

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

**EFEITO CARDIOVASCULAR DA
MICROINJEÇÃO DE L-GLUTAMATO NO
NÚCLEO SUPRA-ÓPTICO DE RATOS NÃO
ANESTESIADOS**

Cristiane Busnardo

**Ribeirão Preto
2006**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**EFEITO CARDIOVASCULAR DA
MICROINJEÇÃO DE L-GLUTAMATO NO
NÚCLEO SUPRA-ÓPTICO DE RATOS NÃO
ANESTESIADOS**

Cristiane Busnardo

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Farmacologia.

Orientador:
Prof. Dr. Fernando Morgan de Aguiar Corrêa

Ribeirão Preto
2006

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca Central do Campus Administrativo de Ribeirão Preto/USP

Busnardo, Cristiane.

Efeito cardiovascular da microinjeção de L-glutamato no núcleo supra-
óptico de ratos não anestesiados. Ribeirão Preto, 2006.

68 p.: ; 31cm

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão
Preto/USP. Área de concentração: Farmacologia.

Orientador: Corrêa, Fernando Morgan de Aguiar

1. L-glutamato. 2. pressão arterial. 3. frequência cardíaca. 4. núcleo supra-
óptico.

Data da Defesa: 27 de junho de 2006

Banca Examinadora

Prof. Dr. Fernando Morgan de Aguiar Corrêa _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof Dr. Benedito Honório Machado _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. Ruy Ribeiro de Campos Junior _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dedico,

Ao meu pai Edmur, que sempre me incentivou a estudar, pelos conselhos dados com sabedoria, por me ensinar que é necessário esforço e dedicação para alcançar um objetivo. Mas principalmente por me mostrar que é mais eficaz ensinar através de exemplos e ele é exemplo de inteligência, caráter e honestidade.

A minha mãe Roseli, por ter seus olhos encharcados de amor, por aliviar minhas angustias, por me ajudar e incentivar nos momentos difíceis, por nunca deixar que me sentisse só.

A minha irmã Renata, por compartilharmos deste mesmo sonho, pelos cuidados de mãe que ela tem comigo, pelo amor e amizade que compartilhamos, pelo vínculo mais forte que nos une.

Ao meu irmão Carlos, por transformar nossas conversas em estímulos para eu seguir em frente, por me apoiar e ajudar em todos os momentos, pela nosso amor e amizade.

A DEUS, por ter colocado cada uma dessas pessoas na minha vida que me ajudaram a crescer como ser humano, por dirigir meus passos sempre me conduzindo as melhores decisões.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Fernando Morgan de Aguiar Corrêa, por ter me aceitado em seu laboratório, pela paciência com que sempre me orientou, por sua conduta profissional e competência, as quais servem de exemplo para minha formação. Muito obrigada!

Ao Prof. Dr. Francisco Silveira Guimarães pela acessória e colaboração durante todo este período.

Aos membros da banca examinadora: Prof. Dr. Benedito Honório Machado e Prof. Dr. Ruy Ribeiro de Campos Junior, pelas sugestões que contribuíram para melhoria deste trabalho.

Aos professores do departamento de farmacologia do curso de pós-graduação desta faculdade, por contribuírem para o meu desenvolvimento profissional.

A todos os meus amigos pós-graduandos do departamento de farmacologia, em particular a Renata Grespan, Mani Indiana, Sâmia Joca, Daniele Aguiar, Carlos Dias Junior, Éllen Rizzi, Flavia Lima, José Wilson, Juliano Manvailer, Marcelo Montenegro, Marcos Rodrigues, Maria José Figueiredo, Maria Regina Martinez, Michele de Castro, Renato Leonardo, Vanessa Soares pela amizade.

A todos os funcionários do departamento de farmacologia pela amizade e colaboração.

A Idália I.B. Aguiar e Ivanilda A.C. Fortunato, pela amizade, carinho e pela assistência técnica na realização dos procedimentos cirúrgicos e preparação dos cortes histológicos.

A Simone S. Guilhaume, pela alegria, atenção, carinho e disponibilidade.

Aos funcionários Sônia Andrade, José Waldik Ramon e Fátima Petean, por toda competência, disponibilidade, atenção com que atendem as nossas necessidades burocráticas.

A Eliana e Maria Inês, por sempre serem prestativas e cuidarem dos animais com atenção e respeito.

A Diva por todo cuidado na lavagem do nosso material.

Aos meus amigos e companheiros de laboratório:

- Leonardo Resstel por me incentivar nos estudos para o ingresso na pós-graduação, por ter me ensinado e ajudado de forma significativa;
- Gislaine Gomes por todo carinho, amizade, paciência e principalmente disponibilidade em tirar minhas dúvidas;
- Fernando Alves por ter sido meu companheiro de todas as horas, pela grande amizade e por ter se tornado um irmão para mim;
- Ao Carlos Crestani, Daniel Reis, Eduardo Fortaleza, América Scopinho e Milena Deolindo por me proporcionarem momentos agradáveis e me ajudarem sempre que necessitei.

Em especial, ao Rodrigo F. Tavares, que teve papel crucial no desenvolvimento deste trabalho, por todo carinho e atenção, pela paciência e disponibilidade na leitura dos meus relatórios, por toda preocupação que constantemente dedicou, por estar sempre pronto a ensinar e ajudar.

A todos os meus familiares, em especial, a tia Eliete, tio Paulo, tia Eliana, as minhas primas Fernanda, Andréa e Juliana e meu cunhado Rodrigo por estarem sempre presentes. Agradeço pelos conselhos que sempre contribuíram para o meu crescimento.

Aos meus grandes amigos, Mônica Tenaglia, Flavia Arbex, Camila Azzi, Claudia Arbex, Anna Faria, Ana Carolina Gomes, Lyandra Neder, Maria Verônica Ferrareze, Miriam C. de Souza, Elizabeth Sales, Helen Miranda, Tatiana Brasil, Andréia Corte , Bruno Teno, Gustavo Cunha, João Paulo Braga, Sylvio Palma, Fernando Perez, Rafael Fioretti e Fernando Okamoto por sempre me apoiarem e incentivarem, pela amizade, carinho e amor que compartilhamos.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

A CAPES, pelo auxílio financeiro durante a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO.....	1
ABSTRACT	3
INTRODUÇÃO	4
OBJETIVOS	11
MATERIAL E MÉTODOS.....	13
1. ANIMAIS	14
2. TÉCNICA DE IMPLANTE DE CÂNULA GUIA NO NSO	14
3. REGISTRO DA PRESSÃO ARTERIAL E FREQUÊNCIA CARDÍACA DE RATOS NÃO ANESTESIADOS.....	15
4. MICROINJEÇÃO DE DROGA NO NSO.....	17
5. DROGAS UTILIZADAS.....	17
6. DETERMINAÇÃO ANATÔMICA DO SÍTIO DE INJEÇÃO DA DROGA	18
7. ANÁLISE ESTATÍSTICA	18
PROTOS COLOS EXPERIMENTAIS.....	19
1. EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE L-GLU NO NSO DE RATOS NÃO ANESTESIADOS SOBRE A PRESSÃO ARTERIAL (CURVA CONCENTRAÇÃO-RESPOSTA)	20
2. EFEITO DE SUCESSIVAS MICROINJEÇÕES DE L-GLU NO NSO DE RATOS NÃO ANESTESIADOS.....	21
3. ALTERAÇÕES CARDIOVASCULARES CAUSADAS PELA MICROINJEÇÃO L-GLU NO NSO DE RATOS NÃO ANESTESIADOS OU ANESTESIADOS POR URETANA	21
4. PRÉ-TRATAMENTO LOCAL COM LY.....	21
5. PRÉ-TRATAMENTO LOCAL COM NBQX.....	22
6. PRÉ-TRATAMENTO COM PENTOLÍNIO	22
7. PRÉ-TRATAMENTO COM DTIR(CH ₂) ₅ (ME)AVP	22
RESULTADOS	23
1. EFEITO DA MICROINJEÇÃO DE L-GLU NO NSO DE RATOS NÃO ANESTESIADOS SOBRE A PRESSÃO ARTERIAL E FREQUÊNCIA CARDÍACA.....	24
2. EFEITO DE MICROINJEÇÕES SUCESSIVAS DE L-GLU NO NSO DE RATOS NÃO ANESTESIADOS.....	29
3. EFEITO DA ANESTESIA POR URETANA SOBRE A RESPOSTA PRESSORA A MICROINJEÇÃO DE L-GLU NO NSO	32
4. EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO LOCAL COM LY235959 SOBRE A RESPOSTA PRESSORA A MICROINJEÇÃO DE L-GLU NO NSO DE RATOS NÃO ANESTESIADOS	35
5. EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO LOCAL COM NBQX SOBRE A RESPOSTA PRESSORA A MICROINJEÇÃO DE L-GLU NO NSO DE RATOS NÃO ANESTESIADOS	38
6. EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO COM PENTOLÍNIO SOBRE A RESPOSTA PRESSORA À MICROINJEÇÃO DE L-GLU NO NSO DE RATOS NÃO ANESTESIADOS.	41
7. EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO COM DTIR(CH ₂) ₅ (ME)AVP SOBRE A RESPOSTA PRESSORA À MICROINJEÇÃO DE L-GLU NO NSO DE RATOS NÃO ANESTESIADOS.	45
DISCUSSÃO	48
CONCLUSÕES	56
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58
APÊNDICE	68

ÍNDICE DE TABELA E FIGURAS

TABELA 1 – VARIAÇÕES NA PRESSÃO ARTERIAL MÉDIA (Δ PAM) E FREQUÊNCIA CARDÍACA (Δ FC), EM RESPOSTA A MICROINJEÇÃO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE L-GLU NO NSO DE RATOS NÃO-ANESTESIADOS.....	26
FIGURA 1 – EFEITO DA MICROINJEÇÃO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE L-GLU OU LCA NO NSO OU FORA DO NSO DE RATOS NÃO ANESTESIADOS, SOBRE A PRESSÃO ARTERIAL MÉDIA (PAM) E A FREQUÊNCIA CARDÍACA (FC).....	26
FIGURA 2 – A) VARIAÇÕES NA PRESSÃO ARTERIAL MÉDIA (Δ PAM,) E FREQUÊNCIA CARDÍACA (Δ FC) APÓS MICROINJEÇÃO DE LCA OU L-GLU NA CONCENTRAÇÃO DE 0,1M NO NSO DE RATOS NÃO ANESTESIADOS. B) REPRESENTAÇÃO DIAGRAMÁTICA DOS SÍTIOS DE INJEÇÃO DE L-GLU NO NSO E FORA DO NSO.....	27
FIGURA 3 – REGISTROS DE PRESSÃO ARTERIAL MÉDIA (PAM), PRESSÃO ARTERIAL PULSÁTIL (PAP) E FREQUÊNCIA CARDÍACA (FC) DE UM RATO REPRESENTATIVO DO GRUPO, MOSTRANDO O EFEITO DA MICROINJEÇÃO DE L-GLUTAMATO (L-GLU, 0,1M) NO NSO.....	28
FIGURA 4 – FOTOMICROGRAFIA DE CORTE HISTOLÓGICO DO CÉREBRO DE UM RATO REPRESENTANDO O SÍTIO DE INJEÇÃO DE L- GLUTAMATO NO NSO.....	28
FIGURA 5 – A) VARIAÇÕES NA PRESSÃO ARTERIAL MÉDIA (Δ PAM) E FREQUÊNCIA CARDÍACA (Δ FC) CAUSADAS PELA MICROINJEÇÃO DE L-GLU ANTES E APÓS A MICROINJEÇÃO DE LCA NO NSO DE RATOS NÃO ANESTESIADOS, MOSTRANDO A NÃO OCORRÊNCIA DE TAQUIFILAXIA. B) REPRESENTAÇÃO DIAGRAMÁTICA DOS SÍTIOS DE INJEÇÃO NO NSO.....	30
FIGURA 6 – REGISTROS DE PRESSÃO ARTERIAL MÉDIA (PAM), PRESSÃO ARTERIAL PULSÁTIL (PAP) E FREQUÊNCIA CARDÍACA (FC) DE UM RATO REPRESENTATIVO DO GRUPO, MOSTRANDO O EFEITO DA MICROINJEÇÃO DE L-GLUTAMATO (L-GLU, 0,1M) NO NSO ANTES E APÓS A MICROINJEÇÃO DE LCA.....	31
FIGURA 7 – A) VARIAÇÕES NA PRESSÃO ARTERIAL MÉDIA (Δ PAM) E FREQUÊNCIA CARDÍACA (Δ FC) APÓS MICROINJEÇÃO DE L-GLU NA CONCENTRAÇÃO DE 0,1M NO NSO DE RATOS NÃO ANESTESIADOS OU ANESTESIADOS POR URETANA. B) REPRESENTAÇÃO DIAGRAMÁTICA DOS SÍTIOS DE INJEÇÃO NO NSO	33
FIGURA 8 – REGISTROS DE PRESSÃO ARTERIAL MÉDIA (PAM), PRESSÃO ARTERIAL PULSÁTIL (PAP) E FREQUÊNCIA CARDÍACA (FC) DE UM RATO ANESTESIADO REPRESENTATIVO DO GRUPO, MOSTRANDO O EFEITO DA MICROINJEÇÃO DE L-GLUTAMATO (L-GLU, 0,1M) NO NSO.....	34
FIGURA 9 – VARIAÇÕES NA PRESSÃO ARTERIAL MÉDIA (Δ PAM) E FREQUÊNCIA CARDÍACA (Δ FC) CAUSADAS PELA MICROINJEÇÃO L-GLU ANTES E APÓS A MICROINJEÇÃO DE LY235959 (LY) NO NSO DE RATOS NÃO ANESTESIADOS. B) REPRESENTAÇÃO DIAGRAMÁTICA DOS SÍTIOS DE INJEÇÃO NO NOS.....	36

FIGURA 10 – REGISTROS DE PRESSÃO ARTERIAL MÉDIA (PAM), PRESSÃO ARTERIAL PULSÁTIL (PAP) E FREQUÊNCIA CARDÍACA (FC) DE UM RATO REPRESENTATIVO DO GRUPO, MOSTRANDO O EFEITO DA MICROINJEÇÃO DE L-GLUTAMATO (L-GLU, 0,1M) NO NSO ANTES E APÓS A MICROINJEÇÃO DE LY235959 NO NSO.....37

FIGURA 11 – A) VARIAÇÕES NA PRESSÃO ARTERIAL MÉDIA (Δ PAM) E FREQUÊNCIA CARDÍACA (Δ FC) CAUSADAS PELA MICROINJEÇÃO DE L-GLU ANTES E APÓS A MICROINJEÇÃO DE (NBQX) NO NSO DE RATOS NÃO ANESTESIADOS. B) REPRESENTAÇÃO DIAGRAMÁTICA DOS SÍTIOS DE INJEÇÃO NO NSO.....39

FIGURA 12 – REGISTROS DE PRESSÃO ARTERIAL MÉDIA (PAM), PRESSÃO ARTERIAL PULSÁTIL (PAP) E FREQUÊNCIA CARDÍACA (FC) DE UM RATO REPRESENTATIVO DO GRUPO, MOSTRANDO O EFEITO DA MICROINJEÇÃO DE L-GLUTAMATO (L-GLU, 0,1M) NO NSO ANTES E APÓS A MICROINJEÇÃO DE NBQX NO NSO.....40

FIGURA 13 - PRESSÃO ARTERIAL MÉDIA (PAM) ANTES E APÓS A MICROINJEÇÃO DE L-GLU REGISTRADAS ANTES E APÓS O PRÉ-TRATAMENTO COM O BLOQUEADOR GANGLIONAR PENTOLÍNIO (5MG/KG I.V.), EM RATOS NÃO ANESTESIADOS.....42

FIGURA 14 – FREQUÊNCIA CARDÍACA (FC) ANTES E APÓS A MICROINJEÇÃO DE L-GLU REGISTRADAS ANTES E APÓS O PRÉ-TRATAMENTO COM O BLOQUEADOR GANGLIONAR PENTOLÍNIO (5MG/KG I.V.), EM RATOS NÃO ANESTESIADOS.....42

FIGURA 15 – A) VARIAÇÕES NA PRESSÃO ARTERIAL MÉDIA (Δ PAM) E FREQUÊNCIA CARDÍACA (Δ FC) CAUSADAS PELA MICROINJEÇÃO DE L-GLU ANTES E APÓS A INJEÇÃO I.V. DE PENTOLÍNIO DE RATOS NÃO ANESTESIADOS. B) REPRESENTAÇÃO DIAGRAMÁTICA DOS SÍTIOS DE INJEÇÃO NO NOS.....43

FIGURA 16 – REGISTROS DE PRESSÃO ARTERIAL MÉDIA (PAM), PRESSÃO ARTERIAL PULSÁTIL (PAP) E FREQUÊNCIA CARDÍACA (FC) DE UM RATO REPRESENTATIVO DO GRUPO, MOSTRANDO O EFEITO DA MICROINJEÇÃO DE L-GLUTAMATO (L-GLU, 0,1M) NO NSO ANTES E APÓS A INJEÇÃO I.V. DE PENTOLÍNIO.....44

FIGURA 17 – A) VARIAÇÕES NA PRESSÃO ARTERIAL MÉDIA (Δ PAM) E FREQUÊNCIA CARDÍACA (Δ FC) CAUSADAS PELA MICROINJEÇÃO DE L-GLU ANTES E APÓS A INJEÇÃO I.V. DE DTYR(CH₂)₅MEAVP DE RATOS NÃO ANESTESIADOS. B) REPRESENTAÇÃO DIAGRAMÁTICA DOS SÍTIOS DE INJEÇÃO NO NSO.....46

FIGURA 18 – REGISTROS DE PRESSÃO ARTERIAL MÉDIA (PAM), PRESSÃO ARTERIAL PULSÁTIL (PAP) E FREQUÊNCIA CARDÍACA (FC) DE UM RATO REPRESENTATIVO DO GRUPO, MOSTRANDO O EFEITO DA MICROINJEÇÃO DE L-GLUTAMATO (L-GLU, 0,1M) NO NSO ANTES E APÓS A INJEÇÃO I.V. DE DTIR(CH₂)₅MEAVP.....47

RESUMO

O núcleo supra-óptico do hipotálamo (NSO) contém neurônios magnocelulares que sintetizam e secretam vasopressina e ocitocina. A estimulação elétrica do NSO causa resposta pressora através da liberação de vasopressina. O L-glutamato (L-glu) é o principal neurotransmissor excitatório do Sistema Nervoso Central, estando presente no NSO. No presente trabalho relatamos os efeitos cardiovasculares da microinjeção de L-glu no NSO e identificamos os possíveis receptores e mecanismos envolvidos na gênese destes efeitos. Drogas foram microinjetadas em um volume de 100 nL. A microinjeção de L-glu no NSO causou resposta pressora e bradicárdica em ratos não-anestesiados. As respostas cardiovasculares foram concentração-dependente, apresentando CE_{50} de aproximadamente 0,1M. As respostas cardiovasculares à injeção de L-glu no NSO foram significativamente reduzidas em ratos anestesiados com uretana. Em animais não anestesiados, a resposta pressora e bradicárdica foi bloqueada pelo pré-tratamento local com NBQX (0.02M), um antagonista seletivo dos receptores não-NMDA, não sendo afetadas pelo pré-tratamento local com LY (0.02M), antagonista seletivo de receptores NMDA. Estes resultados sugerem que receptores glutamatérgicos do subtipo não-NMDA medeiam estas respostas. A resposta pressora ao L-glu foi potencializada pela injeção i.v. de pentolínio, bloqueador ganglionar, enquanto a resposta de bradicardia foi bloqueada. A resposta pressora e bradicárdica foi bloqueada pelo pré-tratamento i.v. com dTir $(CH_2)_5(Me)$ AVP, um antagonista vasopressinérgico. Os resultados sugerem ser a bradicardia de

origem reflexa, bem como sugerem o envolvimento de vasopressina na gênese da resposta pressora ao L-glu no NSO.

Em conclusão, os resultados indicam que a resposta pressora à microinjeção de L-glu no NSO é dependente da ativação de receptores glutamatérgicos do subtipo não-NMDA, sendo mediada por liberação de vasopressina para a circulação periférica.

ABSTRACT

The supra-optic hypothalamic nucleus (SON) contains magnocellular cells that release vasopressin and oxytocin. SON electrical stimulation causes pressor responses due to vasopressin release. L-glutamate (L-glu) is involved in cardiovascular control and it is present in the SON. We attempted to verify the cardiovascular effects of L-glu microinjection in the SON and to identify possible receptor and mechanisms involved. Drugs were injected in the final volume of 100 nL. L-glu microinjection into the SON caused pressor and bradycardic responses in unanesthetized rats. The cardiovascular response was dose-related and the approximate EC_{50} value was 0.1M. These responses were markedly reduced in the urethane-anesthetized rats. The pressor and bradycardic response was blocked by local pretreatment with NBQX (0.02M), a selective non-NMDA antagonist and it was not affected by pretreatment with LY 235959 (0.02M), a selective NMDA antagonist, suggesting that non-NMDA glutamate receptors mediate the responses. The pressor response to L-glu was potentiated by intravenous pretreatment with the ganglionic blocker pentolinium, whereas the bradycardic response was abolished by ganglion blockade. The pressor and bradycardic response to L-glu were blocked by i.v. treatment with the vasopressin antagonist dTyr(CH₂)₅(Me)AVP. Results suggest a reflex nature of the bradycardic response and involvement of circulating vasopressin in the evoked pressor response. In conclusion, the present results indicate that the pressor response to L-glu microinjection into the SON is dependent on non-NMDA glutamate receptors activation and is mediated by vasopressin release into the circulation.

INTRODUÇÃO

O sistema cardiovascular desempenha um papel fundamental na homeostase, garantindo uma distribuição adequada do fluxo sanguíneo aos diferentes órgãos e tecidos do corpo. O controle do sistema cardiovascular pode ser dividido em três níveis distintos, segundo uma organização hierárquica (FOLKOW, 1987): controle local, exercido pela atividade miogênica do músculo liso vascular e do miocárdio, assim como por substâncias vasoativas liberadas pelo endotélio vascular; controle por estruturas neurais bulbares e controle por centros neurais suprabulbares.

Fatores humorais tais como a vasopressina e o sistema renina-angiotensina promovem o ajuste da pressão arterial em longo prazo, tanto por controlar o volume sanguíneo quanto por sua atividade vasoconstritora (COWLEY; QUILLEN; SKELTON, 1983; COWLEY & LIARD, 1988; SZCZEPANSKA-SADOWSKA, 1996).

A regulação central do sistema cardiovascular envolve centros bulbares, tais como o núcleo do trato solitário (NTS) e os núcleos bulbares rostroventrolateral (RVLM) e caudoventrolateral (CVLM), responsáveis pela manutenção do tônus pressório geral e pelo controle instantâneo da pressão arterial. Os neurônios do RVLM determinam a frequência de descarga dos neurônios pré-ganglionares simpáticos, mantendo o tônus vascular (ROSS *et al.*, 1984; REIS *et al.*, 1988; SUN *et al.*, 1988; VERBERNE & OWENS, 1998). Em situações de alterações posturais, respiratórias e de volume sanguíneo, a pressão arterial é mantida em uma faixa estreita de variação por ativação de mecanismos reflexos, que incluem o barorreflexo, o quimiorreflexo e o reflexo cardiopulmonar (GOLDSTEIN, 1991).

Além dos centros bulbares, que são as principais estruturas envolvidas no controle cardiovascular, estão também envolvidas áreas suprabulbares, tais como estruturas da ponte dorsal e ventral, incluindo o complexo do núcleo parabraquial e de Kolliker-Füese, o grupo de células A5, a substância cinzenta periaquedutal (SCP), o núcleo cuneiforme, o núcleo central da amígdala e também regiões do córtex cerebral e do hipotálamo (DAMPNEY, 1994).

Dentre os núcleos hipotalâmicos envolvidos no controle cardiovascular, o núcleo supra-óptico (NSO) contém células neuroendócrinas magnocelulares que produzem vasopressina e ocitocina as quais são transportadas para neurohipófise, sendo secretadas para circulação sistêmica. A ocitocina está envolvida, principalmente, na estimulação de contrações uterinas durante o trabalho de parto e na ejeção de leite (CUNNINGHAM & SAWCHENKO, 1991). Estímulos diversos tais como alterações cardiovasculares, variações osmóticas e estresse promovem liberação de ocitocina, sugerindo que esse hormônio seja importante nessas situações, porém essas funções ainda não estão bem estabelecidas.

A vasopressina exerce papel importante no controle dos fluidos extracelulares e na manutenção do volume sanguíneo (BISSET, 1988). A ação antidiurética da vasopressina é o principal efeito deste hormônio, envolvendo o aumento da reabsorção de água nos ductos coletores renais. A vasopressina circulante ativa receptores vasopressinérgicos do tipo V_2 das membranas luminiais das células tubulares, levando a um aumento de cAMP intracelular e fosforilação da cadeia COOH-terminal da aquaporina (vesícula que tem poros altamente permeáveis a água), fazendo com que essas vesículas sejam inseridas na membrana celular apical, fornecendo assim muitas áreas de alta

permeabilidade à água. O outro efeito da vasopressina deve-se a sua atuação nas arteríolas, ativando os receptores vasopressinérgicos do tipo V₁, promovendo vasoconstrição e conseqüente aumento de pressão arterial.

Estímulos fisiológicos tais como variações na pressão arterial, volume sanguíneo e osmolalidade promovem ou inibem a liberação de vasopressina (CUNNINGHAM *et al.*, 2004). Com o aumento ou redução na concentração do líquido extracelular, ocorre saída ou entrada de água da célula osmoreceptora por osmose, diminuindo ou aumentando seu tamanho e iniciando sinais nervosos apropriados no hipotálamo, para estimular ou inibir a secreção de vasopressina. Outro estímulo que causa secreção intensa de vasopressina é a redução do volume sanguíneo com queda na pressão arterial. Os átrios, em especial, o átrio direito, têm receptores de estiramento que são excitados por sobrecarga decorrente de aumento no volume sanguíneo, causando inibição na liberação de vasopressina. Por outro lado, quando há redução no volume sanguíneo estes receptores não são excitados, aumentando a secreção de vasopressina.

A concentração plasmática destes hormônios pode ser alterada pela atividade dos neurônios do NSO, assim como por outros centros neuroniais conectados ao NSO (CUNNINGHAM *et al.*, 2004). Estudos eletrofisiológicos demonstraram que a estimulação dos barorreceptores cardíacos inibe a atividade de neurônios vasopressinérgicos, mas não afeta significativamente neurônios ocitocinérgicos do NSO, sugerindo que os neurônios vasopressinérgicos estariam mais envolvidos na modulação cardiovascular do que os ocitocinérgicos (CUNNINGHAM *et al.*, 2002).

Yang e Coote (2006) relataram que a injeção intratecal de L-glu e vasopressina causaram um aumento na atividade simpática renal. A redução do volume sanguíneo pela retirada de 1mL de sangue também causou aumento na atividade simpática renal. Este aumento na atividade simpática causado tanto por injeção de agonistas quanto por redução do volume sanguíneo foram reduzidos por antagonista glutamatérgico (ácido quinurênico) ou antagonista dos receptores vasopressinérgicos do tipo V_1 . Quando o ácido quinurênico foi administrado conjuntamente com o antagonista vasopressinérgico, a redução foi maior do que cada pré-tratamento em isolado, sugerindo uma integração entre os sistemas glutamatérgico e vasopressinérgico centrais, na modulação da atividade simpática cardiovascular.

Com o objetivo de investigar o papel do núcleo paraventricular (NPV) e do NSO na regulação cardiovascular, Ciriello e Calaresu (1980) estimularam eletricamente estas áreas em gatos e observaram respostas cardiovasculares caracterizadas por aumento da pressão arterial e da frequência cardíaca. Em gatos vagotomizados e simpatectomizados por lesão espinal ao nível da C2, o aumento na frequência cardíaca foi abolido, porém a resposta pressora foi apenas parcialmente reduzida. Esses autores sugeriram que essa resposta remanescente seria decorrente de liberação aguda de vasopressina, embora eles não a tenham comprovado experimentalmente. Portanto, a estimulação elétrica do NPV e do NSO de gatos promove respostas pressoras que podem ser mediadas por fatores neurais (simpático) e humorais (vasopressina).

A estimulação química do NPV com L-glutamato (L-glu) causou respostas depressoras em ratos anestesiados, devido a uma inibição da

atividade simpática (KANNAN, NIIJIMA, YAMASHITA, 1988). Em ausência de anestesia ocorre inversão da resposta. Assim sendo, a microinjeção de L-glu no NPV de ratos acordados causou respostas pressoras mediadas por ativação do sistema simpático, sem a participação de vasopressina, já que a microinjeção de um antagonista vasopressinérgico, dTir(CH₂)₅(Me)AVP não alterou a resposta ao L-glu (KANNAN, HAYASHIDA, YAMASHITA, 1989; MARTIN E HAYWOOD, 1992). Portanto, vários estudos mostraram o envolvimento do NPV no controle do sistema cardiovascular e na liberação de vasopressina. Entretanto, não existem estudos correlatos mostrando a participação do NSO no controle cardiovascular.

Em outras áreas do SNC tais como a banda diagonal de Broca (dbB) e a SCP, a microinjeção de L-glu causou respostas pressoras mediadas por liberação de vasopressina (TAVARES & CORRÊA, 2003; PIZZIRUSSO *et al.*, 1998). Estes resultados mostraram o envolvimento dos receptores glutamatérgicos dessas regiões cerebrais na liberação de vasopressina.

O L-glu é o principal aminoácido excitatório do SNC. Os neurônios magnocelulares do hipotálamo são densamente inervados por sinapses glutamatérgicas (BOUDABA, DI, TASKER, 2003). Estudos moleculares e funcionais confirmaram a presença de receptores glutamatérgicos no NSO. Além de receptores, foi detectada a presença de RNA mensageiros para os mesmos (PAK & CURRAS-COLLAZO, 2002). A importância dos receptores glutamatérgicos na liberação dos hormônios dos neurônios magnocelulares do NSO foi descrito pela primeira vez por Sladek *et al.* (1995) os quais demonstraram que a aplicação de ácido quinurênico, um antagonista

glutamatérgico, inibe a liberação de vasopressina durante a estimulação hiperosmótica em preparações isoladas do hipotálamo.

Em estudos realizados em nosso laboratório foi observado que a microinjeção de L-glu no hipotálamo lateral causava respostas hipotensoras, e que quando os sítios de injeção eram ventrais ao hipotálamo lateral, próximos ou diretamente no NSO, respostas pressoras e bradicárdicas foram observadas (PAJOLLA & CORRÊA, 2004). Porém, os mecanismos centrais e periféricos envolvidos nestas respostas pressoras não foram investigados.

Diante destas evidências e da ausência de dados na literatura, nos propusemos a investigar se a ativação dos receptores glutamatérgicos do NSO causa respostas cardiovasculares, se essas respostas são mediadas por liberação de vasopressina e por qual subtipo de receptor estas respostas são desencadeadas.

OBJETIVOS

O presente trabalho teve por objetivo avaliar a participação do NSO no controle cardiovascular. Para isso foram avaliados:

- 1) O efeito da microinjeção de L-glu no NSO sobre a pressão arterial em ratos anestesiados e não anestesiados;
- 2) O tipo de receptor glutamatérgico envolvido na resposta pressora à microinjeção de L-glu no NSO;
- 3) Os mecanismos periféricos envolvidos na efetuação das respostas cardiovasculares à estimulação química do NSO pelo L-glu.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos de peso corporal variando entre 250 e 280g. Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central do Campus da USP de Ribeirão Preto e foram mantidos em caixas individuais, com acesso livre a ração granulada e água, e submetidos à alternância de luz (12 h claro/12 h escuro). O Comitê de Ética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo aprovou as condições de manutenção dos animais e os protocolos experimentais.

2. Técnica de implante de cânula guia no NSO

Os animais foram anestesiados com tribromoetanol (Aldrich Chemical Co. Inc.) na dose de 250 mg/Kg por via intraperitoneal. Após a tricotomia, a cabeça do rato foi imobilizada em um estereotáxico (Stoelting, EUA), e foi realizada assepsia do campo cirúrgico com álcool a 70%. Para redução do sangramento durante a cirurgia, foi injetado 0,3 mL de solução de lidocaína com vasoconstritor (3% de levoarterenol, Harvey Química Farmacêutica Ind. e Comércio Ltda, Catanduva, SP). A calota craniana foi exposta por meio de uma incisão na pele de aproximadamente 1,5 cm, afastando-se completamente o periósteo. A limpeza da região foi feita utilizando-se solução salina e água oxigenada a 10%. Todas as coordenadas tiveram como referência os parâmetros obtidos do Atlas de Paxinos e Watson (1986), ajustados ao peso corporal do animal (BORGES,1999). O bregma foi utilizado como ponto de referência para a coordenada lateral.

NSO unilateral

Antero-posterior: +6,9 mm em relação a interaural;

Lateral: + 1,7 mm a partir do bregma;

Vertical: -8,1 mm em relação ao osso;

Incisivo = 3,2.

Após o posicionamento da cânula de aço inoxidável, foi feito um orifício no crânio do animal utilizando-se uma broca odontológica, por onde foi introduzida a cânula constituída por um segmento de agulha hipodérmica (26 x 0,6 mm, 23G), com 15 mm de comprimento. A cânula foi fixada ao crânio com uma resina acrílica autopolimerisável (Simplex, DFL, Ind. Com., Rio de Janeiro, RJ) e pequenos parafusos foram previamente implantados na calota craniana. Um mandril, com 0,2 mm de diâmetro externo foi introduzido na cânula, evitando a obstrução da mesma durante o período de recuperação do animal. Como medida profilática, ao final da cirurgia o animal recebeu 0,2 mL de pentabiótico veterinário (Fontoura-Wyeth, São Paulo, Brasil) por via intramuscular.

3. Registro da pressão arterial e freqüência cardíaca de ratos não anestesiados

Quarenta e oito horas após a implantação das cânulas guias no NSO, os animais foram anestesiados novamente com tribomoetanol (Aldrich Chemical Co. Inc.) na dose de 250 mg/Kg por via intraperitoneal e foram implantados cateteres nas artérias femorais. Estes vasos foram dissecados e cateteres de polietileno foram introduzidos até a artéria aorta abdominal inferior. Os

cateteres são constituídos por segmentos de polietileno PE-10 (4-5 cm) soldados a segmentos de polietileno PE-50 (12-13 cm), previamente preenchidos por solução salina e anticoagulante (15 U/mL de heparina em solução salina), e obstruídos com pino de metal.

Após implantação dos cateteres, os mesmos foram exteriorizados na região dorsal do animal através de um trocáter e fixados à pele por sutura cirúrgica.

O cateter arterial foi utilizado para registro da pressão arterial e o cateter venoso para injeção de drogas. O registro da pressão arterial foi realizado pelo menos 24 h após o procedimento cirúrgico para implantação do cateter na artéria femoral, permitindo a recuperação dos animais dos efeitos anestésicos. Os animais foram mantidos em caixas individuais durante todo o período pós-operatório e de registro da pressão arterial.

Antes do início dos registros, 0,1 mL de solução salina com heparina (15 U/mL) foi injetada no interior dos cateteres, evitando obstruções. O cateter implantado na artéria femoral foi conectado a um transdutor de pressão arterial Hewlett Packard por um segmento de polietileno PE-50. A pressão arterial e frequência cardíaca foram registradas em um polígrafo HP7754-A (Hewlett Packard, EUA) conectado a um sistema de aquisição de dados computadorizado (Biopac, EUA).

Os registros foram iniciados após um período de 15 minutos para adaptação dos animais às condições de som e iluminação do laboratório.

4. Microinjeção de drogas no NSO

O L-glu foi dissolvido em líquido cefalorraquidiano artificial (LCA) e foi injetado diretamente no NSO no volume de 100nL, utilizando-se uma seringa de 1 µl (7001KH - Hamilton, EUA) conectada a um tubo de polietileno (PE-10) e uma agulha injetora (0,25 mm de diâmetro externo), 1 mm mais longa do que a cânula guia fixada ao crânio.

5. Drogas utilizadas

- L-glutamato (SIGMA, EUA)
- LY 235959 (TOCRIS, EUA)
- NBQX (1, 2, 3,4-tetrahydro-6-nitro-2,3-dioxo-benzo(f)quinoxaline-7-sulfonamide) (TOCRIS, EUA).
- Pentolínio, bloqueador ganglionar (Sigma, EUA)
- dTir(CH₂)₅(Me)AVP, antagonista dos receptores vasopressinérgicos (fornecido pelo Dr Maurice Manning, Medical College, Ohio, EUA)
- Veículo – líquido cefalorraquidiano artificial (LCA) (NaCl 100mM; Na₃PO₄ 2mM; KCl 2,5mM; MgCl₂ 1,0mM; NaHCO₃ 27mM; CaCl₂ 2,5mM; pH=7,4).
- Tribomoetanol (SIGMA, EUA)
- Uretana (SIGMA, EUA)

6. Determinação anatômica do sítio de injeção da droga

Ao final de cada experimento, os animais foram anestesiados com uretana na dose de 1,2 g/kg intraperitoneal, antes do início da perfusão. Foi injetado o corante azul de Evan a 1% no local da microinjeção da droga. Em seguida, os ratos foram submetidos à abertura da caixa torácica para exposição do coração. Para facilitar a perfusão cerebral, a aorta descendente foi bloqueada com uma pinça hemostática. Uma incisão foi feita na aurícula direita para o escoamento do sangue e do perfusado, e uma agulha para perfusão foi introduzida no ventrículo esquerdo. A perfusão foi realizada inicialmente com 20 mL de solução fisiológica de NaCl 0,9%, seguida por 20 mL de solução tamponada de formalina 10%.

Posteriormente, os cérebros foram retirados da caixa craniana, sendo pós-fixados em solução de perfusão. Os cérebros foram seccionados com o auxílio de um criostato. Foram feitas várias secções da área do NSO, coradas com cresil violeta e analisadas utilizando-se o Atlas de Paxinos e Watson (1986) como referência.

7. Análise estatística

Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). Quando indicada, a análise estatística dos dados foi realizada através do programa PRISM 2,01 (GraphPad, EUA). Foram utilizados os seguintes testes:

- 1) Teste t de Student pareado e não pareado assumindo-se $p < 0,05$;
- 2) Regressão não-linear para construção da curva dose-resposta, assumindo-se $p < 0,05$.

PROCOLOS EXPERIMENTAIS

O experimento foi realizado 24 h após a colocação do cateter na artéria femoral. Os animais foram mantidos em caixas individuais na sala de experimentação por 15 minutos antes do experimento. Os experimentos foram realizados com os animais em livre movimentação, e a microinjeção foi realizada após estabilização da pressão arterial.

1. Efeito da administração de diferentes concentrações de L-glu no NSO de ratos não anestesiados sobre a pressão arterial (curva concentração-resposta)

Este experimento teve por objetivo verificar as alterações cardiovasculares causadas pela microinjeção de diferentes concentrações de L-glu no NSO e determinar a concentração que promove 50% do efeito (CE_{50}) para ser utilizada nos experimentos subseqüentes. Para tanto, o L-glu foi injetado no NSO nas concentrações de 0,01M, 0,03M, 0,1M e 0,5M. Os animais receberam de uma a quatro concentrações de L-glu, mantendo-se o intervalo de 15 min entre cada injeção já que não existe o fenômeno de taquifilaxia. As diferentes concentrações foram injetadas em seqüência aleatória.

2. Efeito de sucessivas microinjeções de L-glu no NSO de ratos não anestesiados

Este experimento teve por objetivo comprovar a inexistência de taquifilaxia na resposta a microinjeção de L-glu no NSO. Desta forma, os animais receberam a microinjeção de L-glu 15 min após a primeira injeção.

3. Alterações cardiovasculares causadas pela microinjeção L-glu no NSO de ratos não anestesiados ou anestesiados por uretana

Este experimento teve por objetivo verificar o efeito da anestesia por uretana sobre o padrão da resposta desencadeada pela injeção de L-glu no NSO. Desta forma, os animais foram anestesiados com uretana (1,2g/kg) e, uma hora depois receberam a microinjeção de L-glu 0,1M.

4. Pré-tratamento local com LY

Este experimento teve por objetivo verificar o possível envolvimento de receptores glutamatérgicos NMDA na resposta pressora a microinjeção de L-glu no NSO. Foi feita microinjeção de L-glu (0,1M) no NSO 15 min antes e 15 min após a microinjeção de antagonista glutamatérgico do tipo NMDA (LY 0,02M).

5. Pré-tratamento local com NBQX

Este experimento teve por objetivo verificar o possível envolvimento de receptores glutamatérgicos não-NMDA na resposta pressora a microinjeção de L-glu no NSO. Foi feita microinjeção de L-glu (0,1M) no NSO 15 min antes e 15 min após a microinjeção de antagonista glutamatérgico do tipo não-NMDA (NBQX 0,02M).

6. Pré-tratamento com Pentolínio

Este experimento teve por objetivo verificar se a resposta pressora à microinjeção de L-glu no NSO era mediada pela ativação do sistema nervoso simpático. Foi feita microinjeção de L-glu (0,1M) no NSO 15 min antes e 15 após a administração do bloqueador ganglionar pentolínio i.v.

7. Pré-tratamento com dTir(CH₂)₅(Me)AVP

Neste experimento estudamos o possível envolvimento do mecanismo vasopressinérgico na mediação da resposta pressora a microinjeção de L-glu. Foi feita a microinjeção de L-glu (0,1M) no NSO 15 min antes e 15 minutos após a administração do bloqueador de vasopressina, dTir(CH₂)₅(Me)AVP 50µg/Kg i.v.

RESULTADOS

1. Efeito da microinjeção de L-glu no NSO de ratos não anestesiados sobre a pressão arterial e frequência cardíaca

A microinjeção de Líquido cefalorraquidiano artificial LCA (100nL) no NSO não causou alterações na pressão arterial basal e frequência cardíaca (ANTES: PAM=96±5 mmHg; FC=316±17 bpm; APÓS: PAM=97±6 mmHg; FC=291±28 bpm, n=6).

A microinjeção de diferentes concentrações de L-glu (0,01; 0,03; 0,1 e 0,5M) no NSO de ratos normotensos causou respostas pressoras e bradicárdicas concentração-dependentes (FIGURA 1 e TABELA 1). A análise de regressão não-linear indicou uma correlação significativa entre concentração e resposta pressora ($R^2 = 0,93$; $p < 0,05$) ou bradicárdica ($R^2 = 0,81$; $p < 0,05$). A concentração de L-glu de 0,1M, próxima CE_{50} , foi utilizada nos experimentos subsequentes.

A microinjeção de L-glu (0,1M) no NSO de ratos normotensos (PAM=101±4 mmHg, FC=353±10 bpm, n=6) causou respostas pressoras significativas (Δ PAM= 20±1 mmHg) que foram acompanhadas por redução na frequência cardíaca (Δ FC= -50±5 bpm). Por outro lado, a microinjeção de LCA (100nL) no NSO não causou alterações significativas na pressão arterial (Δ PAM= 2±0,8 mmHg) e frequência cardíaca (Δ FC= -2±9 bpm) (FIGURA 2). A latência para o início e duração da resposta com a concentração de 0,1M foram respectivamente 16±3 s e 7±0,2 min.

A figura 3 apresenta um traçado da pressão arterial pulsátil, média e frequência cardíaca de um animal representativo do grupo, que recebeu

microinjeção de L-glu (0,1M). Na figura 4 é apresentada a fotomicrografia de um corte de cérebro de rato mostrando o sítio de injeção de L-glu no NSO.

A administração de L-glu (0,1M) em áreas adjacentes ao NSO causou respostas pressoras e bradicárdicas significativamente menores ($\Delta PAM=1\pm 1$ mmHg, $\Delta FC=0,3\pm 4$ bpm, $n=7$) quando comparadas às respostas do L-glutamato microinjetado no NSO ($\Delta PAM =20\pm 1^*$ mmHg, $\Delta FC=-50\pm 5^*$ bpm, $n=6$, $*p<0,05$, $t= 11,5$ para valores de pressão arterial; $*p<0,05$, $t = 7,24$ para valores de frequência cardíaca, teste t de Student não-pareado, bi-caudal).

Tabela 1 – Variações na pressão arterial média (Δ PAM) e frequência cardíaca (Δ FC), em resposta a microinjeção de diferentes concentrações de L-glu no NSO de ratos não-anestesiados.

L-glutamato (M/100nL)	Δ PAM \pm EPM (mmHg)	Δ FC \pm EPM (bpm)	N (amostra)
LCA	2 \pm 0,7	-2 \pm 0.8	6
0,01	3 \pm 0,7	-9 \pm 2	6
0,03	5 \pm 1	-16 \pm 3	6
0,1	20 \pm 1	-50 \pm 5	6
0,5	29 \pm 2	-51 \pm 5	6

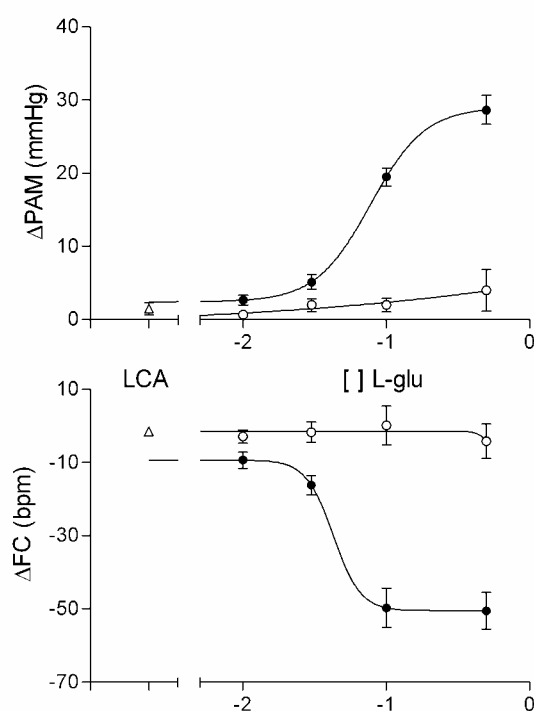
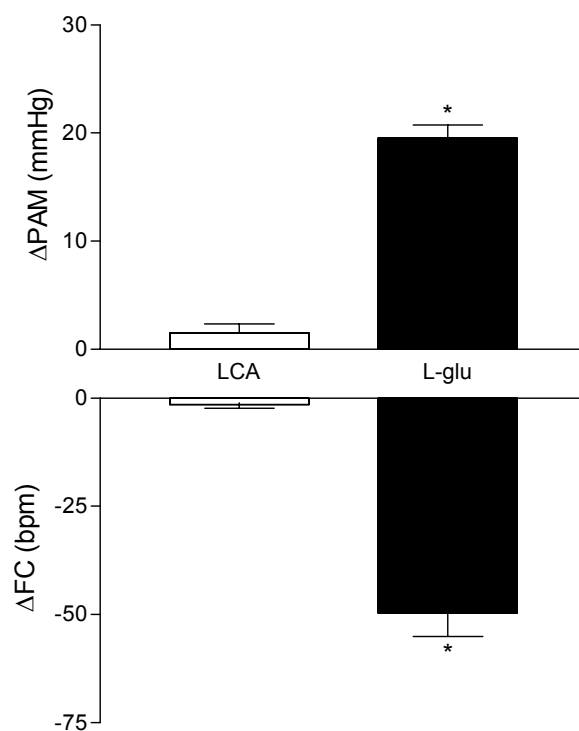


FIGURA 1 – Efeito da microinjeção de diferentes concentrações de L-glutamato (L-glu) (círculos fechados) ou líquido cefalorraquidiano artificial (LCA) (triângulo aberto) no NSO ou fora do NSO (círculos abertos) de ratos não anestesiados, sobre a pressão arterial média (Δ PAM) e a frequência cardíaca (Δ FC). As concentrações injetadas foram: 0,01; 0,03; 0,1; 0,5M (n=6 para cada concentração).

A)



B)

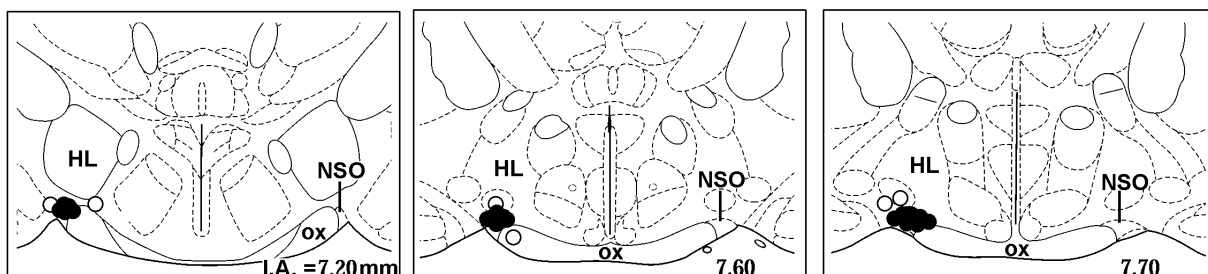


FIGURA 2 – A) Variações na pressão arterial média (ΔPAM ,) e frequência cardíaca (ΔFC) após microinjeção de líquido cefalorraquidiano artificial LCA (coluna aberta, n=6) ou L-glutamato (L-glu) na concentração de 0,1M (coluna fechada, n=6) no NSO de ratos não anestesiados. * $p < 0,05$, teste t de Student não-pareado, bicaudal. B) Representação diagramática dos sítios de injeção de L-glu no NSO (círculos fechados) e fora do NSO (círculos abertos), modificada do Atlas de Paxinos e Watson (1986). HL – hipotálamo lateral; ox – quiasma óptico; IA – interaural.

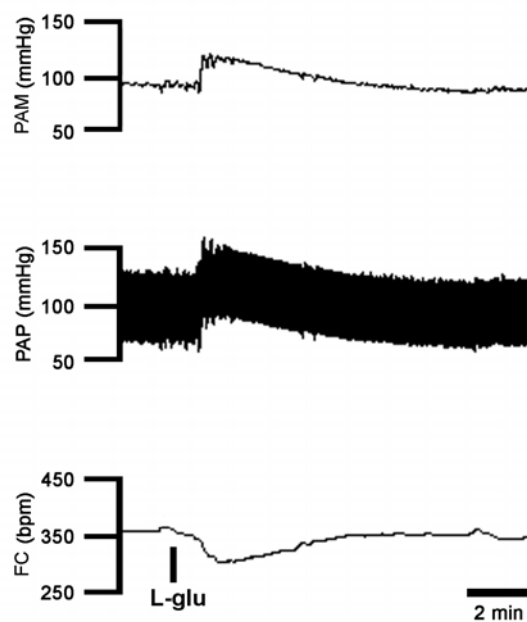


FIGURA 3 – Registros de pressão arterial média (PAM), pressão arterial pulsátil (PAP) e frequência cardíaca (FC) de um rato representativo do grupo, mostrando o efeito da microinjeção de L-glutamato (L-glu, 0,1M) no NSO.

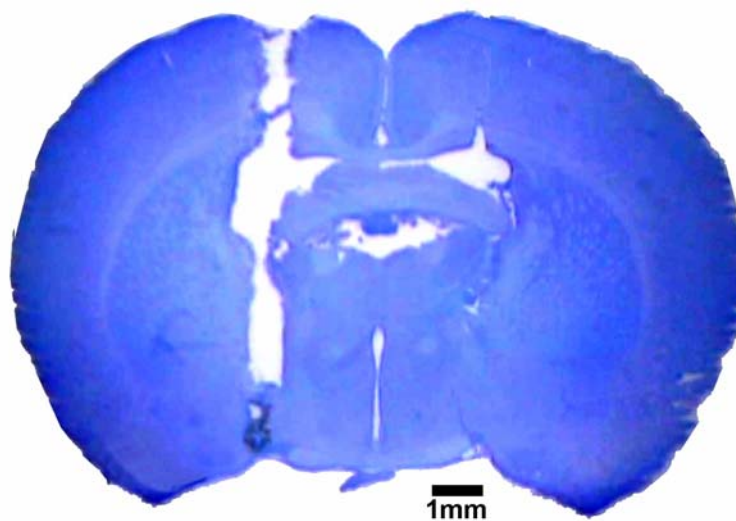


FIGURA 4 – Fotomicrografia de corte histológico do cérebro de um rato representando o sítio de injeção de L- glutamato no NSO.

2. Efeito de microinjeções sucessivas de L-glu no NSO de ratos não anestesiados

Foi relatado que microinjeções sucessivas de L-glu no hipotálamo lateral apresentavam taquifilaxia, ou seja, as respostas subseqüentes eram reduzidas (PAJOLLA, 2004). Para verifica possível ocorrência de taquifilaxia à injeção de L-glu no NSO, a injeção de L-glu foi repetida 30 min após a primeira injeção. A primeira microinjeção causou uma resposta de $\Delta PAM=20\pm 1$ mmHg; $\Delta FC=-38\pm 5$ bpm n=6 e a segunda resposta foi de $\Delta PAM=21\pm 1$ mmHg; $\Delta FC=-46\pm 7$ bpm, não havendo diferença estatística e descartando a possibilidade de taquifilaxia (FIGURA 5).

A figura 6 apresenta um traçado da pressão arterial pulsátil, média e frequência cardíaca de um animal representativo do grupo.

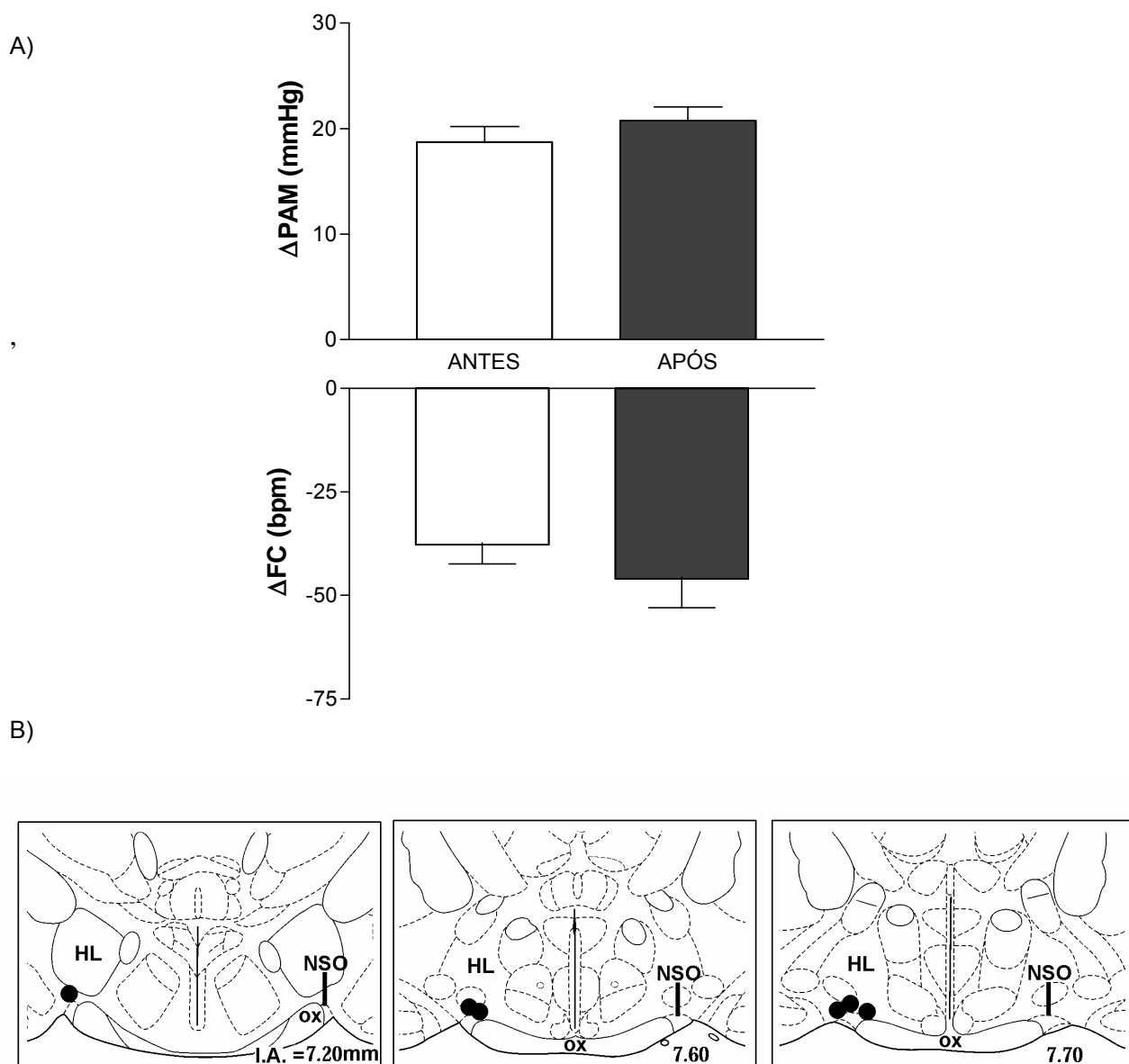


FIGURA 5 – A) Variações na pressão arterial média (Δ PAM) e frequência cardíaca (Δ FC) causadas pela microinjeção de L-glutamato (L-glu) antes (colunas abertas) e após (colunas fechadas) a microinjeção de líquido cefalorraquidiano artificial (LCA) no NSO de ratos não anestesiados, mostrando a não ocorrência de taquifilaxia. B) Representação diagramática dos sítios de injeção no NSO (círculos fechados), modificada do Atlas de Paxinos e Watson (1986). HL – hipotálamo lateral; ox – quiasma óptico; IA – interaural.

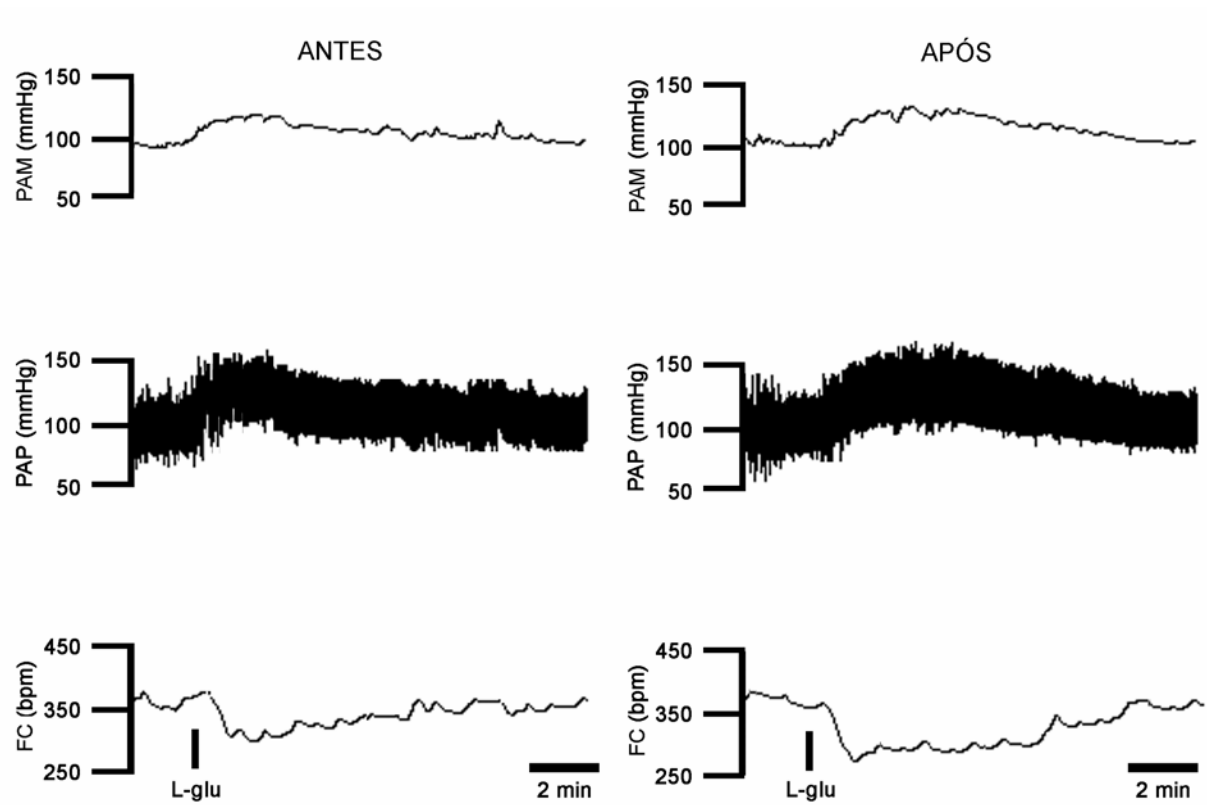


FIGURA 6 – Registros de pressão arterial média (PAM), pressão arterial pulsátil (PAP) e frequência cardíaca (FC) de um rato representativo do grupo, mostrando o efeito da microinjeção de L-glutamato (L-glu, 0,1M) no NSO antes e após a microinjeção de LCA.

3. Efeito da anestesia por uretana sobre a resposta pressora a microinjeção de L-glu no NSO

A anestesia com uretana reduziu de forma significativa a resposta pressora e bradicárdica ($\Delta\text{PAM}=5\pm 2$ mmHg; $\Delta\text{FC}=-6\pm 4$ bpm, $n=5$) à microinjeção de L-glu quando comparada à resposta pressora e bradicárdica controle ($\Delta\text{PAM}=20\pm 1^*$ mmHg; $\Delta\text{FC}=-50\pm 5^*$ bpm, $n=6$) ($*p<0,05$, $t= 6,6$ para valores de pressão arterial; $*p<0,05$, $t = 6,5$ para valores de frequência cardíaca, teste **t** de Student não-pareado, bi-caudal).

A figura 7 mostra a variação na pressão arterial média e na frequência cardíaca a microinjeção de L-glu no NSO ratos não anestesiados e anestesiados por uretana. A figura 8 apresenta um traçado da pressão arterial pulsátil, média e frequência cardíaca de um animal representativo do grupo.

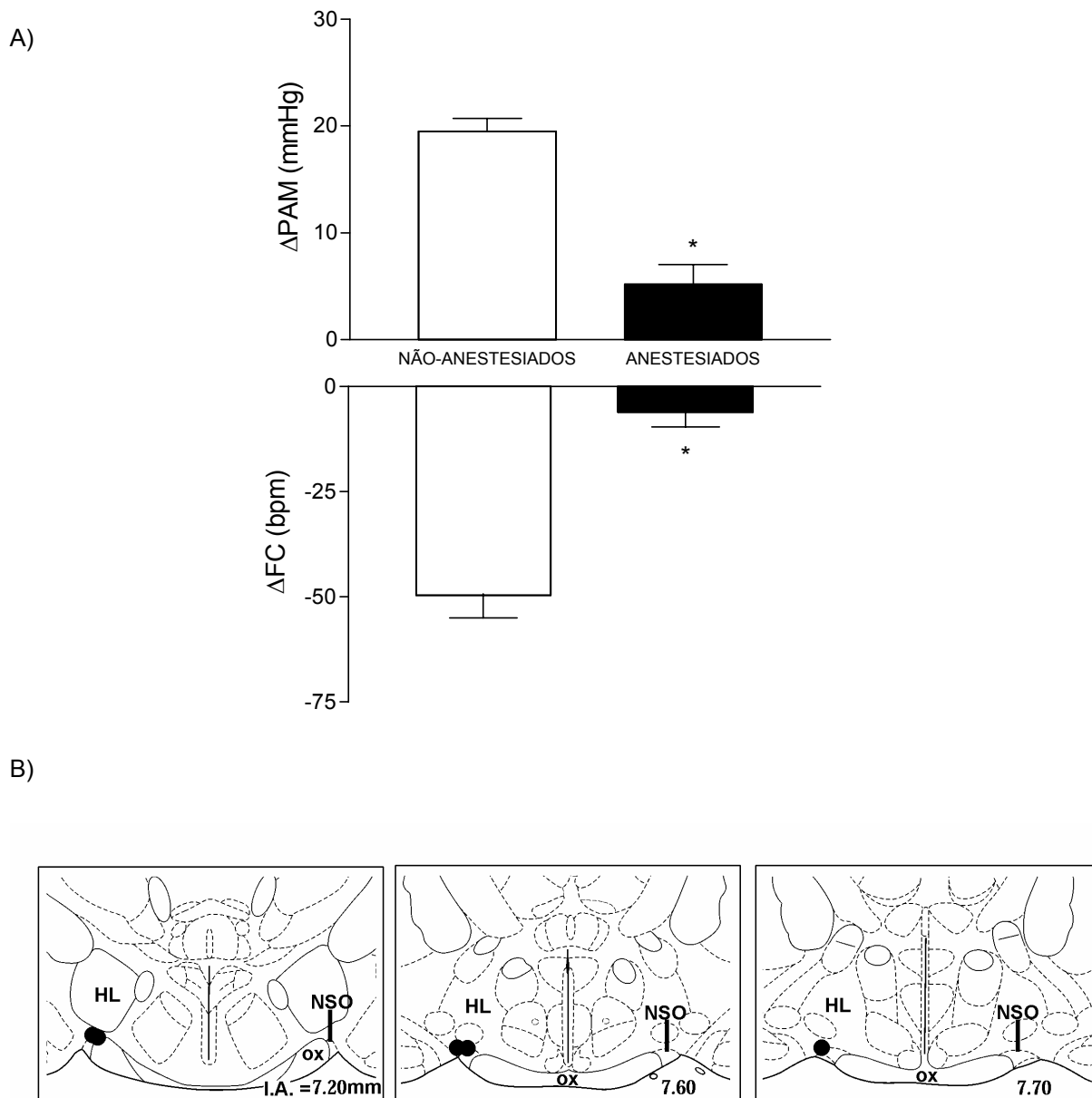


Figura 7 – A) Variações na pressão arterial média (ΔPAM) e freqüência cardíaca (ΔFC) após microinjeção de L-glutamato (L-glu) na concentração de 0,1M no NSO de ratos não anestesiados (coluna aberta, n=6) ou anestesiados por uretana (coluna fechada, n=5). * $p < 0,05$, teste t de Student não-pareado, bicaudal. B) Representação diagramática dos sítios de injeção no NSO (círculos fechados), modificada do Atlas de Paxinos e Watson (1986). HL – hipotálamo lateral; ox – quiasma óptico; IA – interaural.

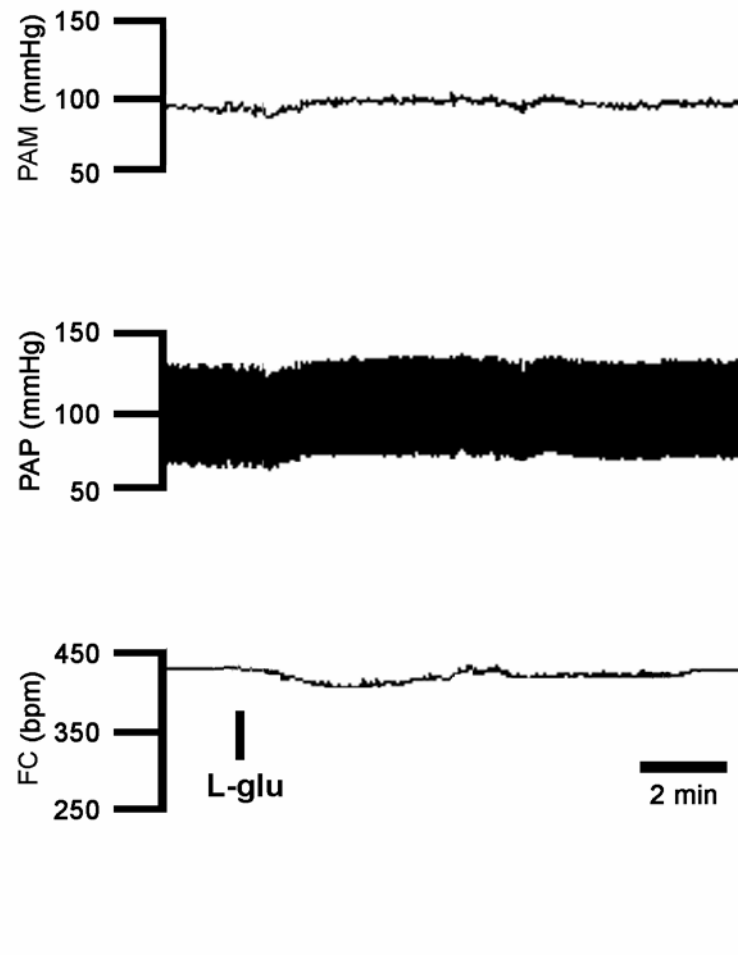


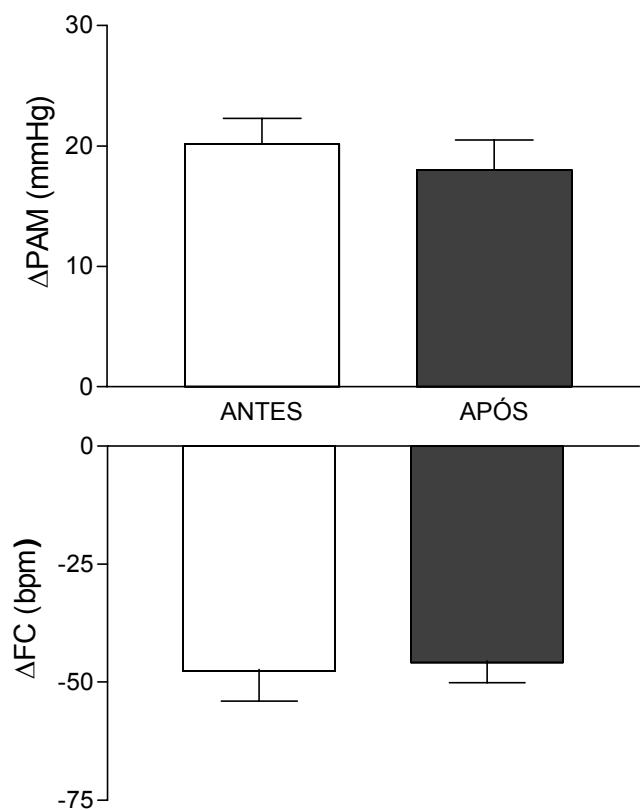
FIGURA 8 – Registros de pressão arterial média (PAM), pressão arterial pulsátil (PAP) e frequência cardíaca (FC) de um rato anestesiado representativo do grupo, mostrando o efeito da microinjeção de L-glutamato (L-glu, 0,1M) no NSO.

4. Efeito do pré-tratamento local com LY235959 sobre a resposta pressora a microinjeção de L-glu no NSO de ratos não anestesiados

A administração de 0,02M de LY235959 (um antagonista seletivo dos receptores glutamatérgicos NMDA) no NSO não alterou a pressão arterial e a frequência cardíaca basais (ANTES: PAM=97±4 mmHg; FC=357±18 bpm; APÓS: PAM=99±5 mmHg; FC=345±26 bpm, n=6). A resposta pressora e bradicárdica a microinjeção de L-glu no NSO (Δ PAM=20±2 mmHg; Δ FC=-48±6 bpm) também não foi alterada pelo pré-tratamento com LY (Δ PAM=18±3 mmHg; Δ FC=-46±4 bpm) (FIGURA 9). A concentração de antagonista utilizada foi baseada em estudo anterior de nosso laboratório, em que se estudou o efeito do pré-tratamento com LY235959 sobre a resposta cardiovascular à microinjeção de L-glu no hipotálamo lateral (PAJOLLA, PELOSI & CORRÊA, 2005).

A figura 10 apresenta um registro da pressão arterial pulsátil, média e frequência cardíaca de um animal representativo do grupo.

A)



B)

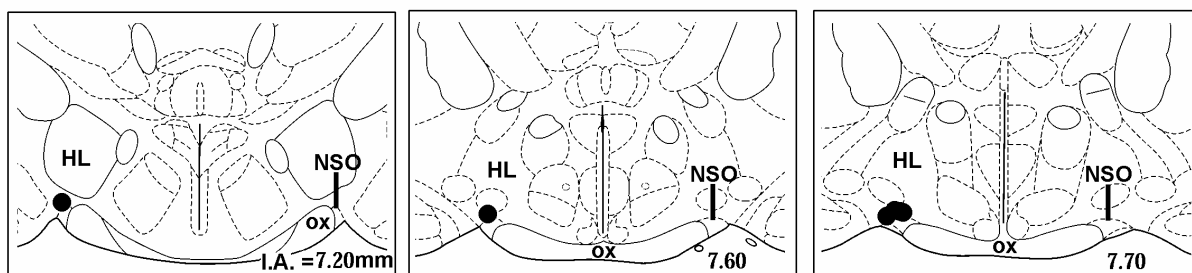


FIGURA 9 – Variações na pressão arterial média (ΔPAM) e frequência cardíaca (ΔFC) causadas pela microinjeção de L-glutamato (L-glu) antes (colunas abertas) e após (colunas fechadas) a microinjeção de LY235959 (LY) no NSO de ratos não anestesiados. B) Representação diagramática dos sítios de injeção no NSO (círculos fechados), modificada do Atlas de Paxinos e Watson (1986). HL – hipotálamo lateral; ox – quiasma óptico; IA – interaural.

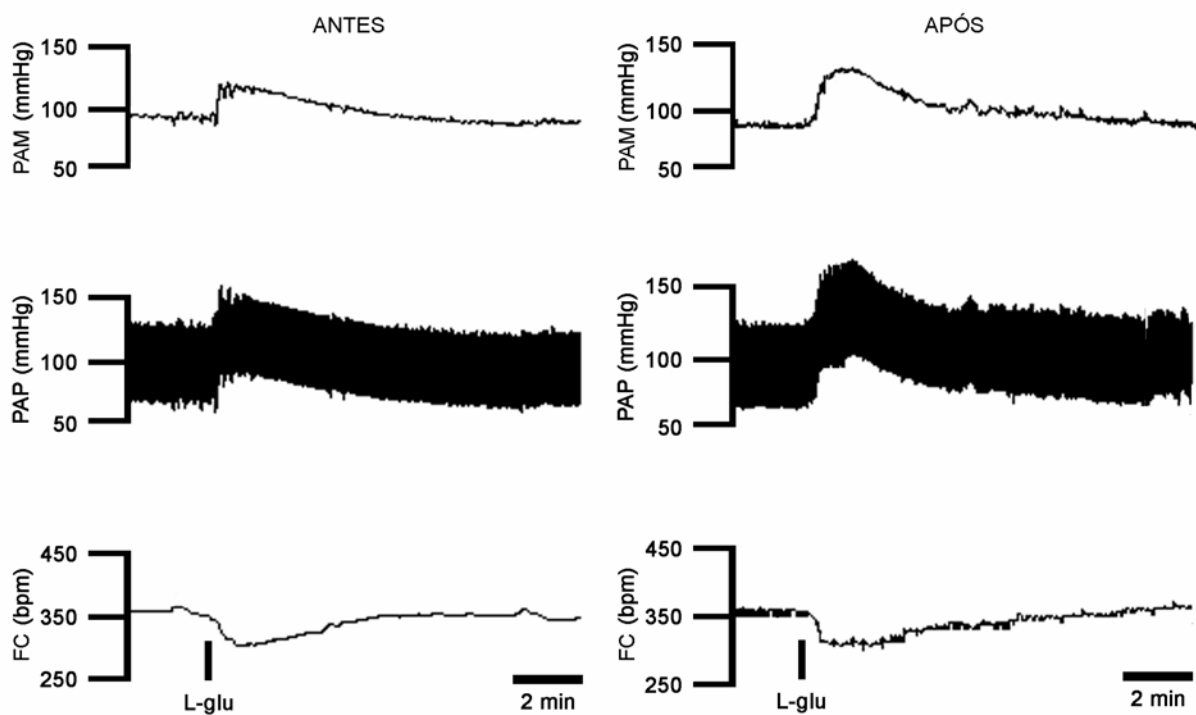


FIGURA 10 – Registros de pressão arterial média (PAM), pressão arterial pulsátil (PAP) e frequência cardíaca (FC) de um rato representativo do grupo, mostrando o efeito da microinjeção de L-glutamato (L-glu, 0,1M) no NSO antes e após a microinjeção de LY235959 no NSO.

5. Efeito do pré-tratamento local com NBQX sobre a resposta pressora a microinjeção de L-glu no NSO de ratos não anestesiados

A administração de 0,02M de NBQX (um antagonista seletivo dos receptores glutamatérgicos não-NMDA) no NSO não alterou a pressão arterial e frequência cardíaca basais (ANTES: PAM=93±6 mmHg; FC=336±4 bpm; APÓS: PAM=96±3 mmHg; FC=357±17 bpm, n=6), mas bloqueou a resposta pressora e bradicárdica a microinjeção de 0,1M L-glu (Δ PAM=3±0,5 mmHg; Δ FC=-5±5 bpm) quando comparada com a resposta pressora e bradicárdica controle (Δ PAM=20±2* mmHg; Δ FC=-46±6* bpm, *p<0,05, t= 8,3 para valores de pressão arterial; *p<0,05, t = 7,0 para valores de frequência cardíaca, teste t de Student pareado, bi-caudal), conforme representado pela figura 11. A concentração de antagonista utilizada foi baseada em estudo anterior de nosso laboratório, em que se estudou o efeito do pré-tratamento com NBQX sobre a resposta cardiovascular à microinjeção de L-glu no hipotálamo lateral (PAJOLLA, PELOSI & CORRÊA, 2005).

A figura 12 apresenta registros da pressão arterial pulsátil, média e frequência cardíaca de um animal representativo do grupo.

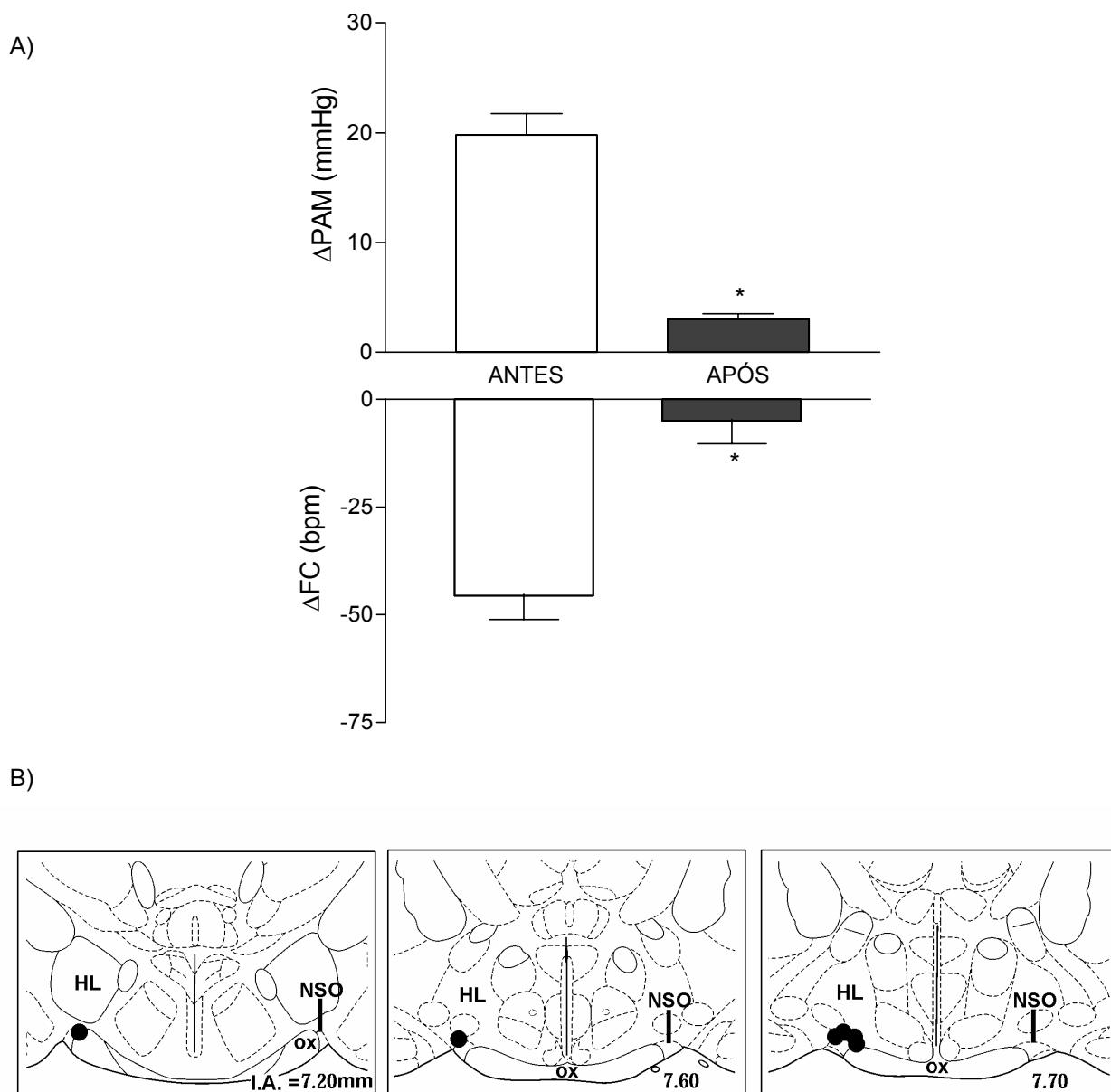


FIGURA 11 – A) Variações na pressão arterial média (Δ PAM) e frequência cardíaca (Δ FC) causadas pela microinjeção de L-glutamato (L-glu) antes (colunas abertas) e após (colunas fechadas) a microinjeção de (NBQX) no NSO de ratos não anestesiados. * $p < 0,05$, teste t de Student pareado, bicaudal. B) Representação diagramática dos sítios de injeção no NSO (círculos fechados), modificada do Atlas de Paxinos e Watson (1986). HL – hipotálamo lateral; ox – quiasma óptico; IA – interaural.

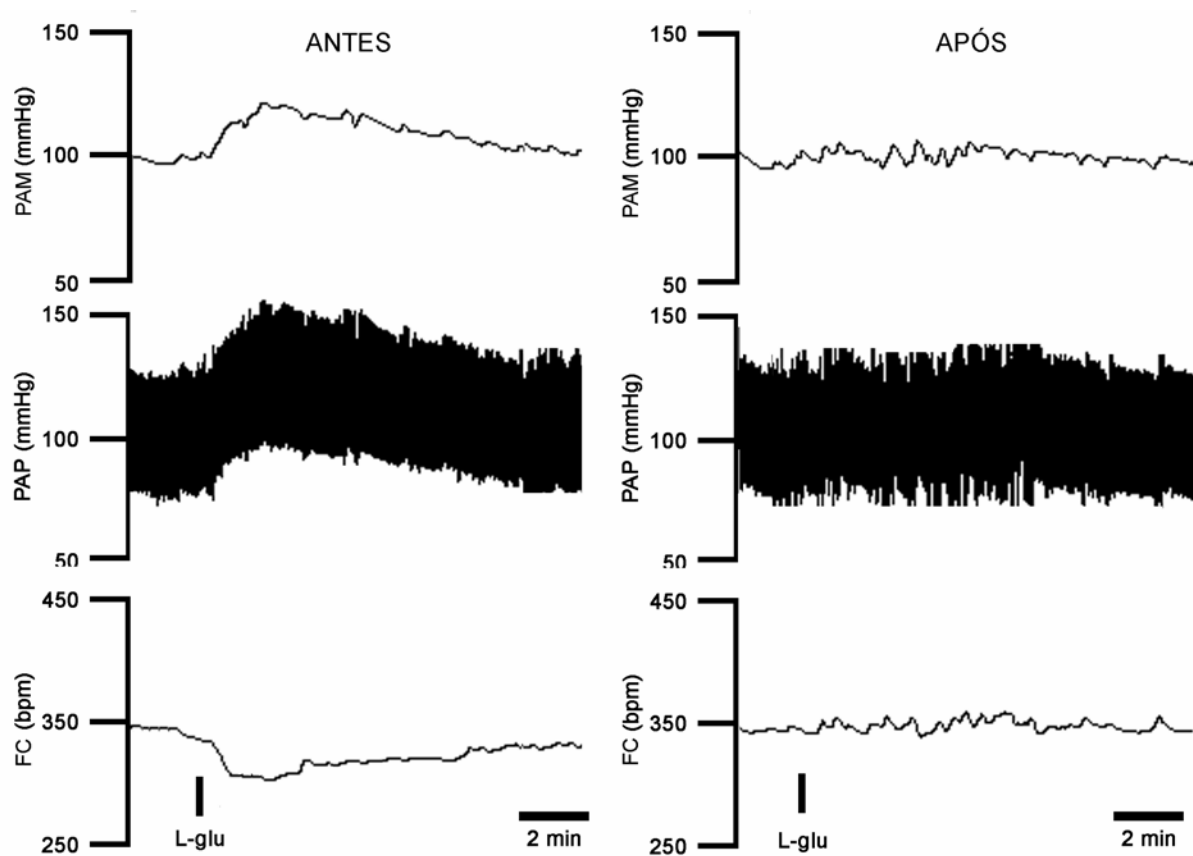


FIGURA 12 – Registros de pressão arterial média (PAM), pressão arterial pulsátil (PAP) e frequência cardíaca (FC) de um rato representativo do grupo, mostrando o efeito da microinjeção de L-glutamato (L-glu, 0,1M) no NSO antes e após a microinjeção de NBQX no NSO.

6. Efeito do pré-tratamento com pentolínio sobre a resposta pressora à microinjeção de L-glu no NSO de ratos não anestesiados.

O pré-tratamento i.v. com pentolínio (bloqueador ganglionar) 5 mg/Kg causou uma redução na pressão arterial basal (ANTES: PAM=94±5* mmHg; APÓS: PAM=66±2* mmHg, n=4, *p<0,05, t= 8,6 para valores de pressão arterial, teste t de Student pareado, bi-caudal) (fig 13), mas não alterou a linha de base da freqüência cardíaca (ANTES: FC=363±12 bpm; APÓS: FC=372±5 bpm) (fig 14). A injeção intravenosa de 50mg/kg pentolínio (bloqueador ganglionar) potencializou a resposta pressora a microinjeção de L-glu no NSO (ANTES: ΔPAM=16±2 mmHg; APÓS: ΔPAM=38±5* mmHg, *p<0,05, t= 5,3 para valores de pressão arterial, teste t de Student pareado, bi-caudal). e bloqueou a bradicardia em resposta ao L-glu no NSO (ANTES: ΔFC=-43±8 bpm; APÓS: ΔFC=-5±3* bpm, *p<0,05, t = 4,5 para valores de freqüência cardíaca, teste t de Student pareado, bi-caudal), conforme representado na figura 15.

A figura 16 apresenta registros da pressão arterial pulsátil, média e freqüência cardíaca de um animal representativo do grupo.

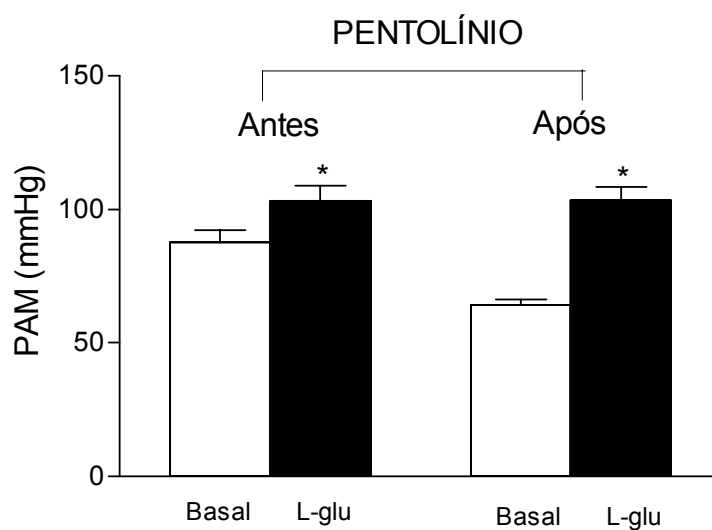


FIGURA 13 - Pressão arterial média (PAM) antes (colunas abertas) e após a microinjeção de L-glutamato (L-glu, colunas fechadas), registradas antes e após o pré-tratamento com o bloqueador ganglionar pentolínio (5mg/Kg i.v.), em ratos não anestesiados. * $p < 0,05$, teste t de Student pareado, bicaudal.

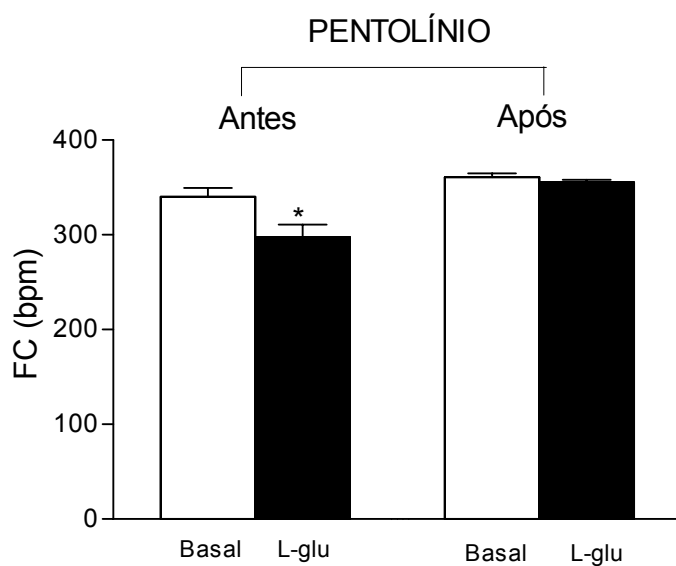
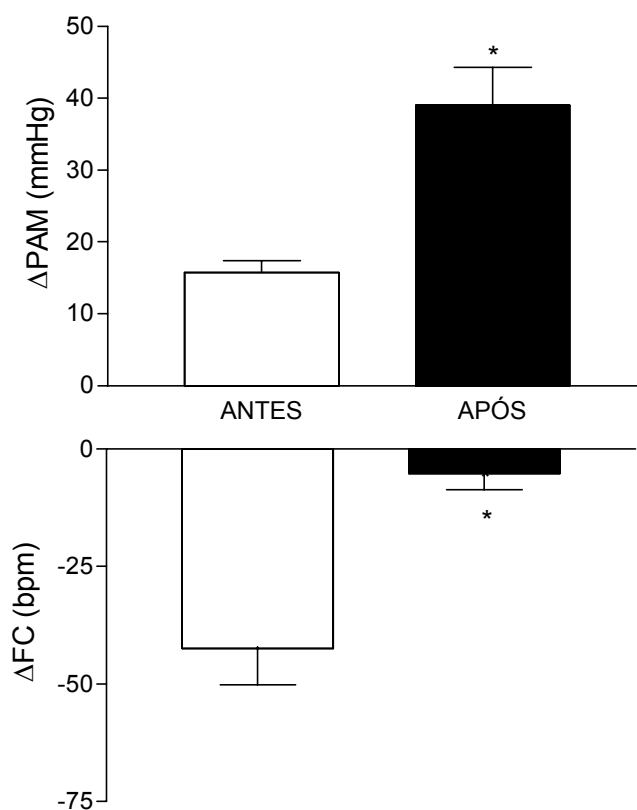


FIGURA 14 – Frequência cardíaca (FC) antes (colunas abertas) e após a microinjeção de L-glutamato (L-glu, colunas fechadas), registradas antes e após o pré-tratamento com o bloqueador ganglionar pentolínio (5mg/Kg i.v.), em ratos não anestesiados. * $p < 0,05$, teste t de Student pareado, bicaudal.

A)



B)

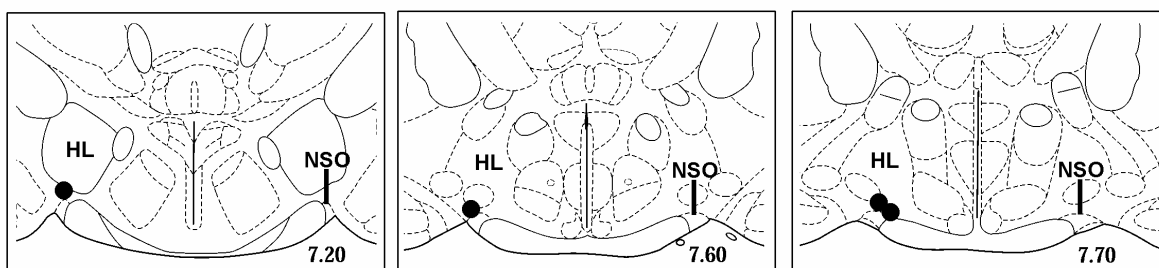


FIGURA 15 – A) Variações na pressão arterial média (Δ PAM) e frequência cardíaca (Δ FC) causadas pela microinjeção de L-glutamato (L-glu) antes (colunas abertas) e após (colunas fechadas) a injeção i.v. de pentolínio de ratos não anestesiados. * $p < 0,05$, teste t de Student pareado, bicaudal. B) Representação diagramática dos sítios de injeção no NSO (círculos fechados), modificada do Atlas de Paxinos e Watson (1986). HL – hipotálamo lateral; ox – quiasma óptico; IA – interaural.

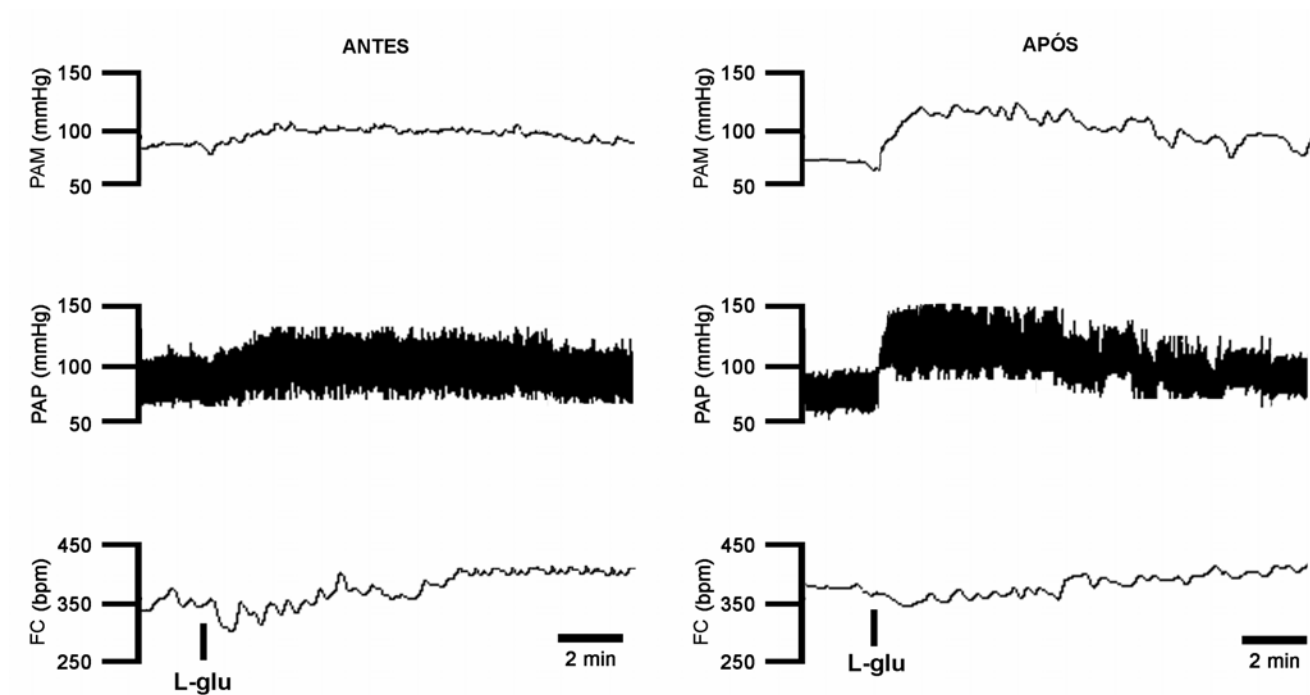


FIGURA 16 – Registros de pressão arterial média (PAM), pressão arterial pulsátil (PAP) e frequência cardíaca (FC) de um rato representativo do grupo, mostrando o efeito da microinjeção de L-glutamato (L-glu, 0,1M) no NSO antes e após a injeção i.v. de pentolínio.

7. Efeito do pré-tratamento com dTir(CH₂)₅(Me)AVP sobre a resposta pressora à microinjeção de L-glu no NSO de ratos não anestesiados.

A injeção intravenosa de 50µg/kg dTir(CH₂)₅MeAVP (um antagonista seletivo dos receptores vasopressinérgicos do tipo V₁) não causou alterações significativas na pressão arterial e na frequência cardíaca basais (ANTES: PAM=89±4 mmHg; FC=345±14 bpm; APÓS: PA=86±2 mmHg, FC=359±19 bpm n=5) mas bloqueou a resposta pressora e bradicárdica à microinjeção de L-glu (Δ PAM=2± 0,7 mmHg, Δ FC=-8±2 bpm) quando comparada com a resposta pressora e bradicárdica controle (Δ PAM=21±3* mmHg, Δ FC= -48±4* bpm, *p<0,05, t= 7,1 para valores de pressão arterial; *p<0,05, t = 8,7 para valores de frequência cardíaca, teste t de Student pareado, bi-caudal), conforme representado na figura 17.

A figura 18 apresenta registros da pressão arterial pulsátil, média e frequência cardíaca de um animal representativo do grupo.

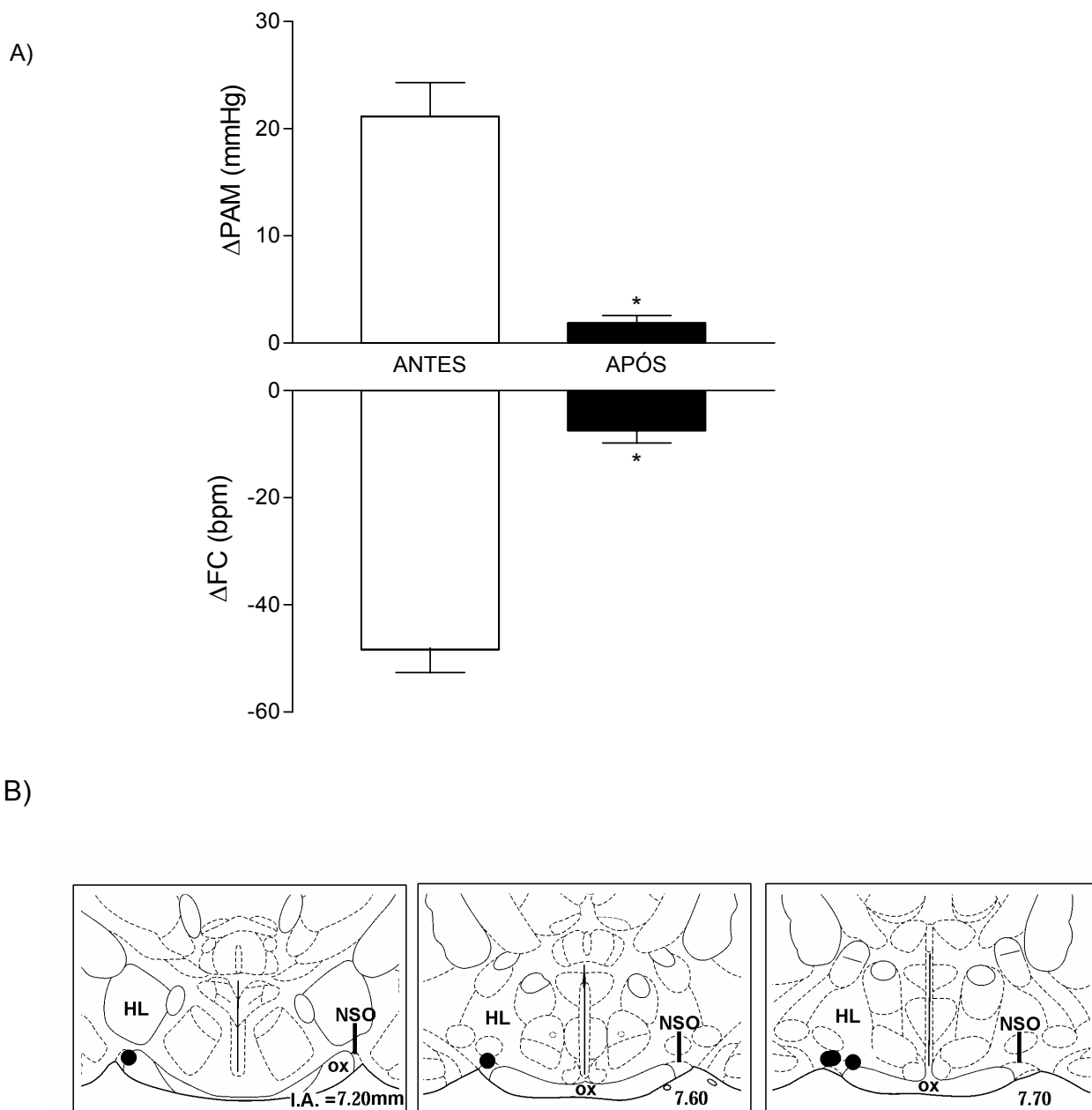


FIGURA 17 – A) Variações na pressão arterial média (ΔPAM) e frequência cardíaca (ΔFC) causadas pela microinjeção de L-glutamato (L-GLU) antes (colunas abertas) e após (colunas fechadas) a injeção i.v. de $dTyr(CH_2)_5MeAVP$ de ratos não anestesiados. * $p < 0,05$, teste t de Student pareado, bicaudal. B) Representação diagramática dos sítios de injeção no NSO (círculos fechados), modificada do Atlas de Paxinos e Watson (1986). HL – hipotálamo lateral; ox – quiasma óptico; IA – interaural.

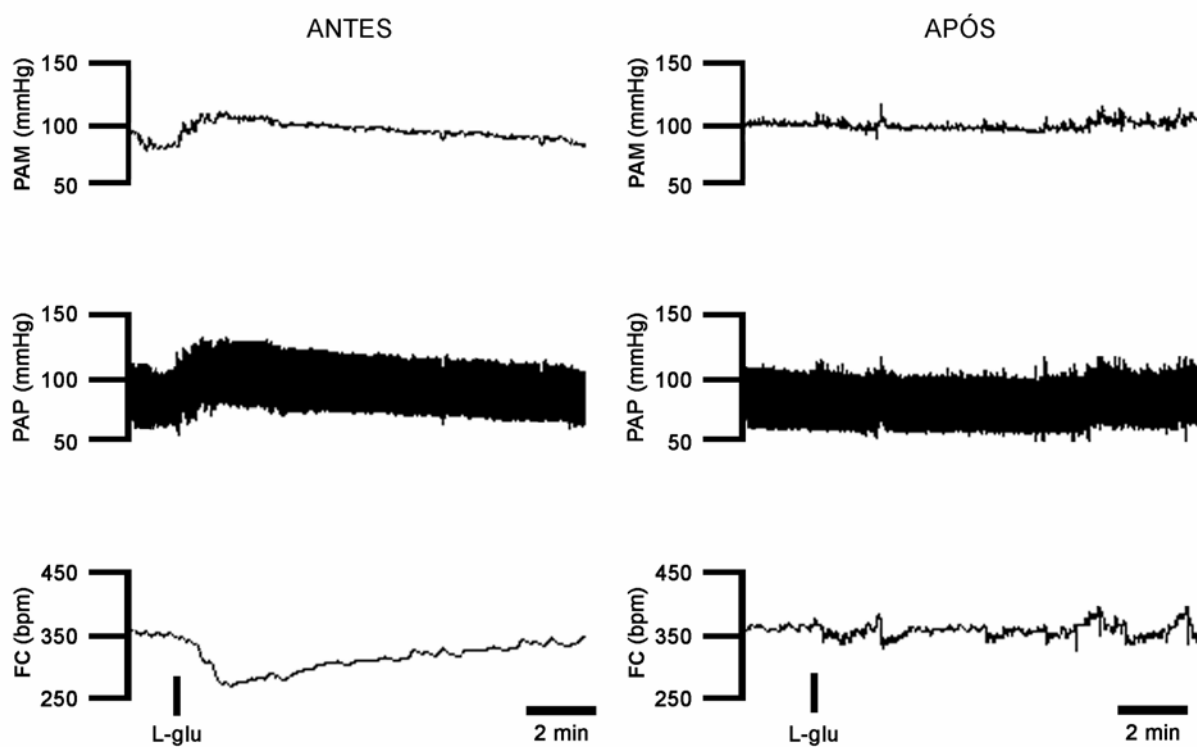


FIGURA 18 – Registros de pressão arterial média (PAM), pressão arterial pulsátil (PAP) e frequência cardíaca (FC) de um rato representativo do grupo, mostrando o efeito da microinjeção de L-glutamato (L-glu, 0,1M) no NSO antes e após a injeção i.v. de dTir(CH₂)₅MeAVP.

DISCUSSÃO

No presente estudo nós relatamos que a administração de L-glu no NSO causa respostas cardiovasculares caracterizadas por elevação da pressão arterial e queda da frequência cardíaca. As respostas ao L-glu foram dose-dependente, apresentando uma CE_{50} de aproximadamente 0,1M/100nL.

O L-glu, ao contrário da estimulação elétrica ativa somente corpos celulares, não ativando fibras de passagem (GOODCHILD *et al.*, 1982; NEIL & LOEWY, 1982). No entanto, altas concentrações de glutamato (0.5M a 1.0M) podem causar supressão da atividade neuronal devido a bloqueio por despolarização persistente (LIPSKI *et al.*, 1988). Baseado nesta observação, nós utilizamos no presente trabalho uma concentração de L-glu cinco vezes menor do que aquela utilizada por Lipski *et al.* (1988), para minimizar possíveis efeitos inespecíficos relacionados às altas doses de L-glu.

Microinjeções de L-glu em áreas circunvizinhas ao NSO não alteraram a pressão arterial ou frequência cardíaca, sugerindo que as respostas cardiovasculares por nós observadas são decorrentes de ação do L-glu no NSO.

A resposta pressora e bradicárdica à microinjeção de L-glu no NSO foi significativamente reduzida quando L-glu foi microinjetado em ratos anestesiados com uretana. O padrão das respostas cardiovasculares desencadeadas por estimulação SNC é geralmente alterado pelo uso de anestésico. Evidências prévias indicam que anestesia pode inverter respostas pressoras mediadas pelo SNC em resposta hipotensoras, tal como aquelas causadas pela microinjeção de L-glu no NPV ou no núcleo trato-solitário

(KANNAN, HAYASHIDA, YAMASHITA, 1989; YAMASHITA *et al.*, 1987; MACHADO & BONAGAMBA, 1992) ou mesmo bloqueá-las, como no caso da injeção intracerebroventricular de angiotensina II (HOFFMAN & PHILLIPS, 1976; SEVERS & DANIEL-SEVERS, 1973). A ausência de resposta à microinjeção de L-glu no NSO de animais anestesiados pode ser explicada pelo intenso aumento da concentração plasmática de vasopressina observado em ratos anestesiados com uretana. Conseqüentemente, a liberação adicional de vasopressina não causaria uma resposta significativa. Resultados semelhantes foram relatados após a injeção intracerebroventricular de noradrenalina em ratos anestesiados com uretana (CORRÊA *et al.*, 1985). A importância da vasopressina circulante para o controle da pressão arterial em ratos anestesiados com uretana foi evidenciada após observação de que administração de d(CH₂)⁵Tir(Me)AVP, um potente antagonista vasopressinérgico, reduziu a pressão arterial basal de ratos anestesiados por uretana para valores iguais àqueles observados em ratos anestesiados hipofisectomizados (CORRÊA, 1990).

Os receptores glutamatérgicos são divididos em 2 subfamílias, os receptores ionotrópicos e os metabotrópicos. Os receptores glutamatérgicos ionotrópicos são acoplados a canais iônicos, os quais permitem fluxo de Na⁺, K⁺ e algumas vezes de Ca²⁺ através da membrana pré e pós-sináptica. Estes receptores são classificados em receptores do subtipo N-metil-D-aspartato (NMDA) e receptores não-NMDA, os quais são subdivididos em receptores sensíveis ao α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propionato (AMPA) e receptores sensíveis ao cainato (KA) (HOLLMAN & HEINEMANN, 1994). Os receptores metabotrópicos (mGLURs) são acoplados a proteína G, ativando a

formação de segundos mensageiros que podem afetar outros canais iônicos ou processos intracelulares (PAK & CURRÁS-COLLAZO, 2002). Portanto os efeitos cardiovasculares da microinjeção de L-glu no NSO poderiam ser determinados por ativação de receptores glutamatérgicos NMDA, não-NMDA e/ou metabotrópicos.

Estudos imunohistoquímicos e farmacológicos mostraram que o hipotálamo é uma das áreas envolvidas na regulação cardiovascular, contendo altas concentrações de glutamato e receptores glutamatérgicos ionotrópicos (MEEKER *et al.*, 1994; SINGEWALD & PHILLIPU, 1996). Para determinar qual receptor glutamatérgico estaria envolvido na resposta pressora e bradicardica à microinjeção de L-glu no NSO, nós pré-tratamos os animais com antagonistas seletivos dos receptores glutamatérgicos NMDA e não-NMDA. A resposta pressora à microinjeção de L-glu no NSO foi bloqueada pelo pré-tratamento local com NBQX (antagonista seletivo dos receptores não-NMDA) e não foi afetada pelo pré-tratamento local com LY235959 (antagonista seletivo dos receptores NMDA), sugerindo o envolvimento de receptores não-NMDA na mediação da resposta ao L-glu no NSO. Em experimentos funcionais, Dhruva *et al.* (1998) mostraram que os receptores glutamatérgicos do tipo AMPA foram bloqueados por uma dose de NBQX cinco vezes menor do que a dose de AP7 necessária para bloquear os receptores glutamatérgicos do tipo NMDA. Além disso, estes autores testaram a especificidade desses antagonistas; um antagonista NMDA (AP-7) não alterou a resposta cardiovascular ao AMPA e um antagonista não-NMDA (NBQX) não alterou a resposta ao NMDA, sugerindo uma alta seletividade de cada antagonista por seu respectivo receptor. O pré-tratamento com LY235959 em concentração equimolar à de

NBQX não alterou a resposta pressora a microinjeção de L-glu no NSO de ratos não-anestesiados, reforçando a idéia que os receptores não-NMDA estariam envolvidos na resposta pressora ao L-glu. Sladek *et al.* (1998) mostraram que o bloqueio da dessensibilização de receptores AMPA (subtipo de receptor não-NMDA) por ciclótiazida aumentou a liberação de vasopressina estimulada por L-glu, sugerindo o envolvimento destes receptores na liberação do hormônio.

Yang e Coote (2006) mostraram que o sistema glutamatérgico está envolvido em respostas mediadas por ativação simpática. Para determinar se o sistema nervoso simpático estaria envolvido na mediação periférica da resposta pressora ao L-glu injetado no NSO pré-tratamos animais com o bloqueador ganglionar pentolínio. A injeção intravenosa de pentolínio reduziu significativamente a pressão arterial basal confirmando o bloqueio ganglionar. A resposta pressora ao L-glu foi aumentada após pré-tratamento com pentolínio. Esta observação descarta o envolvimento do sistema nervoso simpático na mediação da resposta pressora ao L-glu no NSO. O aumento da resposta pressora à microinjeção de L-glu deve-se em parte a uma redução da linha de base da pressão arterial após o bloqueio do sistema nervoso simpático, principal responsável pela manutenção do tônus vascular. Este aumento também sugere o envolvimento de mecanismos humorais na mediação da resposta pressora ao L-glu no NSO. Similarmente, respostas pressoras à injeção intracortical e intracerebroventricular de noradrenalina ou intraseptal de acetilcolina foram potencializadas em ratos não anestesiados pelo pré-tratamento com pentolínio (FERNANDES *et al.*, 2003; CORRÊA *et al.*, 1985; PERES-POLON & CORRÊA, 1994). Por outro lado, o fato do bloqueio

ganglionar haver bloqueado a resposta bradicárdica ao L-glu no NSO, sem afetar a resposta pressora indica a sua natureza reflexa, via ativação do componente parassimpático do barorreflexo.

Considerando que o sistema nervoso simpático não está envolvido na mediação periférica da resposta pressora à microinjeção de L-glu no NSO, foi investigada a participação de fatores humorais nesta resposta. Para verificar se o sistema vasopressinérgico estaria envolvido na resposta pressora à microinjeção do L-glu no NSO, nós pré-tratamos os animais com um potente antagonista vasopressinérgico, o dTir(CH₂)₅(Me)AVP (50µg/Kg i.v). Esta dose de dTir(CH₂)₅(Me)AVP foi anteriormente utilizada para inibir o componente vasopressinérgico das respostas pressoras a injeções i.c.v. de noradrenalina (CORRÊA *et al.*, 1985), intraseptal de acetilcolina (PERES-POLON & CORRÊA, 1994) ou injeção de L-glu na banda diagonal de Broca (TAVARES & CORRÊA, 2003) de ratos não anestesiados. A resposta pressora à microinjeção de L-glu no NSO foi bloqueada pelo pré-tratamento i.v. com dTir(CH₂)₅ (Me)AVP, sugerindo ser esta resposta pressora causada por liberação aguda de vasopressina. O fato de a resposta bradicárdica haver sido também bloqueada pelo antagonista vasopressinérgico fortalece a idéia de sua origem reflexa.

A vasopressina além de promover reabsorção de água pelo rim é um potente agente vasoconstrictor (BISSET, 1988). A ativação do sistema neurohumoral hipotálamo-hipófise pode gerar respostas pressoras através da liberação de vasopressina na circulação sistêmica (CORRÊA *et al.*, 1985, PERES-POLON & CORRÊA, 1994). A vasopressina é sintetizada por células magnocelulares localizadas no NSO e NPV do hipotálamo. Estes neurônios

sintetizam precursores da vasopressina os quais são transportados até a neurohipófise, a partir da qual a vasopressina é liberada para a circulação sistêmica. A liberação de vasopressina é mediada tanto por fatores osmóticos quanto não osmóticos, envolvendo vários fenômenos fisiológicos, hemodinâmicos, nociceptivos, hipóxia e estímulos relacionados ao estresse (SKLAR & SCHRIER, 1983). Os estímulos que promovem liberação de vasopressina são: elevação na osmolalidade plasmática, redução no volume ou pressão sanguínea, elevação na concentração plasmática de angiotensina II, estímulos estressores, febre e dor (CUNNINGHAM & SAWCHENKO, 1991; SHARE, 1996).

O estímulo osmótico ativa neurônios osmosensíveis na região anterior e ventral do terceiro ventrículo (AV3V), no órgão vascular da lâmina terminal (OVLT), no órgão subfornical e núcleo mediano (LENG *et al.*, 1998). O OVLT é, particularmente, a área mais importante para a osmorregulação, além disso, enviam projeções glutamatérgicas diretas para o NSO (BOURQUE *et al.*, 1994) Onaka e Yagi (2001) demonstraram que o estímulo osmótico promove liberação de L-glu no OVLT, bem como a existência de projeções diretas desta região para os neurônios magnocelulares. Esses neurônios provavelmente liberam L-glu no NSO, já que foi também demonstrado que em experimentos *in vitro* a aplicação de ácido quinurênico, um antagonista glutamatérgico, inibe a liberação de vasopressina durante a estimulação hiperosmótica em preparações isoladas do hipotálamo (SLADEK *et al.*, 1995).

Estímulos estressantes causam alterações na pressão arterial (LAM *et al.*, 1995, VAN DE BUUSE, 2001) e aumentam a liberação de vasopressina (SMITH & DOBSON, 2002; JORGENSEN *et al.*, 2002). Uma vez que o NSO

recebe projeções de estruturas cerebrais do sistema límbico e também de estruturas envolvidas no controle neurovegetativo, é possível que o NSO exerça um papel modulador da pressão arterial, através da liberação de vasopressina frente a estímulos estressantes. Nesse sentido, um mecanismo eficiente de reabsorção de água e integração entre repostas cardiovasculares e comportamentais envolvendo o sistema límbico seria extremamente relevante para a sobrevivência de roedores em seu meio.

Nossos resultados favorecem a idéia do envolvimento do NSO na modulação cardiovascular. A resposta cardiovascular à microinjeção de L-glu no NSO caracterizada por aumento da pressão arterial e queda da frequência cardíaca foi dependente da ativação dos receptores glutamatérgicos do tipo não-NMDA, sendo mediadas por liberação aguda de vasopressina para a circulação sistêmica. Sendo assim, o sistema glutamatérgico presente no NSO seria um importante mediador da liberação de vasopressina, tanto em situações normais quanto em situações de hipotensão, hipovolemia ou de aumento na osmolalidade plasmática.

CONCLUSÕES

Podemos concluir que a microinjeção de L-glu no NSO de ratos não anestesiados causa aumento de pressão arterial acompanhado de queda da frequência cardíaca. Os receptores glutamatérgicos envolvidos nesta resposta são do tipo não NMDA e a mediação periférica da resposta se dá pela liberação de vasopressina para a circulação sistêmica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BISSET, G. W., CHOWDREY, H. S. Control of release of vasopressin by neuroendocrine reflexes. **Q J Exp Physiol.**, 73 (n.6): 811-72, 1988.

BORGES, R. F. B. **Ajuste de coordenadas estereotáticas para ratos com pesos variáveis.** Tese (Mestrado em Farmacologia). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 1999.

BOUDABA, C., DI, S., TASKER, J. G. Presynaptic noradrenergic regulation of glutamate inputs to hypothalamic magnocellular neurones. **J Neuroendocrinol.**, 5 (n.8): 803-10, 2003.

BOURQUE, C. W., OLIET, S. H., RICHARD, D. Osmoreceptors, osmoreception, and osmoregulation. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 15: 231-74, 1994.

CIRIELLO, J., CALARESU, F. R. Role of paraventricular and supraoptic nuclei in central cardiovascular regulation in the cat. **Am J Physiol.**, 239 (n.1): 137-42, 1980.

CORRÊA, F. M. A. CNS catecholaminergic mechanisms in cardiovascular control. **Ciência e Cultura**, 42(7): 488-94, 1990.

CORRÊA, F. M. A., MAGRO, I. A. S., PERES-POLON, V. L., ANTUNES-RODRIGUES, J. Mechanism of the CNS-mediated pressor response to

intracerebroventricular injection of noradrenaline in unanaesthetized rats.

Neuropharmacology, 24: 831–37, 1985.

COWLEY, A. W. Jr., LIARD, J. F. Vasopressin and arterial pressure regulation.

Hypertension, 11 (Suppl I): I25-I32, 1988.

COWLEY, A. W. Jr., QUILLEN, E.W., SKELTON, M. M. Role of vasopressin in cardiovascular regulation. **Fed. Proc.**, 42: 3170-73, 1983.

CUNNINGHAM, J. T., BRUNO, S. B., GRINDSTAFF, R. R., GRINDSTAFF, R. J., HIGGS, K. H., MAZZELLA, D., SULLIVAN, M. J. Cardiovascular regulation of supraoptic vasopressin neurons. **Prog Brain Res.**, 139: 257-73, 2002.

CUNNINGHAM, J. T., PENNY, M. L., MURPHY, D. Cardiovascular regulation of supraoptic neurons in the rat: synaptic inputs and cellular signals. **Progress in Biophysics & Molecular Biology**, 84: 183–96, 2004.

CUNNINGHAM, JR., E.T., SAWCHENKO, P.E. Reflex control of magnocellular vasopressin and oxytocin secretion. **Trends Neurosci.**, 14: 406–11, 1991.

DAMPNEY, R. A. L. Functional organization of central pathways regulating the cardiovascular system. **Physiol. Rev.**, 74: 321-63, 1994.

FERNANDES, K. B., CRIPPA, G. E., TAVARES, R. F., ANTUNES-RODRIGUES, J., CORREA, F. M. Mechanisms involved in the pressor

response to noradrenaline injection into the cingulate cortex of unanesthetized rats. **Neuropharmacology**, 44(6):757-63, 2003.

FOLKOW, B. Physiology of behavior and blood pressure regulation in animals. In: **Handbook of Hypertension 9**, Julius S., Basset D.R., eds. New York, Elsevier, 1987.

GOLDSTEIN, D. S. Central catecholamines and the control of sympathetic tone. In 2, **Central Neural Mechanisms in Cardiovascular Regulation**, v.02. Eds. Kunos G., Ciriello J., Boston, 1991.

GOODCHILD, A. K., DAMPNEY, R. A. L., BANDLER, R. A method for evoking physiological responses by stimulation of cell bodies but not axons of passage, within a localized region of the central nervous system. **J. Neurosci. Methods**, 6: 357–63, 1982.

HOFFMAN, W. E., PHILLIPS, M. I. Regional study of cerebral ventricle sensitive sites to angiotensin II. **Brain Res.**, 110: 313–30, 1976.

HOLLMANN, M., HEINEMANN S. Cloned glutamate receptors. **Annu Rev Neurosci.**, 17: 31-108, 1994.

JORGENSEN, H., KNIGGE, U., KJAER, A., WARBERG, J. Serotonergic involvement in stress-induced vasopressin and oxytocin secretion. **European Journal Endocrinology**, 147: 815-824, 2002.

KANNAN, H., NIIJIMA, A., YAMASHITA, H. Effects of stimulation of the hypothalamic paraventricular nucleus on blood pressure and renal sympathetic nerve activity. **Brain Res Bull.**, 20 (n.6): 779-83, 1988.

KANNAN, H., HAYASHIDA, Y., YAMASHITA, H., 1989. Increase in sympathetic outflow by paraventricular nucleus stimulation in awake rats. **Am J Physiol.**, 256 (6 Pt 2): 1325-30.

LAM, W., LOUIS, W. J., VERBERNE, A. J. M Effect of dorsal periaqueductal grey lesion on baroreflex and cardiovascular response to air-jet stress. **Journal of Autonomic Nervous System**, 53: 35-42, 1995.

LENG, G., BROWN, C. H., RUSSELL, J. A. Physiological pathways regulating the activity of magnocellular neurosecretory cells. **Progress in Neurobiology**, 57:625- 55, 1999.

LIPSKI, J., BELLINGHAM, M. C., WEST, M. J., PILOWSKY, P. Limitations of the technique of pressure microinjection of excitatory amino acids for evoking responses from localized regions of the CNS. **J. Neurosci. Methods**, 26: 169–79, 1988.

MACHADO, B. H., BONAGAMBA, L. G. Microinjection of L-glutamate into the nucleus tractus solitari increases arterial pressure in conscious rats. **Brain Res.**, 576: 131–38, 1992.

MARTIN, D. S., HAYWOOD, J. R. Sympathetic nervous system activation by glutamate injections into the paraventricular nucleus. **Brain Res.** 577 (n.2): 261-67, 1992.

MEEKER, R. B., GREENWOOD, R. S., HAYWARD, J. N. Glutamate receptors in rat hypothalamus and pituitary. **Endocrinology**, 134: 621–29, 1994.

NEIL, J. J., LOEWY, A. D. Decreases in blood pressure in response to lglutamate microinjections into the A5 catecholamine cell group. **Brain Res.** 241: 271– 78, 1982.

ONAKA, T.; YAGI, K. Involvement of N-Methyl-D-Aspartic acid receptor activation in oxytocin and vasopressin release after osmotic stimuli in rats. **Journal of Neuroendocrinology**, 13:166-174, 2001.

PAJOLLA, G. P. Mecanismos glutamatérgicos do hipotálamo lateral e controle do sistema cardiovascular no rato. Tese apresentada ao departamento de farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 2004.

PAJOLLA, G. P., CORRÊA F. M. A. Cardiovascular responses to the injection of L-glutamate in the lateral hypothalamus of unanesthetized rats. **Auton Neurosci.**, 116(1-2): 19-29, 2004.

PAJOLLA, G. P., PELOSI G.G., CORRÊA F. M. A. Involvement of NMDA receptors in the hypotensive response to the injection of l-glutamate into the

lateral hypothalamus of unanesthetized rats. **Brain Research**, 1053: 19 – 26, 2005.

PAK, C. W., CURRAS-COLLAZO, M. C. Expression and plasticity of glutamate receptors in the supraoptic nucleus of the hypothalamus. **Microsc Res Tech.**, 56 (n.2): 92-100, 2002.

PAXINOS, G., WATSON, C. **The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates**, 2nd Edition. Academic Press, Sydney, 1986.

PERES-POLON, V. L., CORRÊA, F. M. A. Pressor effects of acetylcholine injected into the lateral septal area of conscious rats. *Neuropharmacology*, 33: 1537–44, 1994.

PIZZIRUSSO, A.; OLIVA, P., MAIONE, S., D'AMICO, M., ROSSI, F., BERRINO, L. Role of vasopressin on excitatory amino acids mediated pressor responses in the periaqueductal gray area. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.**, 357: 514-18, 1998.

REIS, D. J., MORRISON, S., RUGGIERO, D. A. The C1 area of the brainstem in tonic and reflex control of blood pressure. State of the art lecture. **Hypertension**, 11(2 Pt 2): 8-13, 1988.

ROSS, C. A., RUGGIERO, D. A., JOH, T. H., PARK, D. H., REIS, D. J. Rostral ventrolateral medulla: selective projections to the thoracic autonomic cell

column from the region containing C1 adrenaline neurons. **J Comp Neurol.**, 228 (n. 2); 168-85, 1984.

SEVERS, W. B., DANIELS-SEVERS, A. E. Effects of angiotensin on the central nervous system. **Pharmacol. Rev.**, 25: 415–49, 1973.

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

SKLAR, A. H., SCHIER, R. W. Central nervous system mediators of vasopressin release. **Physiol. Rev.** 63: 1243-80, 1983.

SLADEK, C. D., FISHER, K. Y., SIDOROWICZ, H. E., MATHIASSEN, J. R. Osmotic stimulation of vasopressin mRNA content in the supraoptic nucleus requires synaptic activation. **Am J Physiol.**, 268(4 Pt 2): 1034-39, 1995.

SLADEK, C. D., BADRE S. E., MORSETTE D. J., SIDOROWICZ, H. E., 1998. Role non-NMDA receptors in osmotic and glutamate stimulation of vasopressin release: effect of rapid receptor desensitization. **J Neuroendocrinol.**, 10: 897-903, 1998.

SMITH, R. F., DOBSON, H. Hormonal interactions within the hypothalamus and pituitary with respect to stress and reproduction in sheep. **Domestic Animal Endocrinology**, 23: 75-85, 2002.

SUN, M. K., YOUNG, B. S., HACKETT, J. T., GUYENET, P. G. Reticulospinal pacemaker neurons of the rat rostral ventrolateral medulla with putative sympathoexcitatory function: an intracellular study in vitro. **Brain Res.**, 442 (n.2): 229-39, 1988.

SZCZEPANSKA-SADOWSKA, E. Interaction of vasopressin and angiotensin II in central control of blood pressure and thirst. **Regul. Pep.**, 66:65-71, 1996.

TAVARES, R. F., CORREA, F. M. A. Pressor effects of L-glutamate injected into the diagonal band of Broca of unanesthetized rats. **Brain Res.**, 959 (n.2): 312-9, 2003.

VAN DE BUUSE, M., VAN ACKER SABE, FLUTTERT, M., KLOET, E. R. Blood pressure, heart rate, and behavioral responses to psychological "novelty" stress in freely moving rats. **Psychophysiology**, 38: 490-499, 2001.

VERBERNE, A. J. M., OWENS, N. C. Cortical modulation of the cardiovascular system. **Prog. Neurobiol.**, 54 (n.2): 159-68, 1998.

YAMASHITA, H., KANNAN, H., KASAI, M., OSAKA, T. Decrease in blood pressure by stimulation of the rat hypothalamic paraventricular nucleus with L-glutamate or weak current. **J Auton Nerv Syst.**, 19(3): 229-34, 1987.

YANG, A.; COOTE, J.H. The role of supra-spinal vasopressin and glutamate neurones in an increase in renal sympathetic activity in response to mild haemorrhage in the rat. **Exp. Physiol.**, 2006 May 12; [Epub ahead of print].

APÊNDICE

VERSÃO FINAL DO MANUSCRITO**CARDIOVASCULAR EFFECTS OF L-GLUTAMATE MICROINJECTION IN
THE SUPRAOPTIC NUCLEUS OF UNANAESTHETIZED RATS**

Busnardo C, Tavares RF, Corrêa, FMA*

Department of Pharmacology, School of Medicine of Ribeirão Preto,
University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil

*Corresponding author. Fax: + 55-16-633-2301.

email address: fmdacorr@fmrp.usp.br

Running title: SON-related pressor responses

Keywords: blood pressure, heart rate, supraoptic nucleus, L-glutamate,
glutamatergic receptors, vasopressin

Abstract

We report on the cardiovascular effects of L-glutamate (L-glu) microinjection in the hypothalamic supraoptic nucleus (SON) and possible receptor and mechanisms involved. Microinjection of L-glu in 100 nL in the SON caused dose-related pressor and bradycardic responses in unanesthetized rats. Responses were markedly reduced in the urethane-anesthetized rats. The response to L-glu 10 nmol was blocked by local pretreatment with 2 nmol of the non-NMDA-receptors antagonist NBQX and not affected by 2 nmol of the selective NMDA-receptor antagonist LY 235959, suggesting that non-NMDA receptors mediate these responses. The pressor and bradycardic response to L-glu was potentiated by intravenous pretreatment with the ganglionic blocker pentolinium and blocked by the vasopressin antagonist dTyr(CH₂)₅(Me)AVP, suggesting involvement of circulating vasopressin in this response. In conclusion the results indicate that pressor responses to SON microinjection of L-glu are due to non-NMDA glutamate receptors activation and vasopressin release.

1. INTRODUCTION

The hypothalamic supraoptic nucleus (SON) contains cells magnocellular that release vasopressin and oxytocin, which regulates water balance, cardiovascular function, parturition and lactation. Electrophysiological studies showed that vasopressinergic but not oxytocinergic neurons are inhibited by baroreceptor stimulation, suggesting their involvement in cardiovascular modulation (Cunnigham *et al.*, 2002).

Ciriello and Calaresu (1980) reported increase in blood pressure and heart rate responses after electrical stimulation of the paraventricular nucleus (PVN) or the SON in cats. Because heart increase was abolished in vagotomized and sympathectomized cats whereas the pressor response was only partially reduced, these authors suggested that the remaining response could be related to vasopressin release.

Glutamate is an abundant excitatory amino acid in the central nervous system (CNS) and magnocellular hypothalamic neurons receive dense glutamatergic innervation (Boudaba, Di and Tasker, 2003). SON magnocellular neurons were reported to be involved in osmotically induced vasopressin release (Sladek *et al.*, 1995). These authors reported inhibition of hyperosmotic stimulation-induced vasopressin release in hypothalamic explants after kynurenic acid administration. Although there is strong evidence of vasopressin-mediated pressor responses after SON stimulation, there is none on the effects of excitatory amino acid administration in the SON of conscious freely moving rats. In the present study we report pressor effects after L-glutamate (L-glu) microinjection in the SON as well as their mediation by vasopressin release.

2. MATERIALS E METHODS

2.1. *Animal preparation*

Male Wistar rats weighing between 250 and 270 g were used. Animals were kept in the Animal Care Unit of the Department of Pharmacology of the School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo. Rats were housed individually in plastic cages in a 23–25°C temperature-controlled room, with free access to water and commercial food. The Institution's animal ethics committee approved housing conditions and experimental protocols.

Rats were anesthetized with tribromoethanol, 250 mg/kg (i.p.). After local anesthesia with 2% lidocaine, the skull was surgically exposed and a stainless steel guide cannula (0.6 mm o.d., 23G) was implanted 1 mm above the injection site using a stereotaxic apparatus (Stoelting, USA). Stereotaxic coordinates for cannula implantation into the SON were selected from the brain atlas of Paxinos and Watson (1986): AP = +6.9 mm, L = +1.8 mm from the medial suture and V = - 8.1 mm deep from the skull. Cannulas were fixed to the skull with dental cement and one metal screw. A tight-fitting mandrill was kept inside the guide cannula to avoid its occlusion. After surgery, animals were treated with 100,000 units of benzyl penicillin. Two days later, animals were anesthetized with tribromoethanol and a polyethylene catheter was implanted into the femoral artery for blood pressure recording. The arterial catheter consisted of a segment of PE-10 tubing (4–5 cm) heat-bonded to a longer segment of PE-50 tubing (12–14 cm). The catheter was filled with 0.3% heparin (5000 U/mL) in sterile saline (150 mM NaCl). The PE-10 segment was introduced into the femoral

artery until the tip reached the aorta. The catheter was secured in position with thread and the PE-50 segment was passed under the skin to be extruded on the dorsum of the animals.

After surgery, the animals were allowed to recover for 24 h. When the i.v. route was used for drug injection, another similar catheter was simultaneously inserted into the femoral vein.

In one protocol anesthetized rats (urethane 1.25 g/kg) were used to study anesthesia effects on the blood pressure response. Brain guide cannula and the arterial catheter were implanted in the same surgical session. Experimental procedures were initiated 1 h after anesthesia onset. Absence of somatic motor reflexes in response to tail pitching indicated deep anesthesia and analgesia. Because of the short duration of the experimental procedures, no anesthetic supplementation was necessary.

2.2. Measurement of cardiovascular responses

During experiments, freely moving rats were kept in individual cages and arterial pressure was recorded using a pressure transducer (HP1280, Hewlett-Packard, USA) and a preamplifier (model 7754A, Hewlett-Packard, USA) coupled to a computerized acquisition system (MP100, Biopac, USA). Mean arterial blood pressure (MAP) and heart rate (HR) were derived from pulsatile blood pressure recordings. Responses were calculated based on the average MAP and HR recordings at effect plateau.

2.3. Drug injections

Drugs were dissolved in artificial cerebrospinal fluid (ACF). Injections in the SON were performed in a volume of 100 nL using a 1 μ L syringe (KH7001, Hamilton, USA) connected to a 33G microinjection needle by PE-10. The microinjection needle was 1 mm longer than the guide cannula.

2.4. Drugs

The following drugs were used: - L-glutamic acid monosodium salt and urethane (SIGMA, USA); LY 235959 and NBQX (TOCRIS, USA); Pentolinium (SIGMA, USA); dTyr(CH₂)₅(Me)AVP (Peninsula, USA) and tribromoethanol (Aldrich, USA). Vehicle – artificial cerebrospinal fluid (ACF) had the following composition: NaCl 100mM; Na₃PO₄ 2mM; KCl 2,5mM; MgCl₂ 1,0mM; NaHCO₃ 27mM; CaCl₂ 2,5mM; pH=7, 4.

2.5. Histological procedure

At the end of the experiments, the rats were anesthetized with urethane, 1.25 g/kg, i.p. and 100 nL of filtered 1% Evan's blue dye was injected into the brain as a marker of the injection site. The chest was surgically opened, the descending aorta occluded, the right atrium severed and the brain perfused with 10% formalin through the left ventricle. The brains were post fixed for 48 h at 4°C, and 40 μ m sections were cut with a cryostat (CM1900, Leica, Germany). Brain sections were stained with 1% neutral red. Placements of the injection

needles were verified in serial sections, using the rat brain atlas of Paxinos and Watson (1986) as reference.

2.6. Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the Student's *t*-test paired or unpaired, assuming $p < 0.05$. Non-linear regression was performed using commercial software (Prism 3.0, Graph Pad, USA). Data are represented as mean \pm SEM.

3. RESULTS

3.1 Blood pressure and heart rate responses to L-glu microinjection in the SON of unanesthetized rats

Microinjections of ACF in the SON did not affect baseline MAP or HR (before: MAP=96±5 mmHg, HR=316±17 bpm; after: MAP=97±6 mmHg, HR=291±28 bpm, n=6).

Injections of 1, 3, 10 or 50 nmol of L-glu in the SON caused dose-related pressor and bradycardic response (Fig. 1). Nonlinear regression analysis indicated a significant correlation between dose and the hypertensive ($r^2=0.93$, $p<0.05$) or bradycardic response ($r^2=0.81$, $p<0.05$), with an estimated 10 nmol ED₅₀.

L-glu 10 nmol in the SON (basal MAP= 101± 4 mmHg and HR=353±10 bpm, n=6) caused pressor response (Δ MAP=20±1 mmHg) and HR decrease (Δ HR= -50 ± 5 bpm), Fig 2. The latency to the onset and the response were respectively 16±2 s and 7±0.2 min.

The hypertensive and bradycardic responses were markedly reduced (Δ MAP = 1±1 mmHg, Δ HR=0.3±4 bpm, n=7) when L-glu microinjections were applied outside the SON.

Recordings showing the cardiovascular response to L-glu microinjection in the SON of one unanesthetized rat are shown in Fig 3.

3.2 Effect of local pretreatment with ACF, LY 235959 or NBQX on the pressor and bradycardic response to L-glu microinjection in the SON of unanesthetized rats

Microinjection of ACF caused no changes in baseline MAP or HR (before ACF: MAP=96±5 mmHg, HR=316±17 bpm and after: Δ MAP=97±6 mmHg, Δ HR=323±17 bpm, n=6).

Pretreatment with ACF did not affect the pressor and bradycardic response to L-glu microinjected in the SON (before ACF: Δ =19 ±1 mmHg, Δ HR=-38±5 bpm; after: Δ MAP= 21 ± 1 mmHg, Δ HR=-46±7 bpm, Fig. 4).

Microinjection of LY 2 nmol in the SON did not affect baseline MAP or HR (before LY: MAP=97±4 mmHg, HR=357±18 bpm and after: Δ MAP=99±5 mmHg, Δ HR=345±26 bpm, n=6) or the pressor and bradycardic response to L-glu microinjection in the SON (before LY: Δ MAP=20±2 mmHg, Δ HR=-48±6 bpm and after: Δ MAP=18±3 mmHg, Δ HR=-46±4 bpm, Fig. 4).

Microinjection of NBQX 2 nmol in the SON did not affect baseline MAP or HR (before NBQX: MAP=93±6 mmHg, HR=336±4 bpm and after: Δ MAP=97±3 mmHg, Δ HR=357±17 bpm, n=6). However, NBQX blocked the pressor and bradycardic response to L-glu microinjection in the SON (before NBQX: Δ MAP=20±2 mmHg, Δ HR=-46±6 bpm; after: Δ MAP= 3 ± 0.5 mmHg, Δ HR=-5±5 bpm, Fig. 4, paired Student's t test, p<0.05).

3.3 Blood pressure and heart rate changes to L-glu microinjection in the SON of anesthetized rats

Baseline MAP and HR of the urethane-anesthetized rats were respectively 90 ± 1 mmHg and 391 ± 29 bpm, $n=5$.

Anesthesia markedly reduced the response to L-glu 10 nmol in the SON ($\Delta\text{MAP} = 5 \pm 2$ mmHg, $\Delta\text{HR} = -6 \pm 4$ bpm) when compared to control response ($\Delta\text{MAP} = 20 \pm 1$ mmHg, $\Delta\text{HR} = -50 \pm 5$ bpm), paired Student's t-test, $p < 0.05$.

Recordings showing cardiovascular response to L-glu 10 nmol microinjected in the SON of one urethane-anesthetized rat are presented in figure 5.

3.4 Effect of systemic pretreatment with dTyr(CH₂)₅(Me)AVP or Pentolinium on the pressor and bradycardic response to L-glu microinjection in the SON of unanesthetized rats

The pretreatment with dTyr(CH₂)₅(Me)AVP (50 $\mu\text{g}/\text{kg}$, i.v.) did not affect baseline MAP or HR (before dTyr: MAP= 89 ± 4 mmHg, HR= 345 ± 14 bpm; after: MAP= 86 ± 2 mmHg, HR= 359 ± 19 bpm, $n=5$), but blocked the pressor and bradycardic response to L-glu microinjection in the SON (before dTyr: $\Delta\text{MAP} = 21 \pm 3$ mmHg, $\Delta\text{HR} = -48 \pm 4$ bpm; after: $\Delta\text{MAP} = 2 \pm 1$ mmHg, $\Delta\text{HR} = -8 \pm 2$ bpm, Fig. 6, paired Student's t-test, $p < 0.05$).

The pretreatment with pentolinium (5mg/kg, i.v.) reduced baseline MAP (before pentolinium: MAP= 94 ± 5 mmHg; after: MAP= 66 ± 2 mmHg, $n=4$, paired Student's t-test, $p < 0.05$) but not altered the baseline HR (before pentolinium:

HR=363±12 bpm; after: HR=372±5 bpm). Pentolinium injection (5mg/Kg, i.v.) significantly potentiated the pressor response to L-glu microinjection in the SON (before pentolinium: Δ MAP=16±2 mmHg; after: Δ MAP=38±5 mmHg, Fig. 6, paired Student's t-test, $p < 0.05$), and blocked the bradycardic response to L-glu microinjection in the SON (before pentolinium: Δ HR=-42,5±8 bpm; after: Δ HR=-5±3 bpm, Fig. 6, paired Student's t-test, $p < 0.05$).

3.5 Distribution of microinjection sites

A diagrammatic representation showing the distribution of microinjection sites throughout the SON and outside the SON is presented in Fig 7.

4. DISCUSSION

In the present study we report on the cardiovascular responses to the injection of L-glu in the SON. Microinjection of L-glu in the SON caused dose-related blood pressure increases and bradycardic responses. No significant blood pressure responses were observed when L-glu was microinjected in hypothalamic structures immediately surrounding the the SON, reinforcing the idea of an action at the SON.

Glutamatergic receptors are divided in ionotropic and metabotropic receptor subfamilies. These receptors are further classified according to agonist selectivity and amino acid homology in N-methyl-D_aspartate (NMDA) and non-NMDA receptor. The later was subdivided in α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionate (AMPA) and kainate (KA) subtypes (Hollman and Heinemann, 1994). Metabotropic glutamate receptors (mGLURs) are coupled to G-protein, which activates second messengers and can affect other ion channels as well as intracellular processes (Pak and Currás-Collazo, 2002). Immunohistochemical and pharmacological studies showed that the hypothalamus is one of the areas involved in the regulation of cardiovascular function and contains high levels of glutamate and ionotropic glutamate receptors (Meeker *et al*, 1994; Singewald and Phillipu, 1996).

The cardiovascular effects of L-glu microinjection in the SON could be evoked by action on NMDA, non-NMDA or metabotropic glutamate receptors. To determine which glutamate receptor is involved in the pressor response to L-glu microinjection in the SON we pretreated animals with selective non-NMDA and NMDA glutamate receptors antagonists. The pressor and bradycardic

response to L-glu microinjection in the SON was blocked by local pretreatment with the potent non-NMDA selective antagonist NBQX and not affected by local pretreatment with the potent NMDA selective antagonist LY 235959, suggesting that non-NMDA receptors are involved in this response. The pressor response to L-glu microinjection in the SON was markedly reduced in urethane-anesthetized rats. The possible leakage of drug from the central nervous system to the peripheral circulation should also be considered when similar responses are observed after central or systemic drug injection. Blood pressure responses to centrally injected catecholamines and notably to NA were reported to be markedly affected by anesthesia (Corrêa *et al.*, 1982). Previous evidence also indicated that anesthesia may invert hypertensive cns-mediated blood pressure increases into hypotensive responses, such as those caused by microinjection of the L-glu into the PVN or the nucleus solitary tract (Kannan, Hayashida, Yamashita, 1989; Yamashita *et al.*, 1987; Machado and Bonagamba, 1992) or to block them, as in the case of the i.c.v injection of angiotensin II (Hoffman and Phillips, 1976; Severs and Daniel-Severs, 1973). The fact that the pressor response to the injection L-glu into the SON of unanesthetized rats was markedly reduced by urethane anesthesia roles out a possible leakage from the injection site in the SON to the systemic circulation. It also suggests that the neural circuitry is dampened under anesthesia. Additionally, this observation precludes the use of anesthetized animals to study the cardiovascular effects of the injection of L-glu in the SON.

The absence of the response in the anesthetized rat could be explained by the fact that circulating vasopressin levels are markedly increased in urethane-anesthetized rats. Consequently further vasopressinergic stimulation

would not yield significant response, as previously observed after the i.c.v. injection of noradrenaline into urethane-anesthetized rats (Corrêa *et al.*, 1985).

Sladek and co-workers (1998) reported that blockade of AMPA receptors with cyclothiazide increased glutamate-stimulated vasopressin release from hypothalamic explants, suggesting the involvement of these receptors in vasopressin release.

Vasopressin promotes water reabsorption by the kidney, but is also a potent vasoconstrictor agent (Bisset, 1988). Vasopressin is synthesized by the cells magnocellular located in the SON and PVN of hypothalamus. These neurons produce vasopressin precursors that are carried to posterior hypophysis to be released in the systemic circulation. Vasopressin release is stimulated by reduction in the blood pressure and blood volume, and by increase in plasma osmolality (Cunningham *et al.*, 2004). So, vasopressin is a putative mediator of the pressor response observed after microinjection of L-glu in the SON stimulation.

Attempting to verify if the vasopressinergic system is involved in the pressor response to L-glutamate microinjection into the SON we pretreated animals with the potent vasopressin antagonist dTyr(CH₂)₅(Me)AVP. This vasopressin antagonist has been previously used to evidence vasopressin involvement in the mediation of inhibit pressor responses caused by i.c.v. injection of noradrenaline (Corrêa *et al.*, 1985), intraseptal injection of acetylcholine (Peres-Polon and Corrêa, 1994) or L-glu injection into the diagonal band of Broca (Tavares and Corrêa, 2003).

The pressor response to L-glu microinjection in the SON was blocked with dTyr(CH₂)₅ (Me)AVP, thus suggesting that the pressure and bradycardic

response to SON stimulation is caused by acute vasopressin release. Moreover, the pressor response to L-glu was potentiated by pretreatment with the ganglionic blocker pentolinium. This observation rules out the involvement of the sympathetic nervous system in the mediation of the pressor response to L-glu into SON.

In conclusion, results indicate that injection of L-glu in the SON causes pressor responses due to activation of local non-NMDA glutamate receptors involved in vasopressin release. Data also support the idea of an SON involvement in cardiovascular modulation.

5. REFERENCES

BISSET, G. W., CHOWDREY, H. S., 1988. Control of release of vasopressin by neuroendocrine reflexes. *Q J Exp Physiol.*, 73 (n.6), 811-72.

BOUDABA, C., DI, S., TASKER, J. G., 2003. Presynaptic noradrenergic regulation of glutamate inputs to hypothalamic magnocellular neurones. *J Neuroendocrinol.*, 15 (n.8), 803-10.

CIRIELLO, J., CALARESU, F. R., 1980. Role of paraventricular and supraoptic nuclei in central cardiovascular regulation in the cat. *Am J Physiol.*, 239 (n.1), 137-42.

CORRÊA, F. M. A., MAGRO, I. A. S., PERES-POLON, V. L., ANTUNES-RODRIGUES, J., 1985. Mechanism of the CNS-mediated pressor response to intracerebroventricular injection of noradrenaline in unanaesthetized rats. *Neuropharmacology*, 24, 831–837.

CUNNINGHAM, J. T., BRUNO, S. B., GRINDSTAFF, R. R., GRINDSTAFF, R. J., HIGGS, K. H., MAZZELLA, D., SULLIVAN, M. J., 2002. Cardiovascular regulation of supraoptic vasopressin neurons. *Prog Brain Res.*, 139, 257-73.

CUNNINGHAM, J. T., PENNY, M. L., MURPHY, D., 2004. Cardiovascular regulation of supraoptic neurons in the rat: synaptic inputs and cellular signals. *Progress in Biophysics & Molecular Biology*, 84, 183–196.

HOFFMAN, W. E., PHILLIPS, M. I., 1976. Regional study of cerebral ventricle sensitive sites to angiotensin II. *Brain Res* 110, 313–330.

HOLLMANN, M., HEINEMANN S., 1994. Cloned glutamate receptors. *Annu Rev Neurosci*, 17, 31-108.

KANNAN, H., HAYASHIDA, Y., YAMASHITA, H., 1989. Increase in sympathetic outflow by paraventricular nucleus stimulation in awake rats. *Am J Physiol.*, 256 (6 Pt 2), 1325-30

MACHADO, B. H., BONAGAMBA, L. G., 1992. Microinjection of L-glutamate into the nucleus tractus solitarii increases arterial pressure in conscious rats. *Brain Res.*, 576, 131–138.

MEEKER, R. B., GREENWOOD, R. S., HAYWARD, J. N., 1994. Glutamate receptors in rat hypothalamus and pituitary. *Endocrinology*, 134, 621–629.

PAJOLLA, G. P., CORRÊA F. M. A., 2004. Cardiovascular responses to the injection of L-glutamate in the lateral hypothalamus of unanesthetized rats. *Auton Neurosci.*, 116(1-2), 19-29.

PAK, C. W., CURRAS-COLLAZO, M. C., 2002. Expression and plasticity of glutamate receptors in the supraoptic nucleus of the hypothalamus. *Microsc Res Tech.*, 56 (n.2), 92-100.

PAXINOS, G., WATSON, C., 1986. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, 2nd Edition. Academic Press, Sydney.

PERES-POLON, V. L., CORRÊA, F. M. A., 1994. Pressor effects of acetylcholine injected into the lateral septal area of conscious rats. *Neuropharmacology*, 33, 1537–1544.

SLADEK, C. D., FISHER, K. Y., SIDOROWICZ, H. E., MATHIASSEN, J. R., 1995. Osmotic stimulation of vasopressin mRNA content in the supraoptic nucleus requires synaptic activation. *Am J Physiol.*, 268(4 Pt 2), 1034-9.

SLADEK, C. D., BADRE S. E., MORSETTE D. J., SIDOROWICZ, H. E., 1998. Role non-NMDA receptors in osmotic and glutamate stimulation of vasopressin release: effect of rapid receptor desensitization. *J Neuroendocrinol.*, 10, 897-903.

SEVERS, W. B., DANIELS-SEVERS, A. E., 1973. Effects of angiotensin on the central nervous system. *Pharmacol Rev*, 25, 415–449.

SINGEWALD, N., PHILIPPU, A., 1996. Involvement of biogenic amines and amino acids in the central regulation of cardiovascular homeostasis. *Trends Pharmacol. Sci.*, 17, 356–363.

TAVARES, R. F., CORREA, F. M. A., 2003. Pressor effects of L-glutamate injected into the diagonal band of Broca of unanesthetized rats. *Brain Res.*, 959 (n.2), 312-9.

YAMASHITA H., KANNAN H., KASAI M., OSAKA T., 1987. Decrease in blood pressure by stimulation of the rat hypothalamic paraventricular nucleus with L-glutamate or weak current. *J Auton Nerv Syst.*, 19(3),229-34.

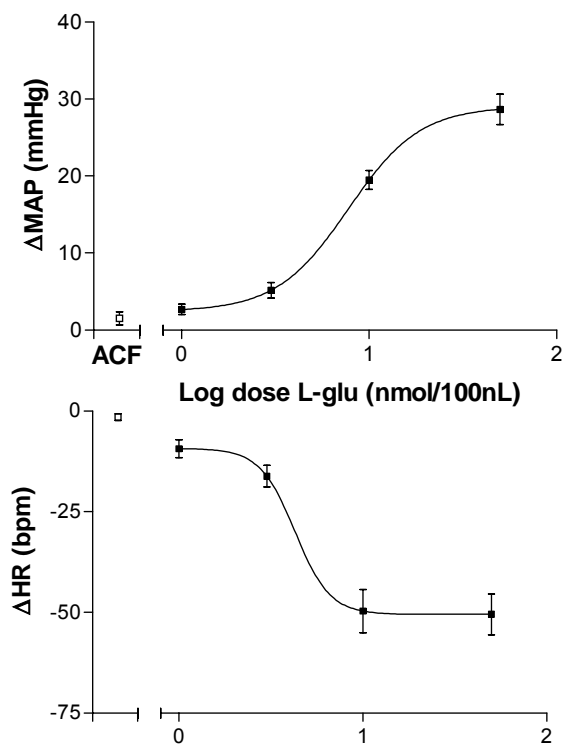


Figure 1 – Dose-effect curves for L-glutamate (L-glu) microinjected in the SON on mean arterial pressure (ΔPAM) and heart rate (ΔHR) of unanesthetized rats. L-glu doses were: 1, 3, 10 and 50 nmol/100 nL, $n=6$. ACF – artificial cerebrospinal fluid.

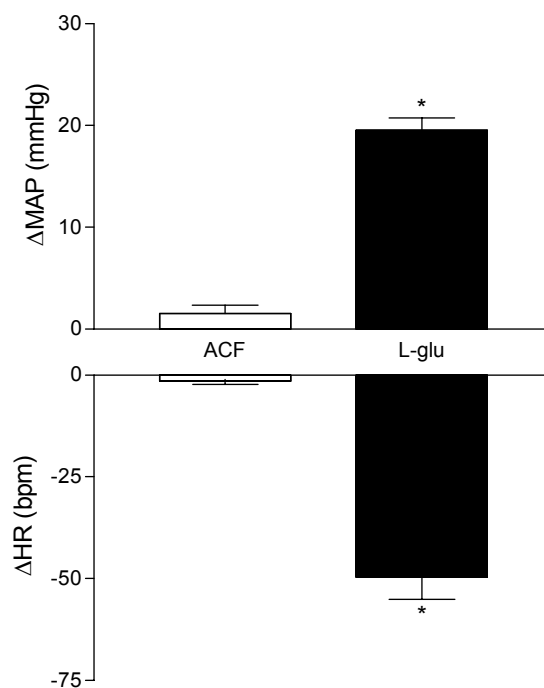


Figure 2 - Mean arterial pressure (Δ PAM) and heart rate (Δ HR) changes in response to the microinjection of artificial cerebrospinal fluid (ACF) (open column, n=6) or L-glutamate (L-glu) 10 nmol/100 nL (filled column, n=6) in the SON of unanesthetized rats. * $p < 0.05$, unpaired Student's **t**-test.

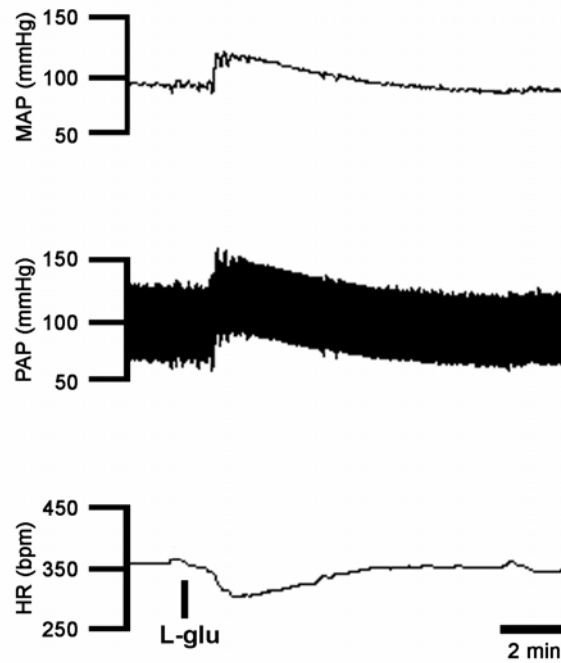


Figure 3 - Mean arterial pressure (MAP), pulsatile arterial pressure (PAP) and heart rate (HR) recordings illustrating the pressor and bradycardic response to L-glutamate (L-glu) 10 nmol/100 nL microinjected in the SON of one unanesthetized rat.

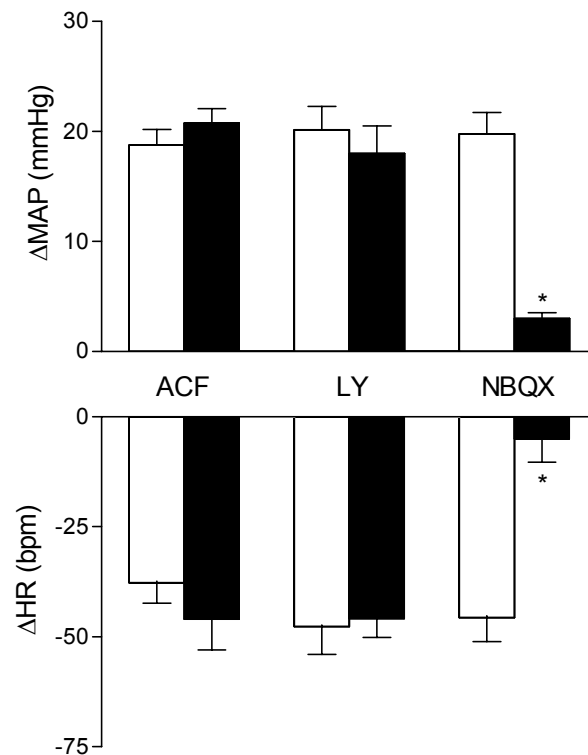


Figure 4 – Mean arterial pressure (Δ PAM) and the heart rate (Δ HR) changes in response to the microinjection of L-glu in the SON of unanesthetized rats before (open columns) and after (filled columns) local pretreatment with ACF, 2 nmol of the selective NMDA antagonist LY 235959 or 2 nmol of the potent non-NMDA antagonist NBQX. * $p < 0.05$, Paired Student's *t*-test.

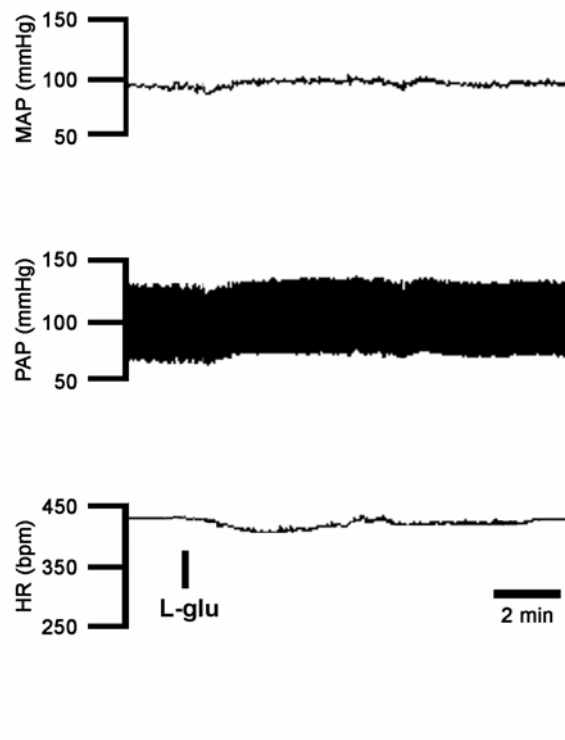


Figure 5 - Mean arterial pressure (MAP), pulsatile arterial pressure (PAP) and heart rate (HR) recordings illustrating the pressor and bradycardic response to L-glu 10 nmol/100 nL microinjected in the SON of one anesthetized rat.

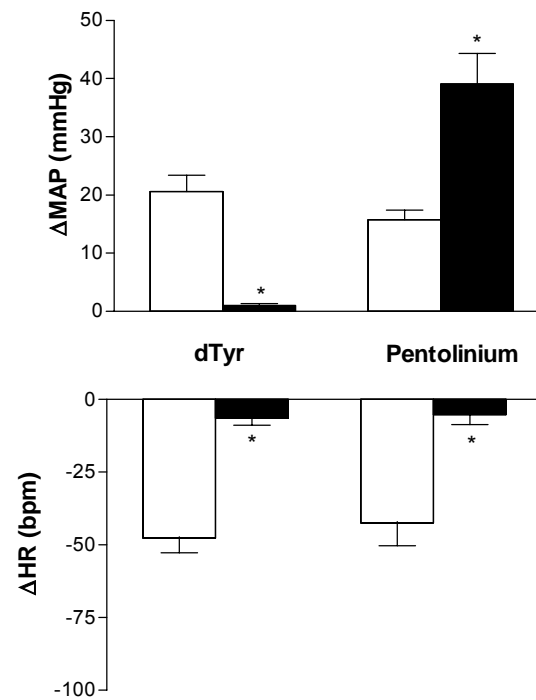


Figure 6 - Mean arterial pressure (Δ PAM) and the heart rate (Δ HR) changes in response to the microinjection of L-glu 10 nmol/ nL in the SON of unanesthetized rats before (open columns) and after (filled columns) i.v. pretreatment with the potent vasopressin antagonist dTyr(CH₂)₅ (Me)AVP (50 μ g/kg) or ganglionic blocker pentolinium. * p<0.05, paired Student's t-test.

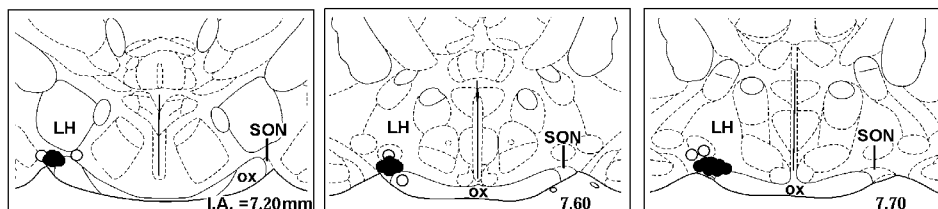


Figure 7 - Diagrammatic representation based on the rat brain atlas of Paxinos and Watson (1986), indicating the dispersion of L-glu injection sites among experiments. Filled circles indicate injection sites in the SON. Open circles indicate injection sites immediately outside the SON. IA - Interaural; SON - supraoptic nucleus; OX - optic chiasm and LH - lateral hypothalamus.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)