e antagonistas, propriedades de permeabilidade e sensibilidade às mudanças do pH extracelular (Burnstock, 2007; King et al., 1997; North, 2002).

Além disso, o ATP após ser liberado pode ser degradado no meio extracelular por enzimas (ATPases) extracelulares em adenosina difosfato (ADP), adenosina monofosfato (AMP) e adenosina, sendo que este último pode ser recaptado pelas células por transportadores específicos para sintetizar novamente ATP, o qual pode ser reincorporado em vesículas secretórias (Abbracchio, Burnstock, 1994; Burnstock, 2007). A adenosina também pode agir como neuromodulador por meio de sua ligação com receptores metabotrópicos P1 que são divididos em 4 subtipos (A1, A2a, A2b e A3), sendo que A1 e A3 são inibitórios e A2a e A2b são excitatórios (Burnstock, 2007).

A transmissão purinérgica é abundante no SNC, onde o ATP age particularmente como um neurotransmissor excitatório em muitas sinapses no encéfalo, na medula espinal e em terminais nervosos periféricos. Sendo assim, o ATP foi proposto pela primeira vez como neurotransmissor em 1954 por Holton e Holton, os quais demonstraram que esta substância teve a capacidade de promover vasodilatação na raiz dorsal espinal, fato que levou estes autores a sugerirem que o ATP seria liberado como neurotransmissor por terminais nervosos sensoriais. Posteriormente, outros trabalhos também demonstraram o papel do ATP como transmissor em neurônios motores (Burnstock et al., 1970; Burnstock, 1976) e em outras regiões do SNC (Edwards et al., 1992).

Além da neurotransmissão em neurônios, o ATP também é conhecido como um gliotransmissor. Existem evidências de múltiplas vias de liberação de ATP pelas células gliais. Nesse sentido, já foi detectado em astrócitos a presença de proteínas que participam da liberação de vesículas sinápticas e, manobras farmacológicas ou genéticas na função destas proteínas inibem a liberação de ATP (Maienschein et al., 1999; Pascual et al., 2005). Sabe-se também que as ondas de  $Ca^{2+}$  entre astrócitos são mediadas pela ativação de receptores purinérgicos e que a liberação de ATP por essas células é controlada por conexinas (Cotrina et al., 1998). Além disso, Gordon et al. (2005) demonstraram que a noradrenalina estimula a liberação de ATP pelas células gliais que, por sua vez, aumentaria a eficácia pós-sináptica glutamatérgica em NMC por promover a inserção pós-sináptica de receptores AMPA. Estes pesquisadores sugerem que a glia teria um papel fundamental na regulação da eficácia das sinapses excitatórias no SNC. Sendo assim, nota-se que a neurotransmissão purinérgica pode ter uma forte influência das células gliais, e sabendo-se da existência da interação entre neurônios e glia, pode-se sugerir que esta ação recíproca contribuiria em diversos mecanismos dentro do SNC, quer seja no controle da homeostasia ou mesmo em condições patológicas, como a hipertensão neurogênica.

Nesse sentido, alguns estudos de imunohistoquímica identificaram a presença de receptores P2X no hipotálamo (Cham et al., 2006; Guo et al., 2009; Shibuya et al., 1999; Yao et al., 2003). Além disso, Cham et al. (2006) identificaram a presença de receptores purinérgicos P2X em neurônios do PVN que se projetam para a região o RVLM. Estes pesquisadores sugeriram que o ATP poderia atuar como um neurotransmissor, influenciando a atividade dos NPC que se projetam para o RVLM e, dessa forma, o ATP atuando em neurônios do PVN teria um importante papel sobre a modulação da ANS. Muitos estudos já demonstraram que tanto a microinjeção do ATP, bem como de análogos estáveis do ATP ou mesmo antagonistas de receptores purinérgicos em núcleos encefálicos que modulam a atividade simpática são capazes de alterar a pressão arterial, frequência cardíaca e também a atividade respiratória (Antunes et al., 2005a,b; Braga et al., 2007; Cruz et al., 2010; de Paula et al., 2004; Moraes et al., 2011; Passamani et al., 2011; Yao, Lawrence, 2005).

#### 1.4 Cotransmissão purino-glutamatérgica

Além do papel do ATP como um neurotransmissor também há fortes evidências de que o mesmo possa desempenhar uma função de cotransmissor. Nesse sentido, Holton (1959) mostrou que o ATP pode ser liberado frente à estimulação antidrômica de colaterais sensoriais. Estes achados conjuntamente com a evidência de que o glutamato estaria presente em neurônios sensoriais aferentes primários sugeriam na época que o ATP e o glutamato seriam cotransmissores. Mais recentemente também foi demonstrada que a cotransmissão purinérgica-glutamatérgica também poderia ocorrer no hipocampo. Desta forma, Pankratov et al. (1998, 2002a) observaram importantes efeitos modulatórios do ATP sobre mecanismos glutamatérgicos. Além do mais, sabe-se que o ATP é armazenado e liberado por um conjunto de vesículas com características distintas, e que a liberação de ATP não é sincronizada com GABA ou glutamato (Pankratov et al., 2006). Ademais, a cooperação entre o ATP extracelular e os receptores NMDA na indução da potenciação de longo prazo em neurônios CA1 do hipocampo é consistente com a cotransmissão ATP-glutamato (Pankratov *et al.*, 2002b). Vale destacar que outros estudos também relataram a existência da cotransmissão de ATP com GABA (Jo, Role, 2002; Jo, Schlichter, 1999) e de ATP com noradrenalina (Poelchen et al., 2001; Sperlággh et al., 1998).

Todas estas evidências citadas anteriormente levantam a possibilidade de que o ATP pode funcionar como um neurotransmissor no PVN modulando a atividade simpática, além de participar como um possível cotransmissor com o glutamato. Todavia, não há qualquer trabalho até o momento na literatura científica que relacione a função dos receptores purinérgicos de neurônios do PVN bem como seu potencial papel como cotransmissor na modulação da atividade autônoma simpática frente a desafios osmóticos.

## 7 CONCLUSÃO

Coletivamente, nosso estudo evidencia que a ativação de receptores P2 pelo ATP em neurônios pré-simpáticos do PVN aumenta a frequência de potenciais de ação destes neurônios, via mudanças de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, e a atividade simpática. Além disso, existe uma forte interação entre ATP e glutamato nestes neurônios que contribui para a excitabilidade dos mesmos e para a simpatoexcitação. Finalmente, este sinergismo purino-glutamatérgico parece contribuir para o aumento da excitabilidade de neurônios PVN-RVLM e atividade simpática dependentes de alterações agudas da osmolaridade.

## REFERÊNCIAS\*

Abbracchio MP, Burnstock G. Purinoceptors: are there families of P2X and P2Y purinoceptors? *Pharmacol Ther.* 1994;64(3):445-75.

Adesnik H, Nicoll RA, England PM. Photoinactivation of native AMPA receptors reveals their real-time trafficking. *Neuron.* 2005;48(6):977-85.

Allan SM, Rothwell NJ. Cytokines and acute neurodegeneration. *Nat Rev Neurosci.* 2001;2(10):734-44.

Antunes VR, Bonagamba LG, Machado BH. Hemodynamic and respiratory responses to microinjection of ATP into the intermediate and caudal NTS of awake rats. *Brain Res.* 2005a;1032(1-2):85-93.

Antunes VR, Braga VA, Machado BH. Autonomic and respiratory responses to microinjection of ATP into the intermediate or caudal nucleus tractus solitarius in the working heart-brainstem preparation of the rat. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2005b;32(5-6):467-72.

Antunes VR, Yao ST, Pickering AE, Murphy D, Paton JF. A spinal vasopressinergic mechanism mediates hyperosmolality-induced sympathoexcitation. *J Physiol.* 2006;576(Pt 2):569-83.

Antunes-Rodrigues J, de Castro M, Elias LL, Valenca MM, McCann SM. Neuroendocrine control of body fluid metabolism. *Physiol Rev.* 2004;84:169–208.

Badoer E, Ng CW, De Matteo R. Glutamatergic input in the PVN is important in renal nerve response to elevations in osmolality. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2003;285(4):F640-50.

Bealer SL. Central control of cardiac baroreflex responses during peripheral hyperosmolality. *Am J Physiol.* 2000;278(5):R1157–R1163.

Bergquist F, Ludwig M. Dendritic transmitter release: a comparison of two model systems. *J Neuroendocrinol.* 2008 Jun;20(6):677-86.

\*De acordo com: International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [updated 2011 Jul 15]. Available from: <http://www.icmje.org>

Bhattacharya A, Vavra V, Svobodova I, Bendova Z, Vereb G, Zemkova H. Potentiation of inhibitory synaptic transmission by extracellular ATP in rat suprachiasmatic nuclei. *J Neurosci*. 2013;33(18):8035–44.

Borgdorff AJ, Choquet D. Regulation of AMPA receptor lateral movements. *Nature*. 2002;417(6889):649-53.

Bourque CW, Oliet SH. Osmoreceptors in the central nervous system. *Annu Rev Physiol*. 1997;59:601-19.

Braga VA, Soriano RN, Braccialli AL, de Paula PM, Bonagamba LG, Paton JF, Machado BH. Involvement of L-glutamate and ATP in the neurotransmission of the sympathoexcitatory component of the chemoreflex in the commissural nucleus tractus solitarius of awake rats and in the working heart-brainstem preparation. *J Physiol*. 2007;581(Pt 3):1129-45.

Burnstock G. Purinergic nerves. *Pharmacol Rev*. 1972;24(3):509-81.

Burnstock G. Do some nerve cells release more than one transmitter? *Neuroscience*. 1976;1(4):239-48.

Burnstock G. Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. *Physiol Rev*. 2007;87(2):659-797.

Burnstock G, Campbell G, Satchell D, Smythe A. Evidence that adenosine triphosphate or a related nucleotide is the transmitter substance released by non-adrenergic inhibitory nerves in the gut. *Br J Pharmacol*. 1970;40(4):668-88.

Busnardo C, Tavares RF, Corrêa FM. Role of N-methyl-D-aspartate and non-N-methyl-D-aspartate receptors in the cardiovascular effects of L-glutamate microinjection into the hypothalamic paraventricular nucleus of unanesthetized rats. *J Neurosci Res*. 2009;87(9):2066-77.

Calvert JA, Atterbury-Thomas AE, Leon C, Forsythe ID, Gachet C, Evans RJ. Evidence for P2Y1, P2Y2, P2Y6 and atypical UTP-sensitive receptors coupled to rises in intracellular calcium in mouse cultured superior cervical ganglion neurons and glia. *Br J Pharmacol*. 2004;143(5):525–32.

Cham JL, Owens NC, Barden JA, Lawrence AJ, Badoer E. P2X purinoceptor subtypes on paraventricular nucleus neurones projecting to the rostral ventrolateral medulla in the rat. *Exp Physiol*. 2006;91(2):403-11.

Chen QH, Toney GM. AT(1)-receptor blockade in the hypothalamic PVN reduces central hyperosmolality-induced renal sympathoexcitation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2001;281(6):R1844-53.

Chen QH, Haywood JR, Toney GM. Sympathoexcitation by PVN-injected bicuculline requires activation of excitatory amino acid receptors. *Hypertension*. 2003;42(4):725-31.

Choquet D, Triller A. The role of receptor diffusion in the organization of the postsynaptic membrane. *Nat Rev Neurosci*. 2003;4(4):251-65.

Chu CP, Kannan H, Qiu DL. Effect of hypertonic saline on rat hypothalamic paraventricular nucleus parvocellular neurons in vitro. *Neurosci Lett*. 2010;482(2):142-5.

Chu CP, Kato K, Jin QH, Qiu DL, Yu NS, Oiso Y & Kannan H (2005). Enhanced cardiovascular alteration and Fos expression induced by central salt loading in a conscious rat transgenic for the metallothionein-vasopressin fusion gene. *Neurosci Res* 53(2):147-55.

Cognet L, Groc L, Lounis B, Choquet D. Multiple routes for glutamate receptor trafficking: surface diffusion and membrane traffic cooperate to bring receptors to synapses. *Sci STKE*. 2006(327):pe13.

Coote JH, Yang Z, Pyner S, Deering J. Control of sympathetic outflows by the hypothalamic paraventricular nucleus. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 1998;25(6):461-3.

Cotrina ML, Lin JH, Alves-Rodrigues A, Liu S, Li J, Azmi-Ghadimi H, Kang J, Naus CC, Nedergaard M. Connexins regulate calcium signaling by controlling ATP release. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(26):15735-40.

Cruz JC, Bonagamba LG, Machado BH. Modulation of arterial pressure by P2 purinoceptors in the paraventricular nucleus of the hypothalamus of awake rats. *Auton Neurosci*. 2010;158(1-2):79-85.

D'Amico M, Samengo I, Navarra P, Tagliatela M, Martire M. AMPA- and P2X7-receptor-mediated facilitation of [3H]D-aspartate release from nerve terminals isolated from the rat caudal brainstem. *Neurochem Int.* 2010;57(6):623-8.

Dale N, Gourine AV, Llaudet E, Bulmer D, Thomas T, Spyer KM. Rapid adenosine release in the nucleus tractus solitarius during defence response in rats: real-time measurement in vivo. *J Physiol.* 2002;544: 149–60.

Dampney RA. Functional organization of central pathways regulating the cardiovascular system. *Physiol Rev.* 1994;74(2):323-64.

Dampney RA, Horiuchi J, Killinger S, Sheriff MJ, Tan PS, McDowall LM. Long-term regulation of arterial blood pressure by hypothalamic nuclei: some critical questions. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2005;32(5-6):419-25.

de Paula PM, Antunes VR, Bonagamba LG, Machado BH. Cardiovascular responses to microinjection of ATP into the nucleus tractus solitarius of awake rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2004;287(5):R1164-71.

Eckert MJ, Guévremont D, Williams JM, Abraham WC. Rapid visual stimulation increases extrasynaptic glutamate receptor expression but not visual-evoked potentials in the adult rat primary visual cortex. *Eur J Neurosci.* 2013;37(3):400–6.

Edwards FA, Gibb AJ, Colquhoun D. ATP receptor-mediated synaptic currents in the central nervous system. *Nature.* 1992;359(6391):144-7.

Esteban JA, Shi SH, Wilson C, Nuriya M, Huganir RL, Malinow R. PKA phosphorylation of AMPA receptor subunits controls synaptic trafficking underlying plasticity. *Nat Neurosci.* 2003;6(2):136–43.

Fischer W, Nörenberg W, Franke H, Schaefer M, Illes P (2009). Increase of intracellular Ca<sup>2+</sup> by P2Y but not P2X receptors in cultured cortical multipolar neurons of the rat. *J Comp Neurol.* 2009;516(5):343–59.

Ghamari-Langroudi M, Vella KR, Srisai D, Sugrue ML, Hollenberg AN, Cone RD. Regulation of thyrotropin-releasing hormone-expressing neurons in paraventricular nucleus of the hypothalamus by signals of adiposity. *Mol Endocrinol.* 2010;24(12):2366-81.



Gordon GR, Baimoukhametova DV, Hewitt SA, Rajapaksha WR, Fisher TE, Bains JS. Norepinephrine triggers release of glial ATP to increase postsynaptic efficacy. *Nat Neurosci.* 2005;8(8):1078-86.

Granger AJ, Shi Y, Lu W, Cerpas M, Nicoll RA. LTP requires a reserve pool of glutamate receptors independent of subunit type. *Nature.* 2013;493(7433):495–500.

Guo W, Sun J, Xu X, Bunstock G, He C, Xiang Z. P2X receptors are differentially expressed on vasopressin- and oxytocin-containing neurons in the supraoptic and paraventricular nuclei of rat hypothalamus. *Histochem Cell Biol.* 2009;131(1):29–41.

Guyenet PG. The sympathetic control of blood pressure. *Nat Rev Neurosci.* 2006;7(5):335-4.

Han TH, Lee K, Park JB, Ahn D, Park JH, Kim DY, Stern JE, Lee SY, Ryu PD. Reduction in synaptic GABA release contributes to target-selective elevation of PVN neuronal activity in rats with myocardial infarction. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2010;299(1):R129–39.

Haam J, Halmos KC, Di S, Tasker JG. Nutritional state-dependent ghrelin activation of vasopressin neurons via retrograde trans-neuronal-glia stimulation of excitatory GABA circuits. *J Neurosci.* 2014;34(18):6201–13.

Hatzinikolaou P, Gavras H, Brunner HR, Gavras I. Sodium-induced elevation of blood pressure in the anephric state. *Science.* 1980;209(4459):935–6.

Hatzinikolaou P, Gavras H, Brunner HR, Gavras I. Role of vasopressin, catecholamines, and plasma volume in hypertonic saline induced hypertension. *Am J Physiol.* 1981;240: H827–H831.

Holton P. The liberation of adenosine triphosphate on antidromic stimulation of sensory nerves. *J Physiol.* 1959;145(3):494-504.

Holton FA, Holton P. The capillary dilator substances in dry powders of spinal roots; a possible role of adenosine triphosphate in chemical transmission from nerve endings. *J Physiol.* 1954;126(1):124-40.

Homma K, Niino Y, Hotta K, Oka K. Ca<sup>2+</sup> influx through P2X receptors induces actin cytoskeleton reorganization by the formation of cofilin rods in neurites. *Mol Cell Neurosci*. 2008;37(2):261–70.

Jo YH, Role LW. Coordinate release of ATP and GABA at in vitro synapses of lateral hypothalamic neurons. *J Neurosci*. 2002;22(12):4794-804.

Jo YH, Schlichter R. Synaptic corelease of ATP and GABA in cultured spinal neurons. *Nat Neurosci*. 1999;2(3):241-5.

Kannan H, Hayashida Y, Yamashita H. Increase in sympathetic outflow by paraventricular nucleus stimulation in awake rats. *Am J Physiol*. 1989;256(6Pt2):R1325-30.

Kapoor JR, Sladek CD. Purinergic and adrenergic agonists synergize in stimulating vasopressin and oxytocin release. *J Neurosci*. 2000;20:8868–75.

Katafuchi T, Oomura Y, Kurosawa M. Effects of chemical stimulation of paraventricular nucleus on adrenal and renal nerve activity in rats. *Neurosci Lett*. 1988;86(2):195-200.

Kato F, Shigetomi E. Distinct modulation of evoked and spontaneous EPSCs by purinoceptors in the nucleus tractus solitarii of the rat. *J Physiol*. 2001;530: 469–86.

Kenney MJ, Weiss ML, Patel KP, Wang Y, Fels RJ. Paraventricular nucleus bicuculline alters frequency components of sympathetic nerve discharge bursts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001;281(3):H1233-41.

Kenney MJ, Weiss ML, Haywood JR. The paraventricular nucleus: an important component of the central neurocircuitry regulating sympathetic nerve outflow. *Acta Physiol Scand*. 2003;177(1):7-15.

Khakh BS. ATP-gated P2X receptors on excitatory nerve terminals onto interneurons initiate a form of asynchronous glutamate release. *Neuropharmacology*. 2009;56(1):216-22.

Khakh BS, Gittermann D, Cockayne DA, Jones A. ATP modulation of excitatory synapses onto interneurons. *J Neurosci*. 2003;23(19):7426-37.

King BF, Wildman SS, Ziganshina LE, Pintor J, Burnstock G. Effects of extracellular pH on agonism and antagonism at a recombinant P2X2 receptor. *Br J Pharmacol.* 1997;121(7):1445-53.

Kizer JS, Palkovits M, Brownstein MJ. Releasing factors in the circumventricular organs in the rat brain. *Endocrinology.* 1976;98(2):311-7.

Knott TK, Marrero HG, Custer EE, Lemos JR. Endogenous ATP potentiates only vasopressin secretion from neurohypophysial terminals. *J Cell Physiol.* 2008;217:155–61.

Kopach O, Kao SC, Petralia RS, Belan P, Tao YX, Voitenko N. Inflammation alters trafficking of extrasynaptic AMPA receptors in tonically firing lamina II neurons of the rat spinal dorsal horn. *Pain.* 2011;152(4):912–23.

Kopach O, Viatchenko-Karpinski V, Belan P, Voitenko N. Development of inflammation-induced hyperalgesia and allodynia is associated with the upregulation of extrasynaptic AMPA receptors in tonically firing lamina II dorsal horn neurons. *Front Physiol.* 2012;3:391.

Kubo T, Yanagihara Y, Yamaguchi H, Fukumori R. Excitatory amino acid receptors in the paraventricular hypothalamic nucleus mediate pressor response induced by carotid body chemoreceptor stimulation in rats. *Clin Exp Hypertens.* 1997;19(7):1117-34.

Landgraf R, Ludwig M. Vasopressin release within the supraoptic and paraventricular nuclei of the rat brain: osmotic stimulation via microdialysis. *Brain Res.* 1991 Sep 6;558(2):191-6.

Lennard DE, Eckert WA, Merchenthaler I. Corticotropin-releasing hormone neurons in the paraventricular nucleus project to the external zone of the median eminence: a study combining retrograde labeling with immunocytochemistry. *J Neuroendocrinol.* 1993 Apr;5(2):175-81.

Li DP, Chen SR, Pan HL. Adenosine inhibits paraventricular pre-sympathetic neurons through ATP-dependent potassium channels. *J Neurochem.* 2010;113(2):530-42.

Li YF, Jackson KL, Stern JE, Rabeler B, Patel KP. Interaction between glutamate and GABA systems in the integration of sympathetic outflow by the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006;291(6):H2847-56.

Li YF, Mayhan WG, Patel KP. NMDA-mediated increase in renal sympathetic nerve discharge within the PVN: role of nitric oxide. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001;281(6):H2328-36.

Lin DT, Makino Y, Sharma K, Hayashi T, Neve R, Takamiya K, Huganir RL. Regulation of AMPA receptor extrasynaptic insertion by 4.1N, phosphorylation and palmitoylation. *Nat Neurosci*. 2009;12(7):879–87.

Maienschein V, Marxen M, Volkandt W, Zimmermann H. A plethora of presynaptic proteins associated with ATP-storing organelles in cultured astrocytes. *Glia*. 1999;26(3):233-44.

Makino H, Malinow R. AMPA receptor incorporation into synapses during LTP: the role of lateral movement and exocytosis. *Neuron*. 2009;64(3):381–90.

Mao LM, Diaz JA, Fibuch EE, Wang JQ. Regulation of phosphorylation of synaptic and extrasynaptic GluA1 AMPA receptors in the rat forebrain by amphetamine. *Eur J Pharmacol*. 2013;715(1-3):164–71.

Martin DS, Haywood JR. Sympathetic nervous system activation by glutamate injections into the paraventricular nucleus. *Brain Res*. 1992;577(2):261-7.

Martin DS, Segura T, Haywood JR. Cardiovascular responses to bicuculline in the paraventricular nucleus of the rat. *Hypertension*. 1991;18(1):48-55.

Mayer ML, Armstrong N. Structure and function of glutamate receptor ion channels. *Annu Rev Physiol*. 2004;66:161–81.

Meeker RB, Greenwood RS, Hayward JN. Glutamate receptors in the rat hypothalamus and pituitary. *Endocrinology*. 1994;134:621–9.

Miles GB, Parkis MA, Lipski J, and Funk GD. Modulation of phrenic motoneurons excitability by ATP: consequences for respiratory-related output in vitro. *J Appl Physiol*. 2002;92:1899–910.

Moraes DJ, Bonagamba LG, Zoccal DB, Machado BH. Modulation of respiratory responses to chemoreflex activation by L-glutamate and ATP in the rostral ventrolateral medulla of awake rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2011;300(6):R1476-86.

Mori M, Tsushima H, Matsuda T. Antidiuretic effects of purinoceptor agonists injected into the hypothalamic paraventricular nucleus of water-loaded, ethanol-anesthetized rats. *Neuropharmacology*. 1992;31:585–92.

North RA. Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol Rev*. 2002;82(4):1013-67.

Ohta T, Kubota A, Murakami M, Otsuguro K, Ito S. P2X2 receptors are essential for  $[Ca^{2+}]_i$  increases in response to ATP in cultured rat myenteric neurons. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2005;289(5):G935–48.

Pankratov Y, Castro E, Miras-Portugal MT, Krishtal O. A purinergic component of the excitatory postsynaptic current mediated by P2X receptors in the CA1 neurons of the rat hippocampus. *Eur J Neurosci*. 1998;10(12):3898-902.

Pankratov Y, Lalo U, Krishtal O, Verkhratsky A. Ionotropic P2X purinoreceptors mediate synaptic transmission in rat pyramidal neurones of layer II/III of somato-sensory cortex. *J Physiol*. 2002a;542(Pt 2):529-36.

Pankratov YV, Lalo UV, Krishtal OA. Role for P2X receptors in long-term potentiation. *J Neurosci*. 2002b;22(19):8363-9.

Pankratov Y, Lalo U, Verkhratsky A, North RA. Vesicular release of ATP at central synapses. *Pflugers Arch*. 2006;452(5):589-97.

Pascual O, Casper KB, Kubera C, Zhang J, Revilla-Sanchez R, Sul JY, Takano H, Moss SJ, McCarthy K, Haydon PG. Astrocytic purinergic signaling coordinates synaptic networks. *Science*. 2005;310(5745):113-6.

Passamani LM, Pedrosa DF, Mauad H, Schenberg LC, Paton JF, Sampaio KN. Involvement of the purinergic system in central cardiovascular modulation at the level of the nucleus ambiguus of anaesthetized rats. *Exp Physiol*. 2011;96:262–74.

Paxinos G, Watson C. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. 4th ed. San Diego: Academic Press; 1998.

Poelchen W, Sieler D, Wirkner K, Illes P. Co-transmitter function of ATP in central catecholaminergic neurons of the rat. *Neuroscience*. 2001;102(3):593-602.

Pow DV, Morris JF. Dendrites of hypothalamic magnocellular neurons release neurohypophysial peptides by exocytosis. *Neuroscience*. 1989;32(2):435-9.

Pyner S, Coote JH. Identification of an efferent projection from the paraventricular nucleus of the hypothalamus terminating close to spinally projecting rostral ventrolateral medullary neurons. *Neuroscience*. 1999;88(3):949-57.

Pyner S, Coote JH. Identification of branching paraventricular neurons of the hypothalamus that project to the rostroventrolateral medulla and spinal cord. *Neuroscience*. 2000;100(3):549-56.

Raggenbass M. Overview of cellular electrophysiological actions of vasopressin. *Eur J Pharmacol*. 2008;583(2-3):243-54.

Richard D, Bourque CW. Synaptic control of rat supraoptic neurones during osmotic stimulation of the organum vasculosum lamina terminalis in vitro. *J Physiol*. 1995;489 (Pt 2):567-77.

Rubini P, Pinkwart C, Franke H, Gerevich Z, Nörenberg W, Illes P. Regulation of intracellular  $Ca^{2+}$  by P2Y1 receptors may depend on the developmental stage of cultured rat striatal neurons. *J Cell Physiol*. 2006;209(1):81-93.

Saitow F, Murakoshi T, Suzuki H, Konishi S. Metabotropic P2Y purinoceptor-mediated presynaptic and postsynaptic enhancement of cerebellar GABAergic transmission. *J Neurosci*. 2005;25(8):2108-16.

Sawchenko PE, Swanson LW. Immunohistochemical identification of neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus that project to the medulla or to the spinal cord in the rat. *J Comp Neurol*. 1982;205(3):260-72.

Schmidt-Salzmann C, Li L, Bischofberger J. Functional properties of extrasynaptic AMPA and NMDA receptors during postnatal hippocampal neurogenesis. *J Physiol*. 2014;592(Pt 1):125-40.

Scislo TJ, O'Leary DS. Differential role of ionotropic glutamatergic mechanisms in responses to NTS P(2x) and A(2a) receptor stimulation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000;278:H2057-68.

Shafton AD, Ryan A, Badoer E. Neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus send collaterals to the spinal cord and to the rostral ventrolateral medulla in the rat. *Brain Res.* 1998;801(1-2):239-43.

Share L, Claybaugh JR. Regulation of body fluids. *Annu Rev Physiol.* 1972;34:235–60.

Sharp FR, Sagar SM, Hicks K, Lowenstein D, Hisanaga K. c-fos mRNA, Fos, and Fos-related antigen induction by hypertonic saline and stress. *J Neurosci.* 1991;11(8):2321–31.

Shibuya I, Tanaka K, Hattori Y, Uezono Y, Harayama N, Noguchi J, Ueta Y, Izumi F, Yamashita H. Evidence that multiple P2X purinoceptors are functionally expressed in rat supraoptic neurones. *J Physiol.* 1999;514 ( Pt 2):351-67.

Singewald N, Philippu A. Involvement of biogenic amines and amino acids in the central regulation of cardiovascular homeostasis. *Trends Pharmacol Sci* 1996;17:356–63.

Soares C, Lee KF, Nassrallah W, Béique JC. Differential subcellular targeting of glutamate receptor subtypes during homeostatic synaptic plasticity. *J Neurosci.* 2013;33(33):13547–59.

Son SJ, Filosa JA, Potapenko ES, Biancardi VC, Zheng H, Patel KP, Tobin VA, Ludwig M, Stern JE. Dendritic peptide release mediates interpopulation crosstalk between neurosecretory and preautonomic networks. *Neuron.* 2013;78(6):1036–49.

Song Z, Sladek CD. Site of ATP and phenylephrine synergistic stimulation of vasopressin release from the hypothalamoneurohypophyseal system. *J Neuroendocrinol.* 2006;18:266–72.

Song Z, Vijayaraghavan S, Sladek CD. ATP increases intracellular calcium in supraoptic neurons by activation of both P2X and P2Y purinergic receptors. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2007;292(1):R423–31.

Sperlágh B, Sershen H, Lajtha A, Vizi ES. Co-release of endogenous ATP and [3H]noradrenaline from rat hypothalamic slices: origin and modulation by alpha2-adrenoceptors. *Neuroscience.* 1998;82(2):511-20.

St. Lambert JH, Thomas T, Burnstock G, and Spyer KM. A source of adenosine involved in cardiovascular responses to defense area stimulation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 1997;272:R195–R200.

Stocker SD, Hunwick KJ, Toney GM (2005). Hypothalamic paraventricular nucleus differentially supports lumbar and renal sympathetic outflow in water-deprived rats. *J Physiol.* 2005;563:249–63.

Stocker SD, Osborn JL, Carmichael SP. Forebrain osmotic regulation of the sympathetic nervous system. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2008;35:695–700.

Stocker SD, Toney GM. Median preoptic neurones projecting to the hypothalamic paraventricular nucleus respond to osmotic, circulating Ang II and baroreceptor input in the rat. *J Physiol.* 2005;568(Pt 2):599–615.

Swanson LW, Sawchenko PE. Hypothalamic integration: organization of the paraventricular and supraoptic nuclei. *Annu Rev Neurosci.* 1983;6:269-324.

Tagawa T, Dampney RA. AT(1) receptors mediate excitatory inputs to rostral ventrolateral medulla pressor neurons from hypothalamus. *Hypertension.* 1999;34(6):1301-7.

Thrasher TN. Circumventricular organs, thirst and vasopressin secretion. In: Schrier RW. *Vasopressin.* New York: Raven Press; 1985. p. 311.

van den Pol AN, Trombley PQ. Glutamate neurons in hypothalamus regulate excitatory transmission. *J Neurosci.* 1993;13(7):2829–36.

Vavra V, Bhattacharya A, Zemkova H. Facilitation of glutamate and GABA release by P2X receptor activation in supraoptic neurons from freshly isolated rat brain slices. *Neuroscience.* 2011;188:1–12.

Weindl A. Neuroendocrine aspects of circumventricular organs. *Front Neuroendoc.* 1973;3:3-32.

Weiss ML, Claassen DE, Hirai T, Kenney MJ. Nonuniform sympathetic nerve responses to intravenous hypertonic saline infusion. *J Auton Nerv Syst.* 1996;57:109–15.



Yao ST, Lawrence AJ. Purinergic modulation of cardiovascular function in the rat locus coeruleus. *Br J Pharmacol.* 2005;145(3):342-52.

Yao ST, Gourine AV, Spyer KM, Barden JA, Lawrence AJ. Localisation of P2X2 receptor subunit immunoreactivity on nitric oxide synthase expressing neurones in the brain stem and hypothalamus of the rat: a fluorescence immunohistochemical study. *Neuroscience.* 2003;121(2):411-9.

Zhang K, Patel KP. Effect of nitric oxide within the paraventricular nucleus on renal sympathetic nerve discharge: role of GABA. *Am J Physiol.* 1998;275(3 Pt 2):R728-34.

Zhang Z, Kindrat AN, Sharif-Naeini R, Bourque CW. Actin filaments mediate mechanical gating during osmosensory transduction in rat supraoptic nucleus neurons. *J Neurosci.* 2007;27(15):4008–13.

Zimmermann H. 5'-Nucleotidase: molecular structure and functional aspects. *Biochem J.* 1992;285 ( Pt 2):345-65.