

Renato Nery Soriano

**Participação dos receptores ionotrópicos
purinérgicos e glutamatérgicos na
neurotransmissão do quimiorreflexo no NTS
caudal na preparação coração-tronco cerebral
isolados de ratos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo como parte das exigências para a obtenção do Título de Mestre em Fisiologia.

Orientador: Prof. Dr. Benedito Honório Machado

Ribeirão Preto, 2007

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO.....	04
2.OBJETIVOS.....	18
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
3.1. Animais.....	21
3.2. Preparação coração-tronco cerebral isolados (CTCI).....	21
3.2.1. Solução de Perfusão [Fluido cerebrospinal artificial (aCSF) modificado].....	23
3.2.2. Registros da frequência cardíaca e das atividades dos nervos frênico e simpático torácico na preparação CTCL.....	24
3.2.3. Ativação do quimiorreflexo na preparação CTCL.....	25
3.2.4. Microinjeções no NTS caudal na preparação CTCL.....	26
3.3. Soluções e drogas utilizadas.....	28
3.4. Análise dos resultados.....	29
3.5. Análises Histológicas.....	30
3.6. Análise estatística dos resultados.....	30
3.7. Protocolos experimentais.....	31
3.7.1. Curva concentração-efeito do α,β -metileno-ATP microinjetado no NTS caudal.....	31
3.7.1. a. Comparação dos efeitos da microinjeção do α,β -metileno-ATP com os da microinjeção do ATP no NTS caudal.....	32
3.7.1. b. Avaliação dos efeitos da microinjeção de adenosina no NTS caudal.....	32
3.7.2. Determinação da concentração de PPADS efetiva em antagonizar as respostas promovidas pela microinjeção do α,β -metileno-ATP.....	33

3.7.3. Avaliação da possível participação dos receptores P_{2x} na neurotransmissão do quimiorreflexo no NTS caudal.....	34
3.7.4. Avaliação da possível participação dos receptores purinérgicos (P_{2x}) e dos receptores ionotrópicos de aminoácidos excitatórios (AAE) na neurotransmissão do quimiorreflexo no NTS caudal.....	34
4. RESULTADOS.....	35
4.1 - Curva concentração-efeito do α,β -metileno-ATP microinjetado no NTS caudal.....	36
4.1. a - Comparação dos efeitos da microinjeção do α,β -metileno-ATP com os da microinjeção do ATP no NTS caudal.....	40
4.1. b - Avaliação dos efeitos da microinjeção de adenosina no NTS caudal.....	43
4.2 - Determinação da concentração de PPADS efetiva em antagonizar as respostas promovidas pela microinjeção do α,β -metileno-ATP.....	47
4.3 - Avaliação da possível participação dos receptores P_{2x} na neurotransmissão do quimiorreflexo no NTS caudal.....	52
4.4 - Avaliação da possível participação dos receptores purinérgicos (P_{2x}) e dos receptores ionotrópicos de aminoácidos excitatórios (AAE) na neurotransmissão do quimiorreflexo no NTS caudal.....	57
5. DISCUSSÃO.....	64
6. SUMÁRIO.....	86
7. CONCLUSÕES.....	89
8. RESUMO.....	91
9. ABSTRACT.....	94

10. REFERÊNCIAS.....	97
11. APÊNDICE.....	108
12. ANEXO.....	130

Apoio Financeiro

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP

1. INTRODUÇÃO

Os sistemas cardiovascular e respiratório atuam de maneira integrada no sentido de manter adequadamente o suprimento de oxigênio essencial para a sobrevivência das células do organismo. O sistema respiratório viabiliza as trocas gasosas, as quais ocorrem quando das difusões do oxigênio do meio externo para o sangue e do gás carbônico no sentido oposto, enquanto que o sistema cardiovascular, ao promover o deslocamento do sangue pelos vasos e capilares, distribui o oxigênio e as substâncias essenciais para as células e remove das células o gás carbônico e os produtos do metabolismo. Esses sistemas (cardiovascular e respiratório), complexamente integrados entre si, são reflexamente modulados por mecanismos neurais que promovem ajustes compensatórios na dinâmica dos mesmos.

Os mecanismos de controle neural da função cardiovascular asseguram uma adequada distribuição e redistribuição do fluxo sanguíneo para os diferentes territórios vasculares, modulam o bombeamento cardíaco e controlam rapidamente a pressão arterial. Esses mecanismos neurais de controle da circulação, conhecidos como reflexos cardiovasculares, são periféricamente acionados em função de alterações em determinados parâmetros circulatórios, tais como: pressão parcial de oxigênio (PO_2) no sangue arterial; pressão arterial pulsátil; pressão venosa central. Uma vez acionado um determinado reflexo cardiovascular, a informação sensorial alcança o sistema nervoso central trafegando por meio de fibras nervosas que fazem sinapses com neurônios do núcleo do trato solitário (NTS) (Mifflin, 1992; Ciriello e cols., 1994). No NTS e a partir dele a informação sensorial é integrada e induz, em última análise, as respostas apropriadas ao estímulo periférico que a desencadeou.

O NTS localiza-se dorsomedialmente no bulbo e se estende no plano rostrocaudal como duas colunas que se unem na porção mais caudal (Ciriello e cols., 1994). De acordo com sua extensão rostrocaudal, o NTS pode ser subdividido em rostral, intermediário e caudal (Loewy, 1990). Estudos mostraram que as aferências que são estimuladas pelos quimiorreceptores periféricos alcançam principalmente a porção caudal do NTS (Vardhan e cols., 1993; Chitravanshi e cols., 1994).

Os reflexos responsáveis pela homeostase circulatória (reflexos cardiovasculares) são: o barorreflexo (ativado pelo aumento da pressão arterial pulsátil), o reflexo cardiopulmonar (ativado pelo aumento da pressão venosa central) e o quimiorreflexo (ativado pela diminuição da PO_2 no sangue arterial). O barorreflexo, por ser continuamente ativado pelos barorreceptores, regula a pressão arterial (PA) momento a momento, evitando grandes variações. Os barorreceptores são terminações neurais mecanorreceptoras localizadas nas paredes vasculares do arco aórtico e da bifurcação carotídea que são estimuladas pela distensão arterial que ocorre durante cada sístole cardíaca. O reflexo cardiopulmonar é ativado pelos receptores cardiopulmonares, os quais são terminações neurais sensíveis a substâncias como a serotonina e a histamina, e à distensão vascular provocada pelo aumento da volemia. As terminações neurais (receptores cardiopulmonares) que acionam esse reflexo estão localizadas nas paredes do átrio direito, dos ventrículos e da artéria pulmonar. Os corpos celulares (neurônios) das terminações neurais, tanto do barorreflexo quanto do reflexo cardiopulmonar, estão localizados no gânglio nodoso; a outra extremidade axonal desses neurônios do gânglio nodoso faz sinapse com os neurônios do NTS. O nosso laboratório dedica-se

principalmente ao estudo da neurotransmissão dos componentes cardiovascular e respiratório do quimiorreflexo no NTS de ratos.

O quimiorreflexo, diferente dos outros dois reflexos cardiovasculares, é um reflexo emergencial, i.e., ele é ativado apenas em situações extremas, e não continuamente como o barorreflexo ou eventualmente como o reflexo cardiopulmonar. Outra particularidade do quimiorreflexo é a resposta comportamental exploratória, da qual participam áreas hipotalâmicas e corticais, que se caracteriza pela busca angustiante por oxigênio no ambiente em função da sensação da morte iminente. A redução expressiva e abrupta da PO_2 no sangue arterial (hipoxemia), a diminuição do fluxo sanguíneo para as células quimiorreceptoras (células glomus) e a administração intravenosa de cianeto de potássio (KCN) são os estímulos capazes de ativar as células quimiorreceptoras e conseqüentemente o quimiorreflexo. O KCN promove uma hipóxia citotóxica nas células quimiorreceptoras localizadas nos corpúsculos carotídeos, situados bilateralmente na bifurcação da artéria carótida comum (Biscoe e cols., 1967; 1969; Biscoe e Duchon, 1990). Ao inibir a atividade da enzima citocromo oxidase da cadeia respiratória mitocondrial, o KCN induz um padrão de respostas quimiorreflexas semelhante àquele decorrente da hipóxia hipóxica (redução da PO_2 no ar inspirado que leva a uma diminuição da PO_2 sanguínea) (Barros e cols., 2002).

Uma vez acionadas, as células quimiorreceptoras estimulam as terminações periféricas de axônios que fazem sinapses com os neurônios do NTS envolvidos com as vias neurais do quimiorreflexo. Esses axônios compõem o nervo do seio carotídeo (González e cols., 1995) e seus corpos celulares (neurônios) estão localizados no gânglio petroso. A partir dos neurônios do NTS se inicia, então, o processo de integração central

da informação aferente, processo esse que culmina com as respostas cardiovasculares, respiratórias e comportamentais do quimiorreflexo. Participam do processo de integração não apenas os neurônios do NTS, mas também os neurônios de outras áreas centrais (bulbares, pontinas, mesencefálicas, hipotalâmicas e corticais). Estudos de Franchini e Krieger (1993) e de Haibara e cols. (1995) mostraram que a ativação do quimiorreflexo com KCN em ratos não-anestesiados promoveu um aumento na pressão arterial, bradicardia e taquipnéia. Haibara e cols. (1995) mostraram também que o aumento na PA e a bradicardia decorrentes da ativação do quimiorreflexo foram mediados por mecanismos autonômicos (simpático e parassimpático) independentes.

Foi mostrado no estudo de Franchini e Krieger (1993) que os anestésicos pentobarbital e cloralose alteram as respostas cardiovasculares do quimiorreflexo. Esses autores relataram que o anestésico pentobarbital quase aboliu a resposta bradicárdica e, de modo similar ao anestésico cloralose, bloqueou a resposta pressora. Por meio de estudos eletrofisiológicos, Accorsi-Mendonça e cols. (2007) mostraram que o anestésico uretana inibiu a frequência de correntes pós-sinápticas espontâneas GABAérgicas nos neurônios do NTS. Considerando-se, pois, essas evidências relativas aos efeitos centrais dos anestésicos, justifica-se a realização preferencial de estudos cardiovasculares em modelos experimentais nos quais não sejam utilizados anestésicos, especialmente quando se trata de estudos que envolvem múltiplos aspectos integrativos no SNC, como é o caso do quimiorreflexo.

Há evidências na literatura a favor do papel do glutamato como principal neurotransmissor das aferências dos reflexos cardiovasculares no NTS (Gordon e Talmam, 1992; Ciriello e cols., 1994). Mizusawa e cols. (1994) mostraram que ocorreu

um aumento na respiração e nos níveis extracelulares do glutamato no NTS durante a hipóxia sistêmica ou a estimulação dos quimiorreceptores. A microinjeção do glutamato no NTS de ratos não-anestesiados promoveu respostas cardiovasculares (respostas pressora e bradicárdica) semelhantes àquelas decorrentes da ativação do quimiorreflexo (Colombari e cols., 1994). Porém, quanto ao componente respiratório, diferente da resposta taquipnéica à ativação do quimiorreflexo, a microinjeção de AMPA ou NMDA (agonistas de receptores ionotrópicos do glutamato) no NTS caudal de ratos não-anestesiados induziu apnéia (Almado e Machado, 2005) e a microinjeção do glutamato no NTS caudal na preparação coração-tronco cerebral isolados promoveu uma redução na frequência de disparos do nervo frênico (Braga e cols., 2006).

A fim de avaliar se os receptores ionotrópicos do glutamato estariam envolvidos na neurotransmissão dos componentes cardiovascular (simpático e parassimpático) e respiratório do quimiorreflexo no NTS de ratos não-anestesiados, Haibara e cols. (1995) mostraram que apenas o componente parassimpático (bradicardia) do quimiorreflexo no NTS intermediário é mediado por receptores ionotrópicos do glutamato, e que esses receptores são do subtipo NMDA, pois a microinjeção prévia de AP-5 (antagonista seletivo de receptores ionotrópicos do glutamato do subtipo NMDA) produziu uma redução, concentração-dependente, na bradicardia do quimiorreflexo, sem afetar as respostas pressora e taquipnéica desse reflexo.

No intuito de determinar se a resposta pressora do quimiorreflexo seria mediada por receptores do glutamato do subtipo não-NMDA, Haibara e cols. (1999) mostraram que o DNQx (antagonista seletivo de receptores ionotrópicos do glutamato do subtipo não-NMDA) ou o ácido quinurênico (KYN, antagonista não-seletivo de receptores

ionotrópicos do glutamato), quando microinjetado em diferentes sub-regiões do NTS de ratos não-anestesiados, promoveu uma atenuação da resposta pressora do quimiorreflexo. A microinjeção desses antagonistas no NTS promoveu, entretanto, um aumento da pressão arterial média (PAM) basal. Esse aumento, resultante provavelmente de um tônus vascular aumentado decorrente de uma inibição da via simpato-inibitória do barorreflexo, limita a ocorrência de aumentos adicionais. Os autores sugeriram, então, que a atenuação da resposta pressora do quimiorreflexo pode ter ocorrido em função da elevação prévia do tônus vascular gerada por uma maior atividade simpática sobre os vasos de resistência, e que esse aumento da atividade simpática ocorrera após um possível bloqueio da via simpato-inibitória do barorreflexo por parte daqueles antagonistas. Haibara e cols. (1999) também mostraram por meio de microinjeções de MCPG (antagonista seletivo de receptores metabotrópicos do glutamato) no NTS intermediário e caudal que os receptores metabotrópicos do glutamato não estão envolvidos na resposta pressora do quimiorreflexo. Machado e Bonagamba (2005) realizaram experimentos com o objetivo de avaliar se a atenuação da resposta pressora do quimiorreflexo, observada após o bloqueio dos receptores ionotrópicos do glutamato com o ácido quinurênico, tinha ou não sido decorrente do aumento da linha de base da PAM. O aumento da PAM basal que ocorre após a microinjeção do ácido quinurênico no NTS foi, então, normalizado por meio da infusão intravenosa de nitroprussiato de sódio, um doador de óxido nítrico. O óxido nítrico atua como um vasodilatador e, portanto, é capaz de reduzir a PA. O quimiorreflexo foi ativado sob a condição experimental na qual a PA encontrava-se nos seus valores normais; a resposta pressora do quimiorreflexo após a normalização da PA não foi diferente da resposta controle, i.e., da resposta promovida pela ativação do

quimiorreflexo antes da microinjeção do ácido quinurênico. Machado e Bonagamba (2005) concluíram, pois, que a atenuação da resposta pressora do quimiorreflexo, quando das microinjeções do ácido quinurênico no NTS, tinha sido, conforme proposto por Haibara e cols. (1999), decorrente do aumento da PAM basal. Machado e Bonagamba (2005) sugeriram, então, que provavelmente outro neurotransmissor, além do glutamato, poderia estar envolvido na neurotransmissão do componente simpato-excitatório do quimiorreflexo no NTS. Já tinha sido mostrado em outros trabalhos do nosso laboratório que o GABA (Callera e cols., 1997 e 1999), a glicina (Pimentel e cols., 2003), a adenosina (de Paula e Machado, 2001) e a substância P (Zhang e cols., 2000) não estavam envolvidos na neurotransmissão do componente pressor do quimiorreflexo no NTS de ratos não-anestesiados.

Alguns estudos evidenciaram o envolvimento do ATP como um neurotransmissor excitatório liberado por terminais aferentes ou por interneurônios do NTS (Edwards e Gibb, 1993; Ergene e cols., 1994) e como um neurotransmissor ou neuromodulador dos reflexos cardiovasculares nos neurônios do NTS (Ergene e cols., 1994; Barraco e cols., 1996; Scislo e cols., 1997 e 1998; Scislo e O'Leary, 1998). Foi mostrado que os receptores purinérgicos, ativados pelas purinas, ATP e adenosina, são capazes de promover efeitos biológicos (Fredholm, 1995; Burnstock, 1996; Ralevic e Burnstock, 1998; Fagura e cols., 2000). O conceito de neurotransmissão purinérgica foi introduzido por Burnstock (1972). Os receptores purinérgicos foram primeiramente agrupados em duas classes: P_1 e P_2 . Os receptores da classe P_1 são ativados exclusivamente pela adenosina e são subdivididos em 4 tipos: A_1 , A_{2a} , A_{2b} e A_3 . Os receptores da classe P_2 são ativados exclusivamente pelo ATP e são subdivididos em 2 tipos: P_{2x} e P_{2y} . Os receptores

P_{2x} são subdivididos em 7 subtipos (P_{2x1} a P_{2x7}) e ativam canais iônicos (ionotrópicos). Os P_{2y} (metabotrópicos) são subdivididos em 5 subtipos (P_{2y1} , P_{2y2} , P_{2y4} , P_{2y6} e P_{2y11}), estão acoplados a proteína G e operam por meio do inositol trifosfato (Ralevic e Burnstock, 1998). Por meio de métodos imunohistoquímicos foi demonstrada a presença de receptores purinérgicos P_{2x} ao longo de todo o NTS, com uma predominância dos receptores P_{2x2} e P_{2x3} no NTS caudal (Llewellyn-Smith e Burnstock, 1998; Yao e cols, 2001).

Estudos realizados no nosso laboratório, relativos à neurotransmissão purinérgica nos neurônios do NTS de ratos não-anestesiados e ao envolvimento desses receptores com as respostas cardiovasculares do quimiorreflexo, mostraram que microinjeções de adenosina em concentrações crescentes no NTS intermediário promoveram aumentos concentração-dependentes de pequena magnitude e longa duração na PAM, mas não afetaram a frequência cardíaca de ratos não-anestesiados (de Paula e Machado, 2001). Esses autores também mostraram que a microinjeção prévia de DPCPX (antagonista seletivo dos receptores A_1 da adenosina) no NTS reduziu significativamente a resposta pressora promovida pela microinjeção da adenosina; porém, esse antagonista não promoveu alterações significativas nas respostas cardiovasculares do quimiorreflexo, sugerindo que a adenosina e os seus receptores A_1 não participam da neurotransmissão do componente simpato-excitatório do quimiorreflexo no NTS intermediário.

Considerando, então, que a adenosina não participa da neurotransmissão do quimiorreflexo, de Paula e cols. (2004) estudaram a participação dos receptores P_2 (ativados pelo ATP) nos neurônios do NTS, aplicando microinjeções do ATP em concentrações crescentes no NTS intermediário de ratos não-anestesiados. Essas

microinjeções do ATP promoveram respostas pressoras dependentes da concentração e resposta bradicárdica, por mecanismos autonômicos independentes, que foram semelhantes às decorrentes da ativação do quimiorreflexo com KCN. Essas respostas cardiovasculares desencadeadas pela microinjeção do ATP no NTS intermediário não foram decorrentes da catabolização do ATP em adenosina, e a conseqüente ativação dos receptores A₁ pela adenosina, pois o antagonismo desses receptores com DPCPX, antagonista seletivo de receptores da adenosina do tipo A₁, não alterou as respostas promovidas pela microinjeção do ATP.

Conforme mencionado, a ativação do quimiorreflexo, além de promover ajustes cardiovasculares, também promove respostas respiratórias. Considerando os efeitos das microinjeções do ATP no NTS intermediário sobre os parâmetros cardiovasculares, Antunes e cols. (2005a) passaram a avaliar, além das respostas cardiovasculares, também as respostas respiratórias decorrentes da microinjeção do ATP, e não somente no NTS intermediário, mas também no NTS caudal de ratos não-anestesiados. A microinjeção do ATP no NTS intermediário promoveu apnéia e respostas pressora e bradicárdica. Respostas pressora, bradicárdica e taquipnéica foram promovidas quando da microinjeção do ATP no NTS caudal. Comparando-se os efeitos cardiovasculares e respiratórios causados pela ativação do quimiorreflexo com aqueles promovidos pelas microinjeções do ATP no NTS caudal, Antunes e cols. (2005a) observaram que a resposta taquipnéica deflagrada pela ativação quimiorreflexa foi de magnitude semelhante àquela decorrente da microinjeção do ATP no NTS caudal. Além disso, a microinjeção do ATP no NTS caudal de ratos não-anestesiados promoveu uma resposta pressora de magnitude semelhante àquela promovida quando da ativação do

quimiorreflexo. Além desses achados em ratos não-anestesiados, Antunes e cols. (2005b) avaliaram na preparação coração-tronco cerebral isolados (CTCI), uma abordagem experimental que possibilita o registro direto das atividades dos nervos frênico e simpático, os efeitos da microinjeção do ATP em concentrações crescentes no NTS caudal. Os resultados obtidos na preparação CTCI após as microinjeções do ATP no NTS caudal foram: redução da frequência cardíaca; aumento concentração-dependente da atividade do nervo frênico; e nenhuma alteração da atividade do nervo simpático torácico.

A preparação CTCI, desenvolvida por Paton (1996), consiste numa preparação *‘in situ’* do coração e do tronco cerebral, na qual podem ser feitos registros diretos dos nervos simpático (torácico) e frênico. Uma das vantagens de se registrar diretamente a atividade simpática, ao invés do registro da PA, pode ser justificada pelo fato que durante os registros da PA a linha de base desse parâmetro pode se alterar após a microinjeção de determinados antagonistas que podem influenciar as vias neurais do barorreflexo no NTS (Haibara e cols., 1999; Machado e Bonagamba, 2005), dificultando as análises e a interpretação dos resultados relativos à neurotransmissão do componente simpato-excitatório do quimiorreflexo nesse núcleo. Pelo fato da preparação CTCI ser perfundida, por meio de uma bomba, a uma pressão média de 65 mmHg, de caráter não-pulsátil, os barorreceptores encontram-se inativos nessa abordagem experimental; desse modo, não ocorrem possíveis influências do barorreflexo sobre a resposta simpato-excitatória do quimiorreflexo. A resposta simpato-excitatória do quimiorreflexo observada na preparação CTCI revela que a atividade simpática não é máxima nessa abordagem experimental apesar da inativação do barorreflexo. A preparação CTCI, por ser uma

preparação na qual o animal é descerebrado ao nível pré-colicular, não requer o uso de anestésicos durante os experimentos, assim como os estudos realizados em animais não-anestesiados. Uma outra vantagem da preparação CTCI deve-se ao fato da superfície dorsal do bulbo ficar exposta, facilitando o acesso das microinjetoras, aumentando o índice de acerto das microinjeções, especialmente considerando-se as porções mais caudais do NTS, primordialmente envolvidas com a neurotransmissão do quimiorreflexo (Vardhan e cols., 1993; Chitravanshi e cols., 1994; Chitravanshi e Sapru, 1995).

Uma vez que a microinjeção do ATP no NTS caudal promoveu efeito taquipnéico e pressor em ratos não-anestesiados (Antunes e cols., 2005a) e aumento da atividade do nervo frênico na preparação CTCI (Antunes e cols., 2005b), sendo esses efeitos, em ambos os estudos, semelhantes àqueles decorrentes da ativação do quimiorreflexo, os autores sugeriram, então, a importância de se avaliar 1) um possível papel do ATP e dos seus receptores P_2 na neurotransmissão do quimiorreflexo no NTS caudal; e, em função dos achados de Machado e Bonagamba (2005) e de evidências na literatura (Scislo e O'Leary, 2000; Kato e Shigetomi, 2001; de Paula e cols., 2004; Jin e cols., 2004; Shigetomi e Kato, 2004), 2) uma possível interação entre o glutamato e o ATP nos complexos mecanismos envolvidos nas respostas simpática e respiratória deflagradas pela ativação quimiorreflexa.

A interação entre os efeitos da estimulação seletiva de sub-tipos de receptores purinérgicos e os mecanismos ionotrópicos glutamatérgicos no NTS caudal foi primeiramente estudada por Scislo e O'Leary (2000). Foi mostrado no estudo de de Paula e cols. (2004) que a resposta bradicárdica decorrente da microinjeção de ATP no NTS intermediário foi atenuada pelo ácido quinurênico (antagonista não-seletivo de receptores

ionotrópicos do glutamato). Existem algumas evidências mostrando que a liberação do glutamato no NTS pode ser estimulada ou inibida pelo ATP. Após a catabolização do ATP, a adenosina resultante desse processo, ao atuar pré-sinápticamente nos seus receptores A_1 , inibiu a liberação do glutamato, enquanto que a liberação do glutamato, por outro lado, pôde ser estimulada pelo efeito do ATP atuando pré-sinápticamente nos seus receptores P_{2x} (Kato e Shigetomi, 2001). Jin e cols. (2004) mostraram que a ativação seletiva dos receptores purinérgicos P_{2x} pelo α,β -metileno-ATP (agonista seletivo dos receptores P_{2x}) nos neurônios do NTS caudal facilitou a liberação pré-sináptica do glutamato; essa liberação recrutou um mecanismo dependente de canais de Ca^{+2} nos neurônios do NTS (Shigetomi e Kato, 2004).

Considerando que 1) o componente simpato-excitatório do quimiorreflexo não é atenuado pelo antagonismo dos receptores ionotrópicos e/ou metabotrópicos do glutamato (Haibara e cols., 1999; Machado e Bonagamba, 2005; Braga e Machado, 2006); 2) ocorre uma interação entre o ATP e o glutamato nos neurônios do NTS caudal (Kato e Shigetomi, 2001; Shigetomi e Kato, 2004; Jin e cols., 2004); e 3) a microinjeção do ATP no NTS caudal promove respostas pressora e taquipnéica semelhantes àsquelas do quimiorreflexo (Antunes e cols., 2005a; 2005b), a hipótese do presente trabalho foi a seguinte: o ATP atuando sobre os receptores P_{2x} e interagindo com o glutamato estaria envolvido na neurotransmissão dos componentes simpato-excitatório e respiratório do quimiorreflexo no NTS caudal.

No estudo de Braga e Machado (2006) foi testado o envolvimento dos receptores ionotrópicos do glutamato na neurotransmissão do quimiorreflexo no NTS caudal na preparação CTCL. Para tanto, naquele trabalho, o quimiorreflexo foi ativado antes e 2, 10,

30 e 45 minutos após microinjeções do antagonista seletivo de receptores ionotrópicos do glutamato, ácido quinurênico (KYN), no NTS caudal. A microinjeção do KYN no NTS caudal na concentração 250 mM, testada frente às ativações do quimiorreflexo no estudo de Braga e Machado (2006), tinha sido efetiva em antagonizar os efeitos promovidos pela microinjeção do glutamato numa concentração capaz de promover aproximadamente 50% da resposta máxima desse agonista (Braga e cols., 2006). Como mencionado no parágrafo anterior, o antagonismo dos receptores ionotrópicos do glutamato com o KYN no NTS caudal não afetou a resposta simpato-excitatória do quimiorreflexo. Portanto, uma vez que já havia sido mostrado que apenas o bloqueio dos receptores ionotrópicos glutamatérgicos não interfere na neurotransmissão do quimiorreflexo no NTS caudal na preparação CTCI (Braga e Machado, 2006), não foi avaliado no presente trabalho o efeito da ativação do quimiorreflexo antes e após a microinjeção do KYN. Vale salientar que no nosso protocolo relativo ao efeito do duplo bloqueio, i.e., bloqueio simultâneo dos receptores ionotrópicos purinérgicos e glutamatérgicos, sobre a neurotransmissão do quimiorreflexo no NTS caudal o KYN foi testado na concentração 250 mM; concentração essa que foi efetiva em antagonizar os efeitos promovidos pela microinjeção do glutamato (Braga e cols., 2006).

2. OBJETIVOS

Avaliar o envolvimento dos receptores P_{2x} e o efeito do bloqueio simultâneo dos receptores ionotrópicos purinérgicos (P_{2x}) e glutamatérgicos sobre a neurotransmissão dos componentes simpato-excitatório e respiratório do quimiorreflexo no NTS caudal na preparação coração-tronco cerebral isolados de ratos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1) Animais

Neste trabalho foram utilizados ratos Wistar machos (70-90g) fornecidos pelo Biotério Central do câmpus da USP de Ribeirão Preto-SP. Esses animais foram mantidos sob condições controladas de temperatura e umidade e sob ciclo claro-escuro de 12 horas no biotério de manutenção do Departamento de Fisiologia e alimentados com ração granulada e água de torneira *ad libitum*. Os experimentos foram conduzidos de acordo com as normas e princípios éticos de experimentação em animais de laboratório estabelecidos pelo Comitê Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e aprovados pela Comissão de Ética para a Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

3.2) Preparação Coração-Tronco cerebral isolados

Todos os experimentos deste trabalho foram realizados na preparação coração-tronco cerebral isolados (CTCI) (“working heart-brainstem preparation” - WHBP) descrita por Paton (1996). Para a obtenção da preparação CTCI os animais foram submetidos a um procedimento cirúrgico que era iniciado após a anestesia dos mesmos por meio da inalação de halotano (AstraZeneca do Brasil Ltda, Cotia, SP, Brasil) em uma câmara previamente saturada com esse anestésico de ação fugaz. Os animais foram hemiseccionados sub-diafragmaticamente, e a cabeça e o tórax imersos em uma solução de aCSF (ver item 3.2.1), gelada e aerada com carbogênio (95% O₂ e 5% de CO₂),

acondicionada em uma cuba de vidro em contato com gelo, na qual era feita a descerebração ao nível pré-colicular e a remoção total da pele. Em uma placa de Petri 1) os pulmões foram retirados; 2) a aorta descendente (para posterior canulação) e o nervo frênico (seccionado na base do diafragma) foram isolados; 3) toda a parte dorsolateral esquerda do tórax foi removida, por meio de um corte paralelo às vértebras torácicas, para possibilitar o acesso ao nervo simpático torácico; e 4) a superfície dorsal do tronco cerebral foi exposta após a remoção do osso occipital, da duramáter e do cerebelo. A perfusão foi iniciada após esses procedimentos cirúrgicos, os quais duravam em média 11 minutos. A preparação foi imediatamente transferida para uma câmara de registros, onde a aorta descendente foi canulada ao nível torácico inferior, para ser perfundida retrogradamente com aCSF-modificado (ver item 3.2.1). A perfusão era realizada por meio de uma bomba (Watson-Marlow 505S, Falmouth, Inglaterra) que proporcionava um fluxo médio de 32 ml/min, o qual induzia a geração de uma pressão de perfusão média de 65 mmHg para que o tronco cerebral e coração fossem perfundidos adequadamente. Retentores de bolhas acoplados ao sistema de perfusão impediam que bolhas de ar alcançassem a preparação e amorteciam as eventuais pulsações geradas pela bomba. A solução de perfusão (aCSF-modificado; 200 ml) era continuamente aerada com carbogênio e aquecida por um trocador de calor a uma temperatura de aproximadamente 32°C. Como a solução de perfusão recirculava pelo sistema durante todo o experimento, filtros de polipropileno (25 mm de diâmetro, formado por poros de 25 µm de diâmetro - Millipore, PP25) acoplados ao sistema de perfusão impediam que coágulos sanguíneos e restos de tecidos em suspensão alcançassem a preparação.

A figura 1 (pág. 27) esquematiza o sistema de perfusão, a localização do NTS caudal, e os registros que são obtidos a partir dessa abordagem experimental. Todos os tubos do sistema eram impermeáveis ao O₂ e ao CO₂ (Tygon Cole Palmer, ID: 1,56 mm; OD: 4,7 mm). A porção final do tubo estava conectada a uma cânula de duplo lúmen (Portex: ID: 0,28mm; OD: 0,61 mm), sendo um lúmen para a perfusão e o outro para o registro da pressão de perfusão (PP). Essa cânula estava conectada a um transdutor de pressão (PT 300, Grass Telefactor, West Warwick, RI, USA), de onde os sinais eram conduzidos para um amplificador (Model 15A12 DC/AC Strain Gage Amplifier; Grass Telefactor, West Warwick, RI, USA). Esses sinais referentes à PP eram, então, enviados desse amplificador para um computador, no qual encontrava-se instalado o programa 'Spike 2' (Cambridge Eletronic Design, Cambridge, Reino Unido), para a visualização e o monitoramento dos níveis dessa pressão durante todo o experimento.

3.2.1) Solução de Perfusão [Fluido cerebroespinal artificial (aCSF) modificado]

A solução artificial (aCSF-modificado) usada para perfundir a preparação CTCl substitui o sangue e mantém a preparação viável durante todo o experimento. O aCSF-modificado é uma solução de sais e glicose - 125 mM de NaCl; 24 mM de NaHCO₃; 5 mM de KCl; 2,5 mM de CaCl₂; 1,25 mM de MgSO₄; 1,25 mM de KH₂PO₄; e 3,6 g de glicose - cujo solvente é a água deionizada, acrescida de Ficoll 70 (agente oncótico, 1.25%, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e brometo de vecurônio (droga bloqueadora da transmissão neuromuscular, 0,04 µg/ml, Organon do Brasil, São Paulo, SP, Brasil). O

brometo de vecurônio foi usado para impedir os movimentos de expansão da caixa torácica, os quais ocorrem na fase inspiratória do ciclo respiratório. Esses movimentos comprometem a dissecação, a captação e o registro do nervo simpático torácico. Durante todo o período de perfusão, o aCSF-modificado era aerado com uma mistura carbogênica (95% de O₂ e 5% de CO₂) para fornecer O₂ à solução e manter o pH entre 7,0 e 7,4.

O fluido cerebrospinal artificial (aCSF) sem a adição do Ficoll e do brometo de vecurônio foi usado apenas durante o procedimento cirúrgico (ver item 3.2).

3.2.2) Registros da frequência cardíaca e das atividades dos nervos frênico e simpático torácico na preparação CTCI

Na câmara de registros, o nervo frênico foi introduzido por sucção em um eletrodo monopolar de vidro (micropipeta de vidro com diâmetro de 0,2 - 0,3 mm contendo um fio de prata no seu interior) para o registro de seus potenciais. Esse eletrodo estava conectado a um pré-amplificador (INSIGHT Equipamentos Científicos, Ribeirão Preto, SP, Brasil), que por sua vez enviava sinais para um amplificador (INSIGHT Equipamentos Científicos, Ribeirão Preto, SP, Brasil). A partir do amplificador, os sinais eram convertidos de analógicos para digitais por uma unidade conversora analógico-digital CED 1401 (Cambridge Eletronic Design, Cambridge, Reino Unido). O sinal era, então, enviado dessa unidade para o computador, onde era processado pelo programa Spike 2 (Cambridge Eletronic Design, Cambridge, Reino Unido). Os potenciais do nervo frênico foram adquiridos numa frequência de amostragem de 5000 Hz e foram analisados

'off-line' por meio do programa Spike 2. O eletrocardiograma (ECG) era obtido simultaneamente com os registros da atividade do nervo frênico. Por meio de um biotacômetro digital, o programa Spike 2, ao derivar os batimentos cardíacos a partir das ondas R do eletrocardiograma, determinava 'off-line' a frequência cardíaca.

Mediante dissecação da cadeia simpática torácica paravertebral, entre os níveis T5 e T10 da medula espinhal, um nervo eferente simpático era isolado, seccionado e introduzido por sucção em um eletrodo bipolar de vidro conectado a um pré-amplificador conectado a um amplificador (ambos foram fabricados na Universidade de Bristol, Inglaterra). Os sinais relativos à frequência de despolarização do nervo eferente simpático torácico foram conduzidos do amplificador para o computador, onde foram registrados e analisados. Os potenciais do nervo simpático torácico foram adquiridos numa frequência de amostragem de 10000 Hz e foram analisados 'off-line' por meio do programa Spike 2

3.2.3) Ativação do Quimiorreflexo

O cianeto de potássio (KCN 0,05%) foi administrado, via aorta descendente, com uma seringa que estava acoplada ao sistema de perfusão. O KCN promove uma hipóxia citotóxica nas células quimiorreceptoras do corpúsculo carotídeo, gerando ativação do quimiorreflexo. As respostas decorrentes da ativação do quimiorreflexo, diminuição na frequência cardíaca, aumento na frequência de disparos dos nervos frênico e simpático, foram registradas e posteriormente analisadas.

3.2.4) Microinjeções no NTS caudal na preparação CTCI

No presente trabalho todas as microinjeções foram aplicadas com micropipetas de vidro do tipo ‘multibarrel’, confeccionadas em nosso laboratório, conectadas a uma bomba (PICOSPRITZER II – Parker Hannifin Corporation, General Valve Division, Fairfield, NJ, USA) que permite a microinjeção de drogas por meio de pulsos de pressão. As micropipetas do tipo ‘multibarrel’ apresentam 3 vias de entrada e uma via de saída comum. Assim, é possível microinjetar 3 tipos diferentes de drogas exatamente num mesmo sítio de microinjeção, bastando-se, para isso, apenas alterar a conexão entre a mangueira da bomba e a via de entrada da micropipeta. A bomba (‘Picospritzer II’) foi calibrada para que o volume microinjetado fosse sempre de aproximadamente 20 nl. O sítio das microinjeções no NTS caudal foi determinado com auxílio das coordenadas estereotáxicas de Paxinos e Watson (AP = - 0,3; L = 0,3; DV = 0,4 mm) em relação ao *calamus scriptorius*, o qual era visualmente identificado com o auxílio de uma lupa estereoscópica (Zeiss). O pH das soluções microinjetadas foi ajustado com bicarbonato de sódio (Reagen, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) para valores próximos a 7,4.

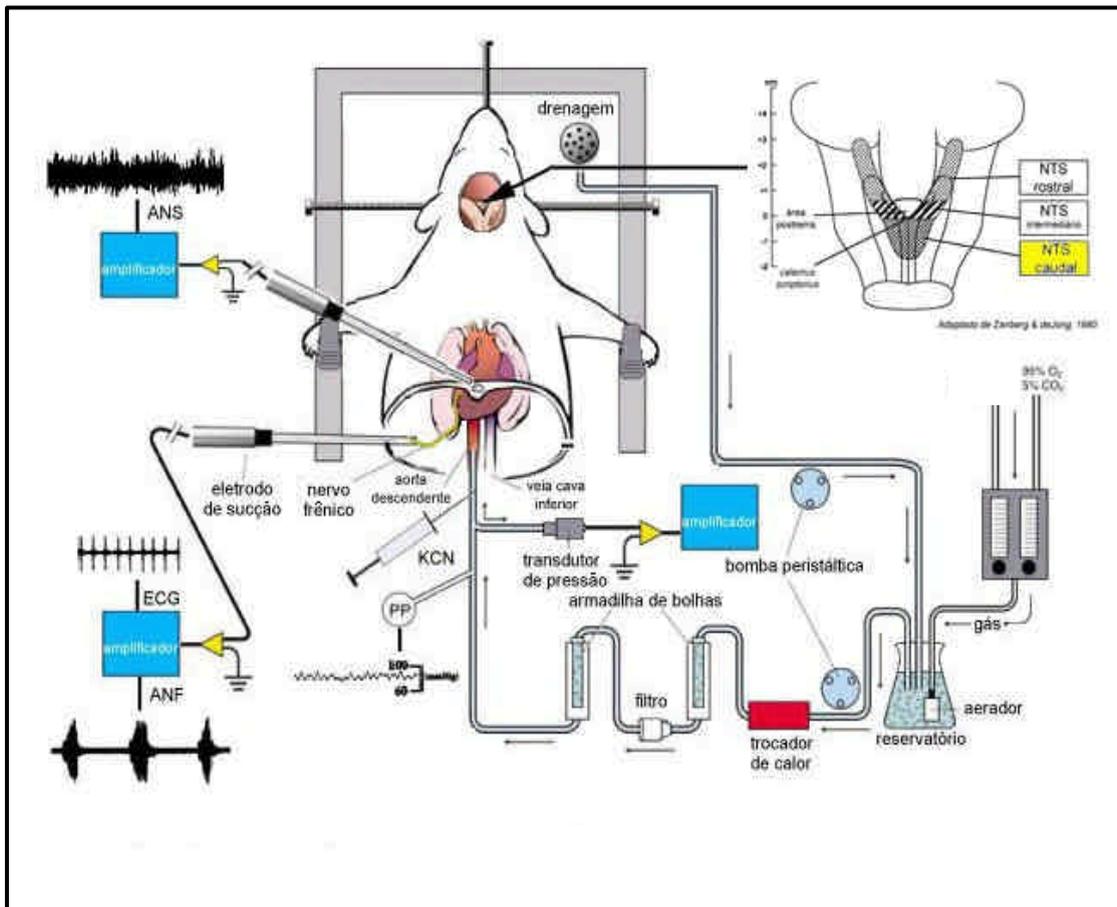


Figura 1: Desenho esquemático do sistema de perfusão da preparação coração-tronco cerebral isolados (CTCI) e da localização do NTS caudal. ANF: atividade do nervo frênico; ECG: eletrocardiograma; PP: pressão de perfusão; ANS: atividade do nervo simpático; NTS: núcleo do trato solitário (Modificado de Potts e cols., 2000).

3.3) Soluções e drogas utilizadas

-  **-metileno-ATP** - Agonista sintético seletivo de receptores purinérgicos P_{2x}

(Sigma Chemical, St. Louis, MO, EUA);

- **ATP** - Agonista de receptores purinérgicos P₂

(Sigma Chemical, St. Louis, MO, EUA);

-  **denosina** - Agonista de receptores purinérgicos P₁

(RBI, Natick, MA, EUA);

- **Ácido L-glutâmico monossódico (glutamato)** - Aminoácido excitatório (AAE),

agonista de receptores de AAE (Sigma Chemical, St. Louis, MO, EUA);

- **Pyrinoxalphosphate-6-azophenil-2',4'-disulphonic acid tetrasodium salt (PPADS)** -

antagonista seletivo de receptores purinérgicos P_{2x} (Sigma Chemical, St. Louis, MO, EUA);

- **Ácido Quinurênico (KYN)** - Antagonista não-seletivo de receptores ionotrópicos de

AAE (Sigma Chemical, St. Louis, MO, EUA);

- **Cianeto de Potássio (KCN)** - Para a ativação do quimiorreflexo

(Sigma Chemical, St. Louis, MO, EUA);

- **Brometo de Vecurônio** (0,4 mg/ml) – bloqueador da transmissão neuromuscular (Organon do Brasil, São Paulo, SP, Brasil);
- **Solução Salina** (NaCl 0,9%) - usada como veículo;
- **aCSF** - usado como veículo da adenosina.

3.4) Análise dos resultados

Conforme mencionado, as análises dos nervos frênico e simpático e da frequência cardíaca foram feitas 'off-line' por meio do programa Spike 2. A integração dos registros dos nervos frênico e simpático foi feita a uma janela de tempo de 100 ms. A quantificação das alterações na frequência de despolarização do nervo frênico (análise temporal), expressa em gráficos de linha, foi realizada a cada 10 segundos, sendo iniciada 40 segundos antes e finalizada 50 segundos após os tratamentos. Também foi realizada uma análise do pico da resposta da atividade do nervo frênico ao se considerar a diferença na frequência de despolarização desse nervo 10 segundos antes e 10 segundos após os tratamentos. Uma vez que foram utilizados eletrodos de sucção monopolares para se registrar os potenciais do nervo frênico, não foi possível considerar e quantificar a amplitude dos disparos, pois essa depende da qualidade do selo que se estabelece entre o nervo e a ponta do eletrodo. Sendo assim, apenas as variações da frequência (expressas como Δ Hz) de despolarização do nervo frênico foram quantificadas.

A atividade do nervo simpático torácico, cujos valores foram normalizados e expressos como valores percentuais (Δ %), foi integrada e avaliada 20 segundos antes e 20 segundos após os tratamentos. O valor do pico da resposta após os tratamentos foi quantificado.

Quanto à frequência cardíaca - expressa em variações dos batimentos cardíacos por minuto (Δ bpm) - derivada 'off-line' a partir do ECG, foram consideradas as diferenças entre os valores basais e os valores pós-tratamentos.

3.5) Análises Histológicas

Após os experimentos, os troncos cerebrais foram removidos e imersos em formalina 10% para fixação por pelo menos uma semana. Lâminas histológicas foram em seguida preparadas (inserção dos troncos cerebrais em blocos de parafina, cortados em fatias de 16 μ m de espessura) e coradas pelo método de Nissl. Apenas os ratos nos quais as microinjeções atingiram o NTS caudal foram considerados nas análises. Todas as microinjeções foram realizadas em relação ao *calamus scriptorius* nas seguintes coordenadas: AP= -0,3, DV= 0,4 e L= 0,3 mm.

3.6) Análise estatística dos resultados

Os resultados estão expressos como média \pm EPM (erro padrão da média). À exceção da análise temporal da atividade do nervo frênico, na qual foi aplicada a análise de variância para medidas repetidas (ANOVA Two-way) seguida pelo pós-teste de Bonferroni, a análise de variância para medidas repetidas (ANOVA One-way) foi aplicada aos dados obtidos e o pós-teste de Tukey pareado para múltiplas comparações foi utilizado quando houve diferença estatística. O nível de significância estabelecido em todos os casos foi $p = 0,05$ bicaudal.

3.7) Protocolos experimentais

3.7.1. Curva concentração-efeito do α,β -metileno-ATP microinjetado no NTS caudal

Obs.: As doses equivalentes às concentrações das drogas testadas estão indicadas no Anexo, pág. 131.

Este protocolo foi realizado a fim de se determinar, a partir da curva concentração-efeito, a concentração do α,β -metileno-ATP capaz de promover uma resposta correspondente a aproximadamente 50% da resposta máxima produzida, considerando-se os três parâmetros registrados, por esse agonista seletivo de receptores P_{2x} . Para tal finalidade, foram realizadas microinjeções do α,β -metileno-ATP em concentrações crescentes (10, 25, 50, 100 e 200 mM; doses indicadas no Anexo, pág. 131). As microinjeções do α,β -metileno-ATP nas diferentes concentrações ou do seu veículo (solução salina; NaCl 0,9%) foram realizadas em seqüência aleatória e espaçadas entre si por intervalos de aproximadamente 15 minutos. No máximo 3 microinjeções (20 nl cada) foram testadas em cada lado do NTS caudal. A concentração do α,β -metileno-ATP capaz

de promover uma resposta correspondente a aproximadamente 50% da resposta máxima foi 50 mM (dose: 1 nmol / 20 nl).

3.7.1. a. Comparação dos efeitos da microinjeção do α,β -metileno-ATP com os da microinjeção do ATP no NTS caudal

A necessidade da realização deste protocolo surgiu em função da disparidade das respostas promovidas pelas microinjeções unilaterais de α,β -metileno-ATP no NTS caudal observadas neste trabalho em relação às respostas promovidas por microinjeções unilaterais de ATP no NTS caudal encontradas na literatura (Antunes e cols., 2005b). Neste protocolo, portanto, foram comparadas as respostas às microinjeções unilaterais de α,β -metileno-ATP (50 mM) com as respostas promovidas por microinjeções contralaterais e unilaterais de ATP (25 mM; determinada nos estudos de Antunes e cols., 2005b) no NTS caudal de um mesmo animal. As microinjeções foram realizadas aleatoriamente tanto em seqüência quanto em relação ao lado do NTS caudal. Uma determinada microinjeção do α,β -metileno-ATP foi, por exemplo, realizada no lado direito do NTS caudal e uma microinjeção do ATP foi, então, realizada - aproximadamente 15 minutos depois - quando a micropipeta foi deslocada contralateralmente (lado esquerdo) e inserida no NTS.

3.7.1. b. Avaliação dos efeitos da microinjeção de adenosina no NTS caudal

Este protocolo foi realizado devido às diferenças que foram observadas - no protocolo anterior (ver item 3.7.1. a) - entre as respostas promovidas pelas microinjeções unilaterais do α,β -metileno-ATP e do ATP, no NTS caudal de um mesmo animal, sobre a

atividade do nervo frênico. Com a finalidade de se determinar se os efeitos observados quando das microinjeções unilaterais do ATP (25 mM) no NTS caudal eram decorrentes da degradação do ATP em adenosina, microinjeções unilaterais de adenosina (35 mM) foram feitas no NTS caudal. Vale ressaltar que as tais microinjeções unilaterais de adenosina no NTS caudal foram realizadas apenas após microinjeção prévia do glutamato. Uma vez que as respostas promovidas pela microinjeção unilateral do glutamato (250 mM) no NTS caudal já eram conhecidas na preparação CTCl (Braga e cols., 2006) e as possíveis respostas à adenosina não, a microinjeção do glutamato serviu como indício da localização funcional do sítio para microinjeção no NTS caudal e foi realizada aproximadamente 15 minutos antes da microinjeção de adenosina. As microinjeções de adenosina, do seu veículo (aCSF) ou do glutamato foram aplicadas com as micropipetas ‘multibarrels’, assim como todas as demais microinjeções no presente trabalho, de modo que era possível microinjetar adenosina exatamente no mesmo sítio onde se aplicou a microinjeção de glutamato, bastando-se, para isso, apenas alterar a conexão entre a mangueira da bomba (‘Picospritzer II’) e a entrada da micropipeta, conforme mencionado no item 3.2.4.

3.7.2. Determinação da concentração de PPADS efetiva em antagonizar as respostas promovidas pela microinjeção do α,β -metileno-ATP

A finalidade da realização deste protocolo foi estabelecer a concentração do antagonista seletivo de receptores purinérgicos P_{2x} (PPADS) efetiva em antagonizar as respostas promovidas pela microinjeção unilateral de α,β -metileno-ATP (50 mM). Sendo assim, foram realizadas microinjeções unilaterais de α,β -metileno-ATP no NTS caudal antes e 2, 10, 30 e 45 minutos após o bloqueio dos receptores purinérgicos com PPADS.

PPADS foi inicialmente microinjetado unilateralmente na concentração 10 mM e em seguida na concentração 20 mM (dose: 0,4 nmol / 20 nl).

3.7.3. Avaliação da possível participação dos receptores P_{2x} na neurotransmissão do quimiorreflexo no NTS caudal

Para se avaliar a possível participação dos receptores purinérgicos ionotrópicos P_{2x} na neurotransmissão do quimiorreflexo no NTS caudal, o quimiorreflexo foi ativado, com injeção de KCN (0,05%) no sistema de perfusão, antes e 2, 10, 30 e 45 minutos após o bloqueio dos receptores purinérgicos P_{2x} realizado por meio de microinjeções bilaterais de PPADS (20 mM). PPADS na concentração 20 mM tinha sido capaz de atenuar as respostas promovidas pelas microinjeções unilaterais do α,β -metileno-ATP (50 mM) no NTS caudal.

3.7.4. Avaliação da possível participação dos receptores purinérgicos P_{2x} e dos receptores ionotrópicos de aminoácidos excitatórios (AAE) na neurotransmissão do quimiorreflexo no NTS caudal

Neste último protocolo foi avaliada uma possível participação do ATP e do glutamato (AAE) na neurotransmissão do quimiorreflexo no NTS caudal por meio da ativação do quimiorreflexo antes e 2, 10, 30, 45 e 60 min após microinjeções bilaterais de ácido quinurênico (KYN, 250 mM; dose: 5 nmol / 20 nl) e de PPADS (20 mM; dose: 0,4 nmol / 20 nl) no NTS caudal. Num mesmo sítio do NTS caudal, e no seu respectivo sítio contralateral, microinjeções seqüenciais dos dois antagonistas, KYN e PPADS, foram aplicadas.

4. RESULTADOS

4.1. Curva concentração-efeito do α,β -metileno-ATP microinjetado no NTS caudal

A figura 2 ilustra traçados de uma preparação CTCl, representativa do grupo, mostrando os registros da frequência cardíaca (FC), da atividade integrada do nervo frênico (?ANF), da atividade integrada do nervo simpático torácico (?ANSt) e o registro original do nervo simpático torácico (ANSt). Podemos observar nos traçados que a microinjeção unilateral de α,β -metileno-ATP (50mM) no NTS caudal promoveu uma redução na frequência cardíaca (bradicardia), uma redução na atividade do nervo frênico e um aumento na atividade do nervo simpático torácico (simpato-excitação). A figura 3 representa graficamente o conjunto dos resultados mostrando os efeitos concentração-dependentes decorrentes de microinjeções unilaterais de concentrações crescentes de α,β -metileno-ATP no NTS caudal. As microinjeções de α,β -metileno-ATP nas concentrações 10, 25, 50, 100 e 200 mM promoveram, respectivamente, diminuição de -4 ± 2 , -18 ± 9 , -47 ± 14 , -57 ± 9 e -62 ± 10 batimentos por minuto (bpm) na frequência cardíaca; redução de $-0,07\pm 0,03$, $-0,14\pm 0,07$, $-0,31\pm 0,03$, $-0,4\pm 0,09$ e $-0,4\pm 0,03$ Hz na ANF; e aumento na atividade simpática de 3 ± 1 , 13 ± 7 , 23 ± 6 , 30 ± 6 e $32\pm 6\%$. A figura 4 ilustra uma avaliação no domínio do tempo das alterações na frequência de despolarização do nervo frênico frente às microinjeções de concentrações crescentes α,β -metileno-ATP no NTS caudal. Os valores individuais da ANF, da FC e da ANSt em resposta às microinjeções de α,β -metil-ATP e de salina estão apresentados nas tabelas 1, 2 e 3 do apêndice.

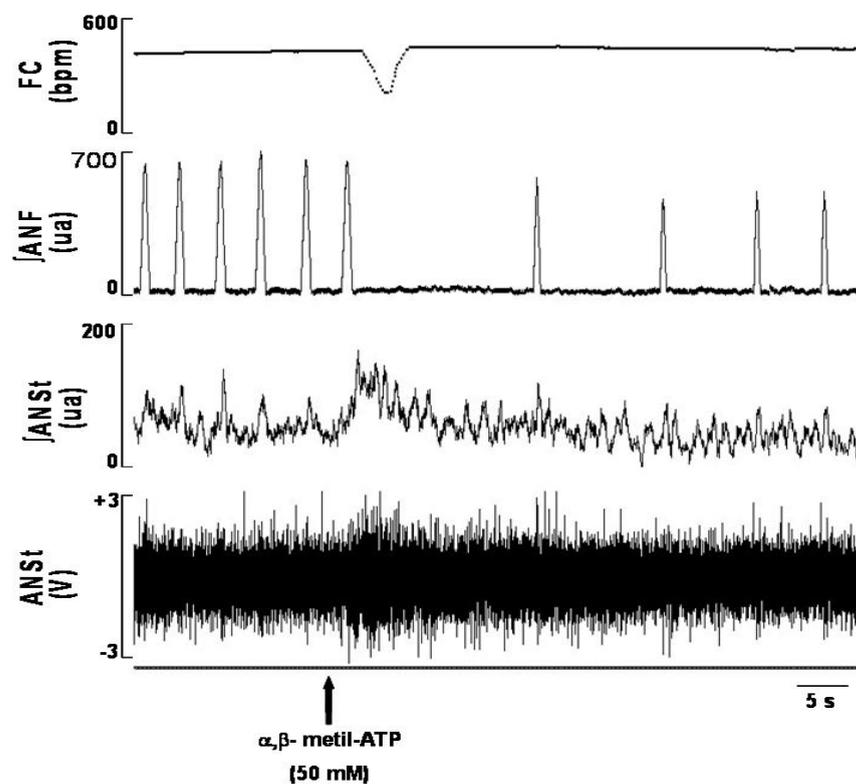


Figura 2: Traçados representativos de uma preparação CTCI mostrando a frequência cardíaca (FC), a atividade integrada do nervo frênico (iANF), a atividade integrada do nervo simpático torácico (iANSt) e o seu registro original (ANSt), bem como os efeitos de uma microinjeção unilateral de α,β -metileno-ATP (50 mM) no NTS caudal sobre esses parâmetros. (bpm: batimentos por minuto; ua: unidades arbitrárias; v: volts).

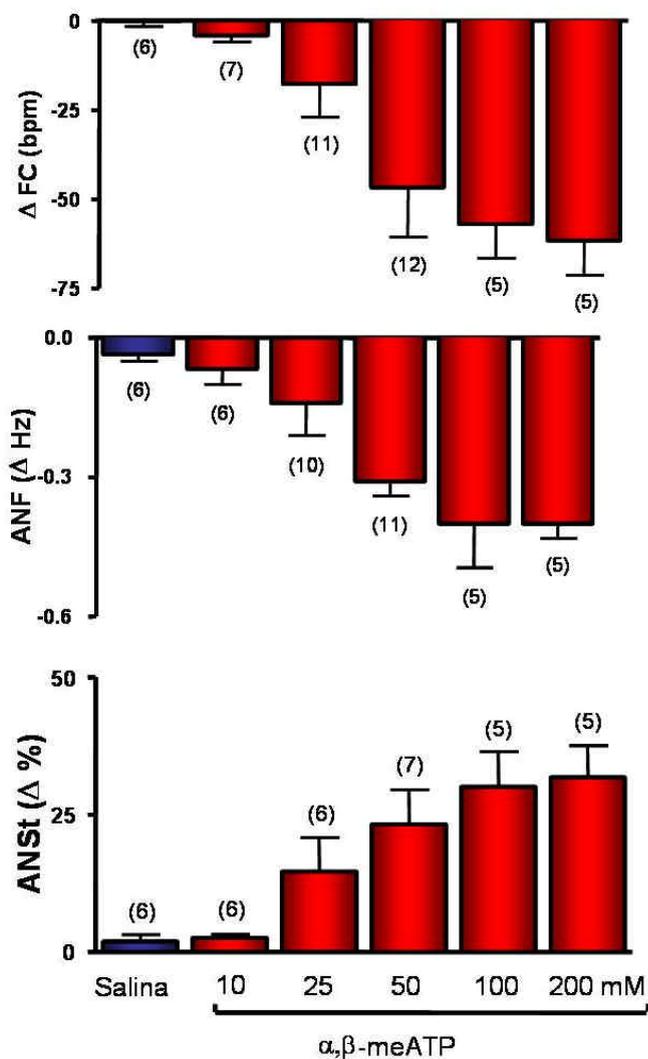


Figura 3: Efeitos de microinjeções unilaterais de α,β -metileno-ATP em concentrações crescentes (10, 25, 50, 100 e 200 mM) aplicadas em seqüência aleatória no NTS caudal sobre a frequência cardíaca (FC), a atividade do nervo frênico (ANF) e a atividade do nervo simpático torácico (ANSt). O número de animais que compõe cada grupo está indicado entre parênteses.

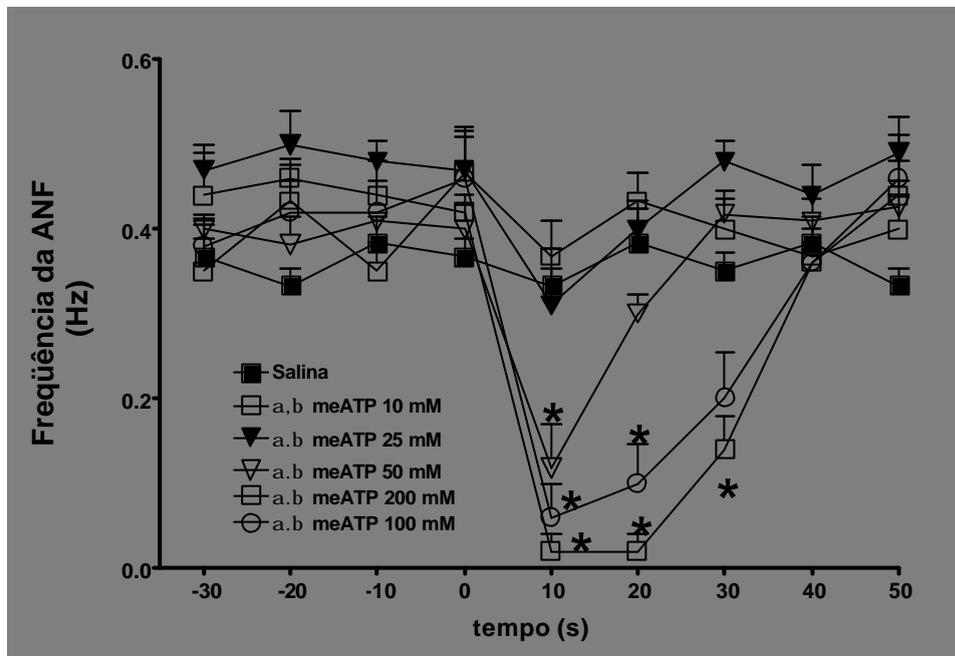


Figura 4: Avaliação no domínio do tempo das alterações na frequência de despolarização do nervo frênico decorrentes de microinjeções unilaterais (momento 0) de concentrações crescentes de α,β -metileno-ATP (indicadas na legenda da figura) no NTS caudal. O número de animais que compõe cada grupo é o mesmo daquele que está representado na figura anterior (figura 3, painel intermediário). * diferente em relação à microinjeção de salina no NTS caudal ($p = 0,05$).

4. 1. a Comparação dos efeitos da microinjeção de α,β -metileno-ATP com os da microinjeção de ATP no NTS caudal

A figura 5 ilustra traçados de uma preparação CTCl, representativa do grupo, mostrando que a microinjeção unilateral de α,β -metileno-ATP (50 mM) e a microinjeção unilateral, contralateral, de ATP (25 mM) no NTS caudal de um mesmo animal promoveram alterações na FC, na ANF e na ANSt. A figura 6 representa graficamente o conjunto dos resultados mostrando que as microinjeções de α,β -metileno-ATP promoveram bradicardia (-69 ± 7 bpm), redução na ANF ($-0,33\pm 0,03$ Hz) e simpato-excitação (27 ± 3 %), enquanto que as microinjeções de ATP promoveram bradicardia (-35 ± 6 bpm), aumento na ANF ($0,17\pm 0,03$ Hz) e simpato-excitação (29 ± 2 %). Os valores individuais da ANF, da FC e da ANSt em resposta às microinjeções unilaterais do α,β -metileno-ATP e do ATP no NTS caudal estão apresentados nas tabelas 4, 5 e 6 do apêndice.

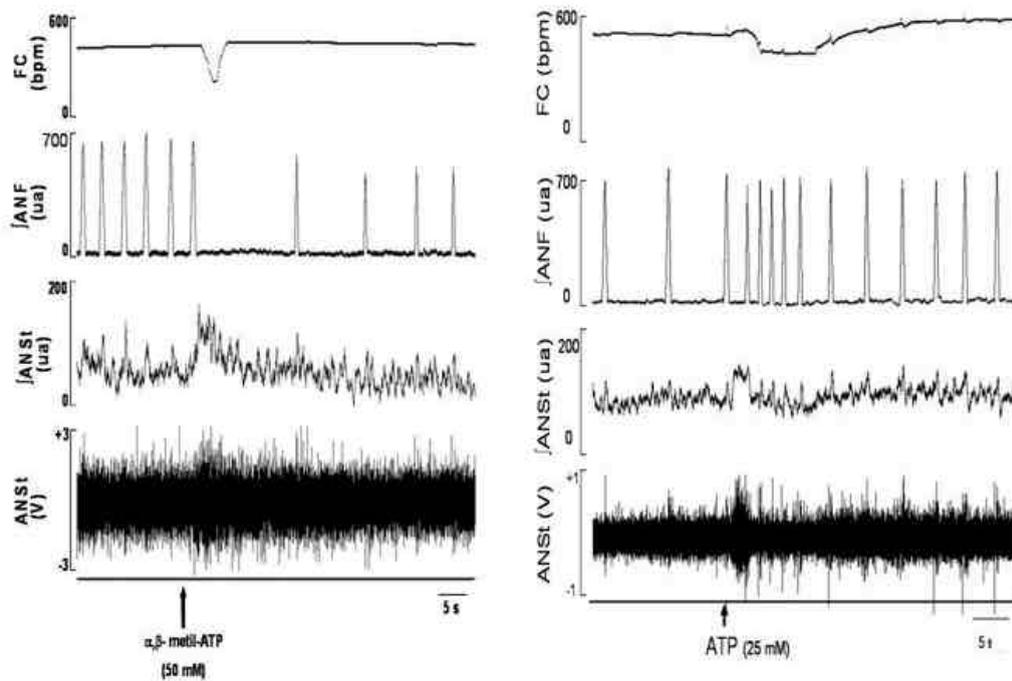


Figura 5: Traçados obtidos em um animal, representativo do grupo, mostrando os efeitos de uma microinjeção unilateral de α,β -metileno-ATP (50mM; painel à esquerda) e de uma microinjeção unilateral de ATP (25mM; painel à direita) no NTS caudal sobre a frequência cardíaca (FC), a atividade integrada do nervo frênico ($|ANF|$), a atividade integrada do nervo simpático torácico ($|ANSt|$) e seu registro original (ANSt). A microinjeção do α,β -metileno-ATP promoveu bradicardia, diminuição na ANF e simpato-excitação, enquanto que a microinjeção do ATP promoveu bradicardia, aumento na ANF e simpato-excitação. (bpm: batimentos por minuto; ua: unidades arbitrárias; v: volts).

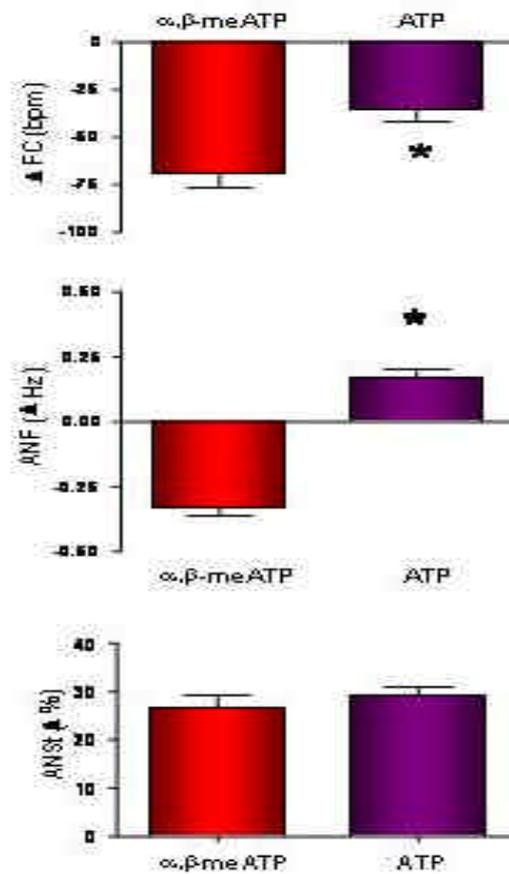


Figura 6: Efeitos de microinjeções unilaterais do α, β -metileno-ATP (50 mM, n = 6) e do ATP (25 mM, n = 6) no NTS caudal sobre a frequência cardíaca (FC), a frequência da atividade do nervo frênico (ANF) e a atividade do nervo simpático torácico (ANSt). * diferente em relação ao efeito promovido pela microinjeção de α, β -metileno-ATP ($p = 0,05$).

4.1. b. Avaliação dos efeitos da microinjeção de adenosina no NTS caudal

A figura 7 ilustra traçados de uma preparação CTCl, representativa do grupo, mostrando que a microinjeção unilateral de adenosina (35 mM) no NTS caudal não promoveu nenhuma alteração na ANF e na FC. A figura 8 ilustra traçados de uma outra preparação CTCl, representativa do grupo, mostrando que a microinjeção unilateral de adenosina (35 mM) no NTS caudal também não alterou a ANSt. A figura 9 representa graficamente o conjunto dos resultados mostrando que as microinjeções de adenosina (35 mM) no NTS caudal não promoveram nenhuma alteração significativa na FC (-3 ± 0 bpm), na ANF ($-0,02 \pm 0,01$ Hz) e na ANSt ($1 \pm 0\%$), enquanto que microinjeções unilaterais de glutamato (250 mM), aplicadas apenas como indicador funcional do sítio de microinjeção, promoveram bradicardia (-84 ± 6 bpm), redução na ANF ($-0,28 \pm 0,04$ Hz) e simpato-excitação ($22 \pm 1\%$). Os valores individuais da ANF, da FC e da ANSt em resposta às microinjeções unilaterais de glutamato (250 mM) e adenosina (35 mM) no NTS caudal estão apresentados nas tabelas 7, 8 e 9 do apêndice.

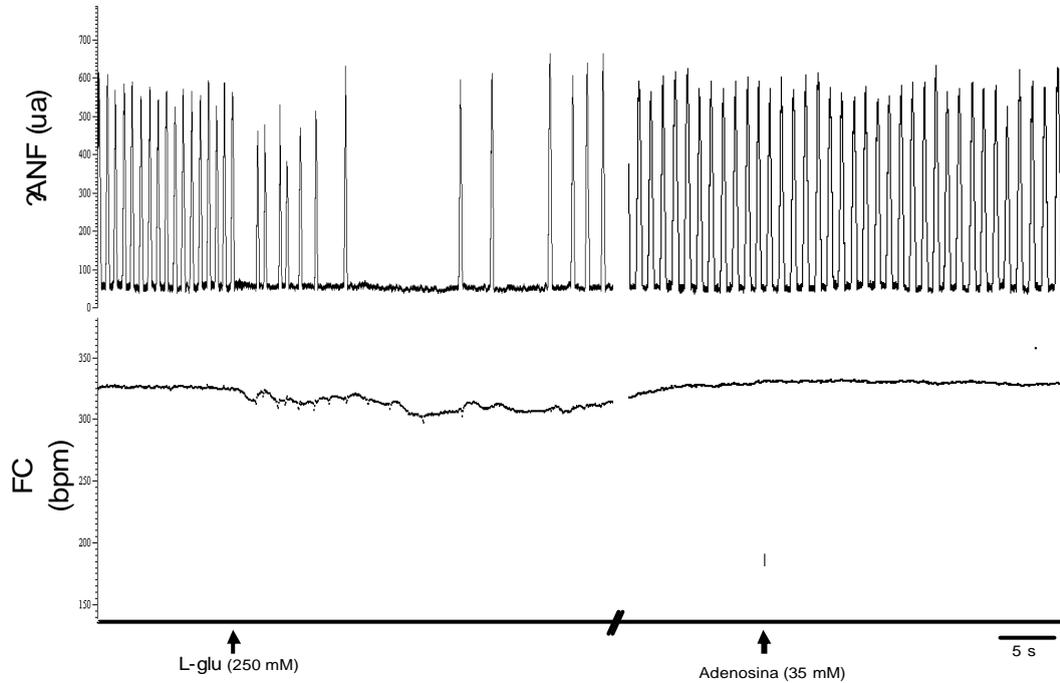


Figura 7: Traçados de uma preparação CTCL, representativa do grupo, mostrando a ausência de efeitos sobre a atividade integrada do nervo frênico (?ANF) e a frequência cardíaca (FC) quando da microinjeção unilateral de adenosina (35 mM; à direita da figura) no NTS caudal. A microinjeção unilateral de glutamato (250 mM; à esquerda da figura) no NTS caudal promoveu redução na ANF e bradicardia. (ua: unidades arbitárias; bpm: batimentos por minuto).

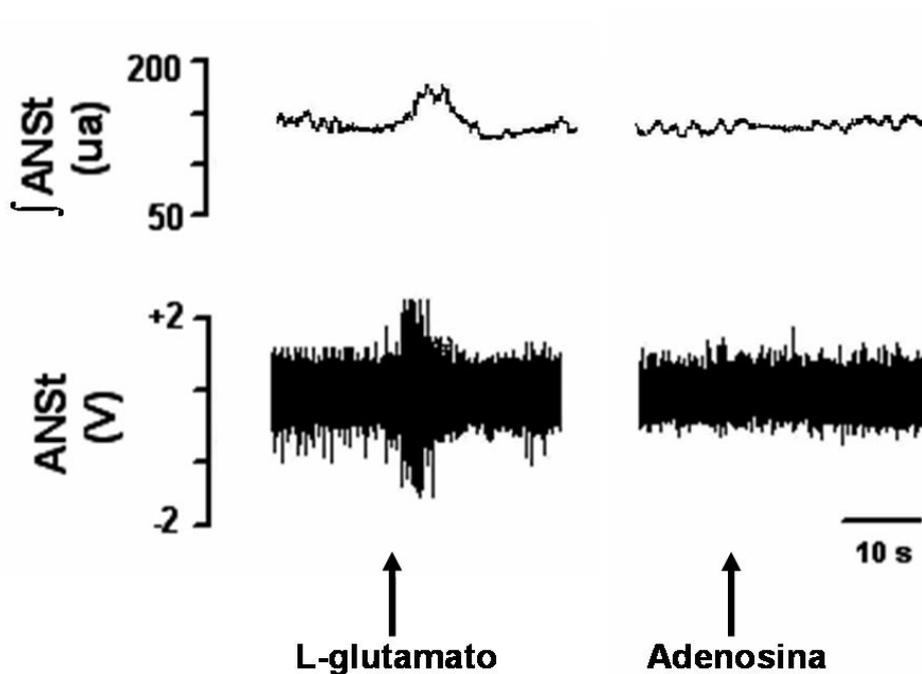


Figura 8: Traçados de uma preparação CTCl, representativa do grupo, mostrando a ausência de efeitos sobre a atividade integrada ($\int \text{ANSt}$) e o registro original do nervo simpático torácico (ANSt) quando da microinjeção unilateral de adenosina (35 mM) no NTS caudal. A microinjeção unilateral de glutamato (250 mM) no NTS caudal promoveu aumento da ANSt. (ua: unidades arbitrárias; v: volts).

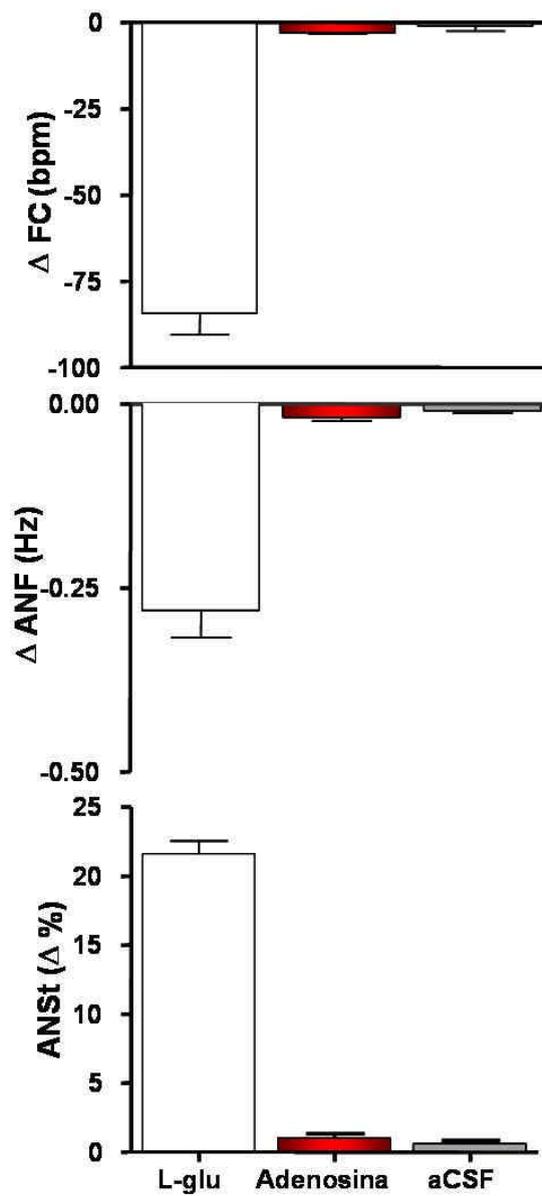


Figura 9: Ausência de alterações na frequência cardíaca (FC), na atividade do nervo frênico (ANF) e na atividade do nervo simpático torácico (ANSt) em resposta às microinjeções unilaterais de adenosina (35 mM, n = 5) no NTS caudal. As microinjeções de glutamato (250 mM, n = 5) no NTS caudal promoveram bradicardia, redução na ANF e simpato-excitação.

4.2. Determinação da concentração de PPADS efetiva em antagonizar as respostas promovidas pela microinjeção do α,β -metileno-ATP

A fim de se determinar a concentração de PPADS efetiva no antagonismo das respostas promovidas pela microinjeção unilateral do α,β -metileno-ATP (50 mM), microinjeções unilaterais de PPADS, inicialmente na concentração 10 mM, foram aplicadas no NTS caudal de um grupo de animais. A bradicardia (-69 ± 28 bpm), a redução na ANF ($-0,33\pm 0,03$ Hz) e a simpato-excitação (27 ± 3 %) promovidas pelas microinjeções de α,β -metileno-ATP no NTS caudal não foram alteradas pela microinjeção de PPADS (10 mM) no NTS caudal. Em função da ausência de antagonismo quando das microinjeções de PPADS na concentração 10 mM, microinjeções de PPADS numa concentração duas vezes maior (20 mM) foram utilizadas num outro grupo de animais. A figura 10 representa graficamente o conjunto dos resultados mostrando as alterações na FC, ANF e na ANSt decorrentes de microinjeções unilaterais de α,β -metileno-ATP (50 mM) antes (controle) e 2, 10, 30 e 45 minutos após microinjeção unilateral de PPADS no NTS caudal. O painel superior da figura 12 ilustra uma avaliação no domínio do tempo das alterações na frequência de despolarização do nervo frênico promovidas por microinjeções de α,β -metileno-ATP antes e após microinjeções de PPADS (10 mM). Os valores individuais da ANF, da FC e da ANSt estão apresentados nas tabelas 10, 11 e 12 do apêndice.

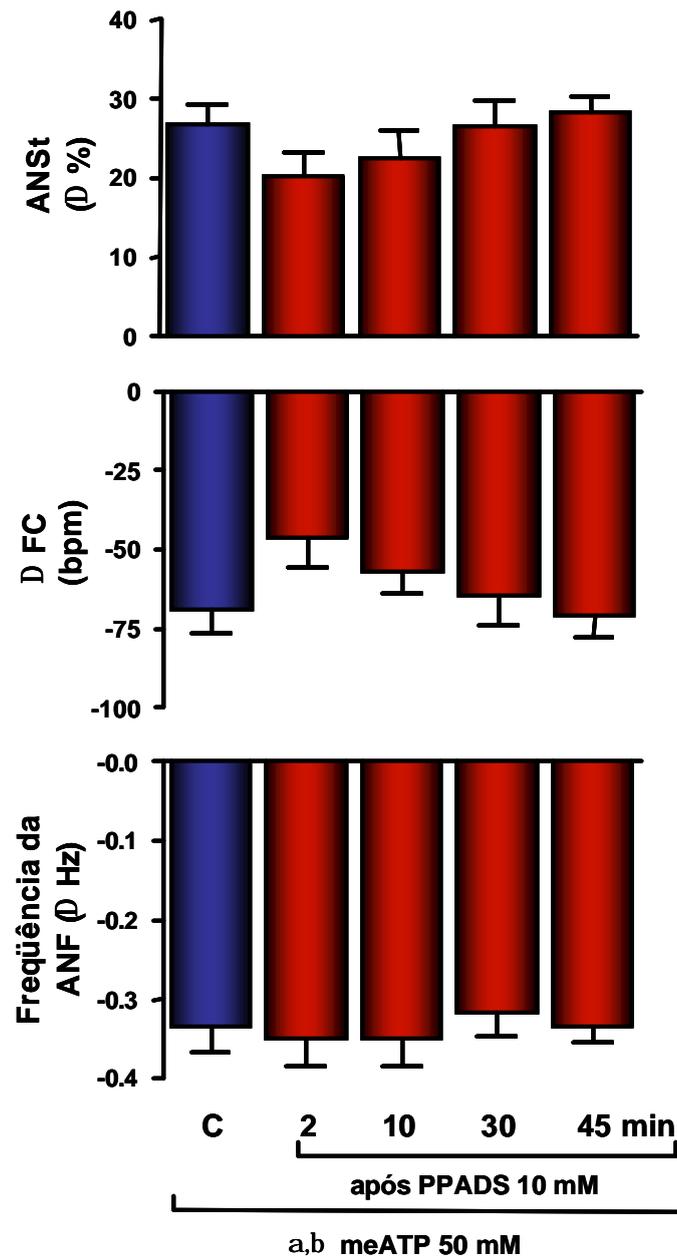


Figura 10: Alterações na atividade do nervo simpático torácico (ANSt), na frequência cardíaca (FC) e na atividade do nervo frênico (ANF) promovidas por microinjeções unilaterais de α,β -metileno-ATP (50 mM, n = 6) no NTS caudal, antes (controle: C) e 2, 10, 30 e 45 minutos após microinjeção unilateral de PPADS (10 mM) no NTS caudal.

A figura 11 representa graficamente o conjunto dos resultados referentes às alterações na FC, ANF e na ANSt decorrentes de microinjeções unilaterais de α,β -metileno-ATP (50 mM) antes (controle) e 2, 10, 30 e 45 minutos após microinjeção unilateral de PPADS (20 mM) no NTS caudal. As alterações promovidas pelas microinjeções de α,β -metileno-ATP sobre a ANSt, a FC e a ANF foram significativamente atenuadas aos 2, 10 e 30 minutos, e revertidas aos valores controles aos 45 minutos, após microinjeção unilateral de PPADS (20 mM). O aumento na ANSt ($30\pm 4\%$) foi atenuado aos 2 ($10\pm 2\%$), 10 ($6\pm 2\%$) e 30 minutos ($13\pm 3\%$); a bradicardia (-76 ± 29 bpm) foi atenuada aos 2 (-10 ± 9 bpm), 10 (-15 ± 4 bpm) e 30 minutos (-31 ± 3 bpm); e a redução na ANF ($-0,26\pm 0,03$ Hz) foi atenuada aos 2 ($-0,11\pm 0,04$ Δ Hz), 10 ($-0,06\pm 0,05$ Δ Hz) e 30 minutos ($-0,13\pm 0,06$ Hz). O painel inferior da figura 12 ilustra uma avaliação no domínio do tempo das alterações na frequência de despolarização do nervo frênico em resposta às microinjeções de α,β -metileno-ATP antes e após o bloqueio dos receptores purinérgicos P_{2x} , o qual foi realizado por meio da microinjeção unilateral de PPADS (20 mM) no NTS caudal. Os valores individuais da ANF, FC e ANSt deste protocolo, no qual foi testado PPADS na concentração 20 mM, estão apresentados nas tabelas 13, 14 e 15 do apêndice.

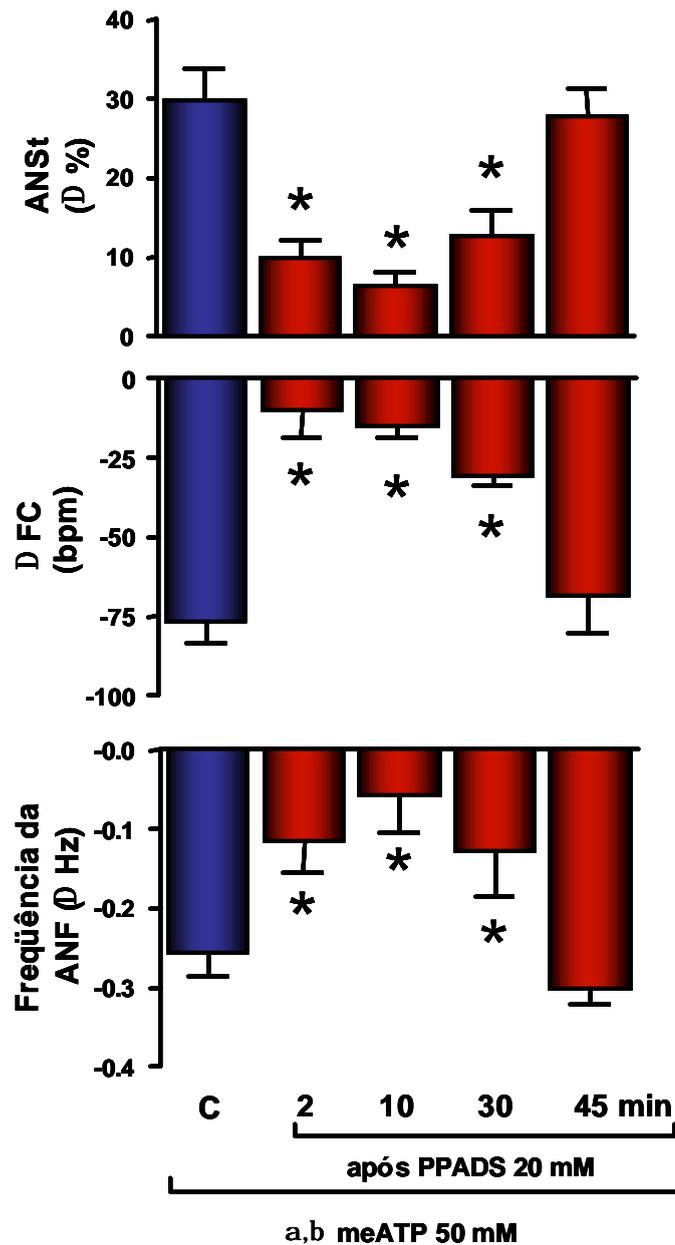


Figura 11: Alterações na atividade do nervo simpático torácico (ANSt), na frequência cardíaca (FC) e na atividade do nervo frênico (ANF) promovidas por microinjeções unilaterais de α,β -metil-ATP (50 mM, n = 7) no NTS caudal, antes (controle: C) e 2, 10, 30 e 45 minutos após microinjeção unilateral de PPADS (20 mM) no NTS caudal.

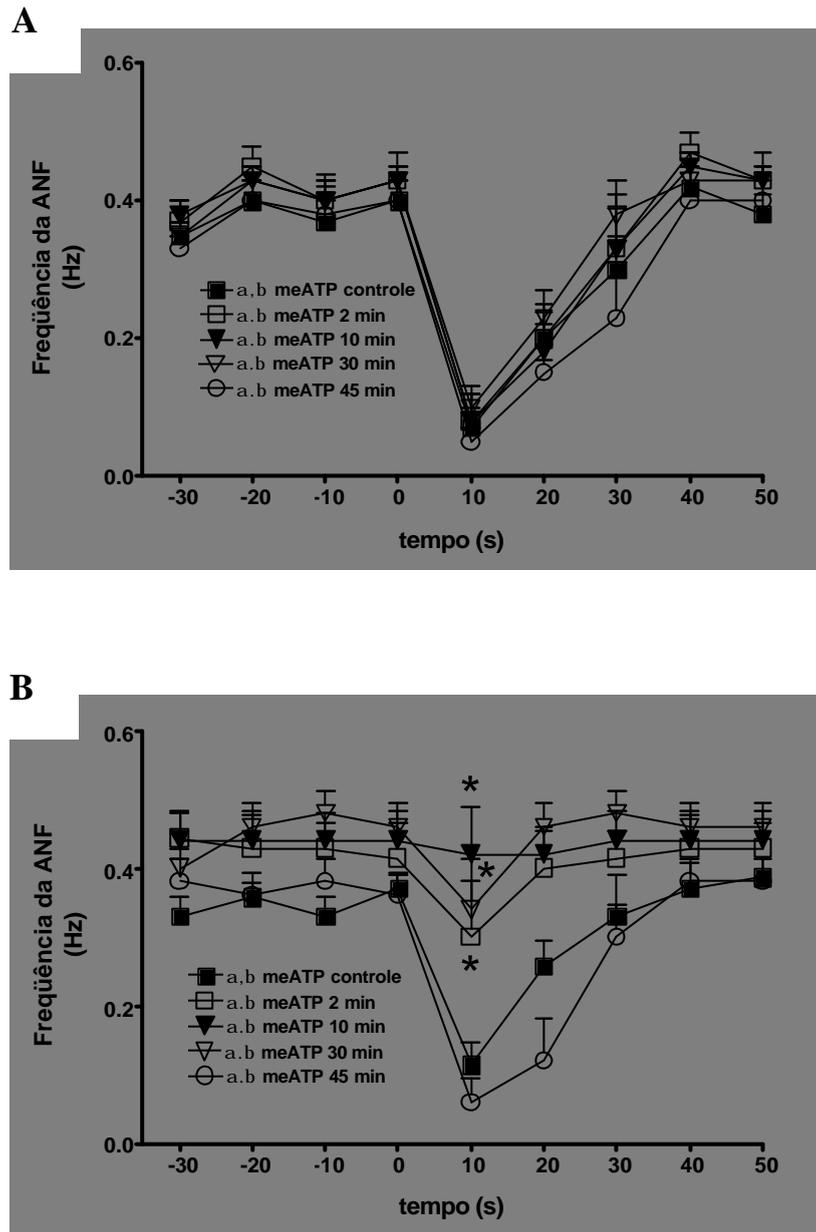


Figura 12: Avaliação no domínio do tempo das alterações na frequência de despolarização do nervo frênico decorrentes de microinjeções de α,β -metil-ATP (50 mM), antes (controle) e 2, 10, 30 e 45 minutos após microinjeção unilateral no NTS caudal de PPADS na concentração 10 mM ($n = 6$; painel A) ou na concentração 20 mM ($n = 7$; painel B). * diferente em relação à resposta promovida pela microinjeção controle de α,β -metil-ATP ($p = 0,05$).

4.3. Avaliação da possível participação dos receptores P_{2x} na neurotransmissão do quimiorreflexo no NTS caudal

A figura 13 ilustra traçados de uma preparação CTCl, representativa do grupo, mostrando as alterações na frequência cardíaca (FC), nas atividades integrada (?ANSt) e original do nervo simpático torácico (ANSt), e na atividade integrada do nervo frênico (?ANF) em resposta a ativações do quimiorreflexo antes (controle) e 2, 10, 30 e 45 minutos após microinjeção bilateral de PPADS (20 mM) no NTS caudal. As respostas decorrentes da ativação do quimiorreflexo (respostas controles) não foram significativamente diferentes daquelas observadas quando o quimiorreflexo foi ativado após a microinjeção bilateral de PPADS no NTS caudal. A figura 14 representa graficamente o conjunto dos resultados mostrando que a ativação controle do quimiorreflexo promoveu um aumento na atividade do nervo simpático torácico (55 ± 2 %), uma bradicardia (-120 ± 13 bpm) e um aumento na ANF ($0,25 \pm 0,03$ Δ Hz). O aumento na ANSt não foi atenuado pelo bloqueio dos receptores purinérgicos, pois as ativações do quimiorreflexo aos 2 (52 ± 4 %), 10 (48 ± 5 %), 30 (54 ± 2 %) e 45 minutos (51 ± 2 %) após microinjeção bilateral de PPADS (20 mM) no NTS caudal promoveram aumentos na atividade simpática semelhantes àqueles da condição controle. A bradicardia promovida pela ativação controle do quimiorreflexo (-120 ± 13 bpm) não foi diferente daquelas promovidas aos 2 (-111 ± 16), 10 (-114 ± 15), 30 (-125 ± 16) e 45 (-130 ± 14) minutos após microinjeção bilateral de PPADS (20 mM). A ativação controle do quimiorreflexo promoveu um aumento na atividade do nervo frênico de $0,25 \pm 0,03$ Δ Hz, aumento esse que não foi significativamente alterado aos 2 ($0,24 \pm 0,03$ Hz), 10 ($0,25 \pm 0,02$ Hz), 30

($0,23 \pm 0,03$ Hz) e 45 minutos ($0,23 \pm 0,04$ Hz) após o antagonismo dos receptores purinérgicos pelo PPADS. A figura 15 ilustra uma análise temporal das alterações na frequência de despolarização do nervo frênico decorrentes da ativação do quimiorreflexo antes e após microinjeção bilateral de PPADS (20 mM) no NTS caudal. Os valores individuais da ANF, FC e ANSt em resposta a ativações do quimiorreflexo antes e após o bloqueio dos receptores purinérgicos estão apresentados nas tabelas 16, 17 e 18 do apêndice.

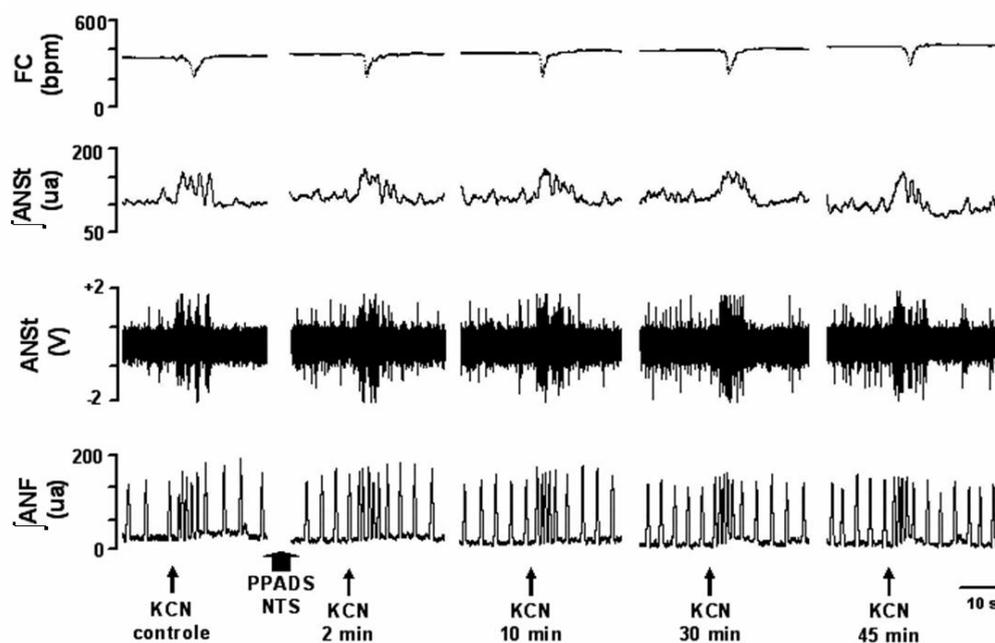


Figura 13: Traçados de uma preparação CTCl, representativa do grupo, mostrando as alterações na frequência cardíaca (FC), nas atividades integrada (?ANSt) e original do nervo simpático torácico (ANSt), e na atividade integrada do nervo frênico (?ANF) promovidas pela ativação do quimiorreflexo (KCN 0,05%) antes (controle) e 2, 10, 30 e 45 min após microinjeção bilateral de PPADS (20 mM) no NTS caudal. (ua: unidades arbitrárias; v: volts; bpm: batimentos por minuto).

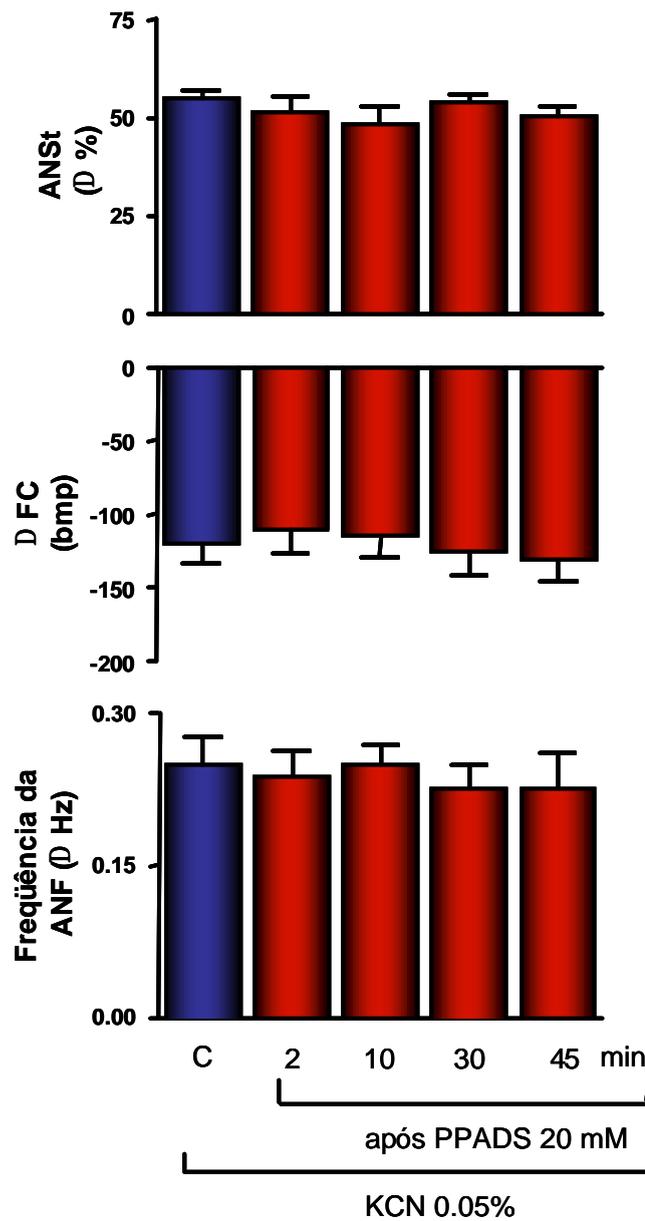


Figura 14: Alterações na atividade do nervo simpático torácico (ANSt), na frequência cardíaca (FC) e na atividade do nervo frênico (ANF) decorrente de ativações do quimiorreflexo (KCN 0.05%, n = 8) antes (controle: C) e 2, 10, 30 e 45 minutos após microinjeção bilateral de PPADS (20 mM) no NTS caudal.

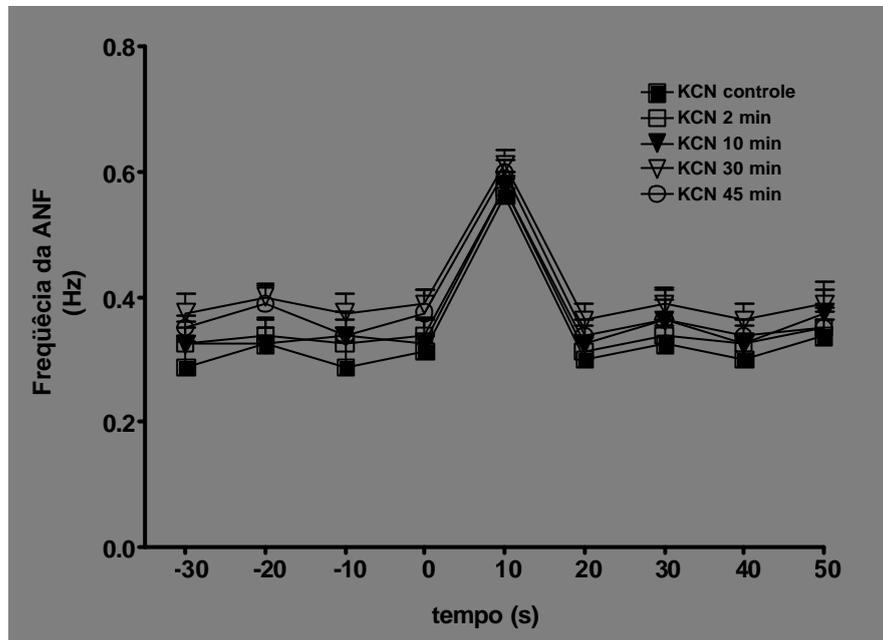


Figura 15: Avaliação no domínio do tempo das alterações na frequência de despolarização do nervo frênico decorrentes de ativações do quimiorreflexo com KCN (0,05%, n = 8) antes (controle) e 2, 10, 30 e 45 minutos após microinjeção bilateral de PPADS (20 mM) no NTS caudal.

4.4. Avaliação da possível participação dos receptores purinérgicos (P_{2x}) e dos receptores ionotrópicos de aminoácidos excitatórios (AAE) na neurotransmissão do quimiorreflexo no NTS caudal

A figura 16 ilustra traçados de uma preparação CTCl, representativa do grupo, mostrando as alterações na frequência cardíaca (FC), nas atividades integrada (?ANSt) e original do nervo simpático torácico (ANSt), e na atividade integrada do nervo frênico (?ANF) decorrentes de ativações do quimiorreflexo antes (controle) e 2, 10, 30, 45 e 60 minutos após duplo bloqueio no NTS caudal, i.e., o antagonismo de receptores glutamatérgicos ionotrópicos, realizado por meio de microinjeção bilateral de ácido quinurênico (250 mM), e o antagonismo de receptores purinérgicos ionotrópicos P_{2x} , realizado por meio de microinjeção bilateral de PPADS (20 mM). A figura 17 representa graficamente o conjunto dos resultados mostrando que a ativação controle do quimiorreflexo promoveu um aumento na atividade do nervo simpático torácico (52 ± 2 %), atenuado após o duplo bloqueio, uma bradicardia (-151 ± 17 bpm), atenuada após o duplo bloqueio, e um aumento na ANF ($0,24 \pm 0,02$ Δ Hz) que não foi alterado após o duplo bloqueio. O aumento na ANSt foi significativamente atenuado aos 2 (17 ± 1 %), 10 (18 ± 2 %) e 30 minutos (31 ± 2 %) após duplo bloqueio no NTS caudal. A bradicardia promovida por ativação do quimiorreflexo foi significativamente atenuada aos 2 (-21 ± 3), 10 minutos (-17 ± 2), 30 minutos (-37 ± 8) e 45 (-72 ± 13) após o duplo bloqueio no NTS caudal. O aumento na atividade do nervo frênico decorrente da ativação controle do quimiorreflexo não foi significativamente alterado aos 2 ($0,20 \pm 0,02$ Δ Hz), 10 ($0,22 \pm 0,03$ Δ Hz), 30 ($0,20 \pm 0,04$ Δ Hz), 45 ($0,22 \pm 0,03$ Δ Hz) e 60 minutos ($0,21 \pm 0,05$ Δ Hz) após o

duplo bloqueio. A figura 18 ilustra uma análise no domínio do tempo das alterações na frequência de despolarização do nervo frênico decorrentes de ativações do quimiorreflexo antes (controle) e após o duplo bloqueio no NTS caudal. Os valores individuais da ANF, FC e ANSt decorrentes das ativações do quimiorreflexo antes e após o duplo bloqueio estão apresentados nas tabelas 19, 20 e 21 do apêndice.

A figura 19 ilustra uma fotomicrografia de uma lâmina histológica do tronco cerebral de um animal no qual foi aplicada uma microinjeção unilateral no NTS caudal. O painel A da figura 20 mostra uma fotomicrografia de lâmina histológica de tronco cerebral ao nível do NTS caudal de um animal no qual foram aplicadas duas microinjeções (microinjeção bilateral); e o painel B da mesma figura esquematiza o NTS caudal e a localização relativa dos sítios das microinjeções bilaterais.

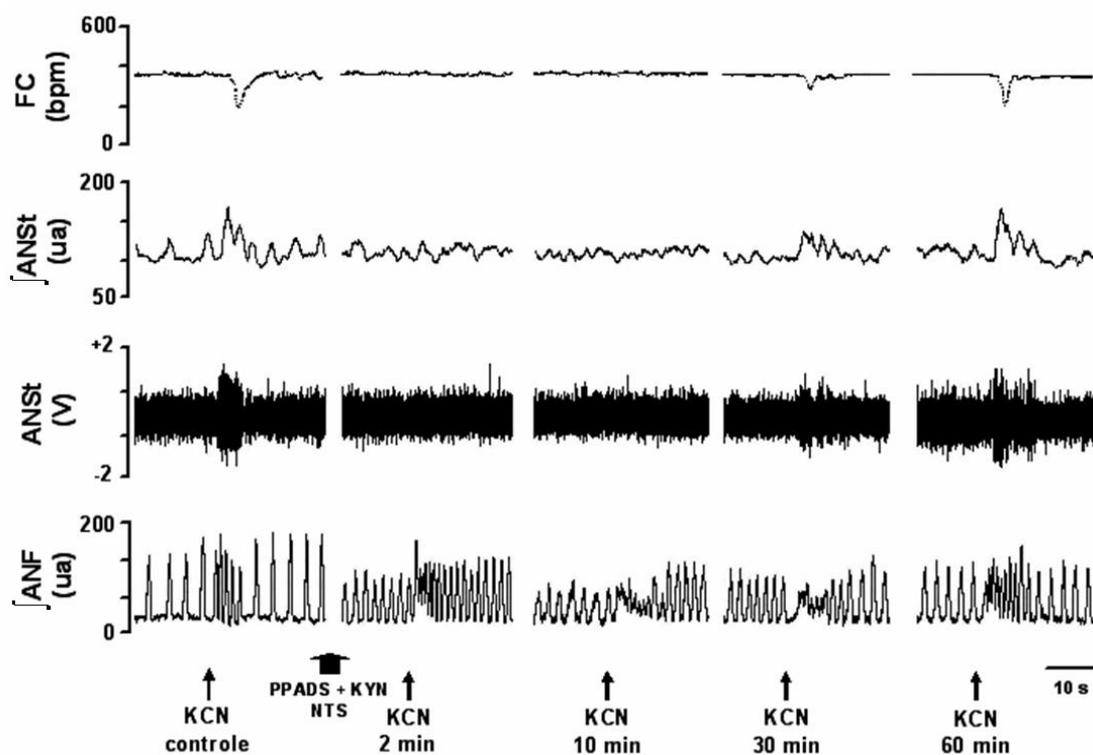


Figura 16: Traçados de uma preparação CTCl, representativa do grupo, mostrando as alterações na frequência cardíaca (FC), nas atividades integrada (?ANSt) e original do nervo simpático torácico (ANSt), e na atividade integrada do nervo frênico (?ANF) promovidas por ativações do quimiorreflexo (KCN 0,05%, n = 9) antes (controle) e 2, 10, 30, 45 e 60 min após duplo bloqueio, o qual foi realizado por meio de microinjeção bilateral de PPADS (20 mM) e de ácido quinurênico (KYN, 250 mM) no NTS caudal.

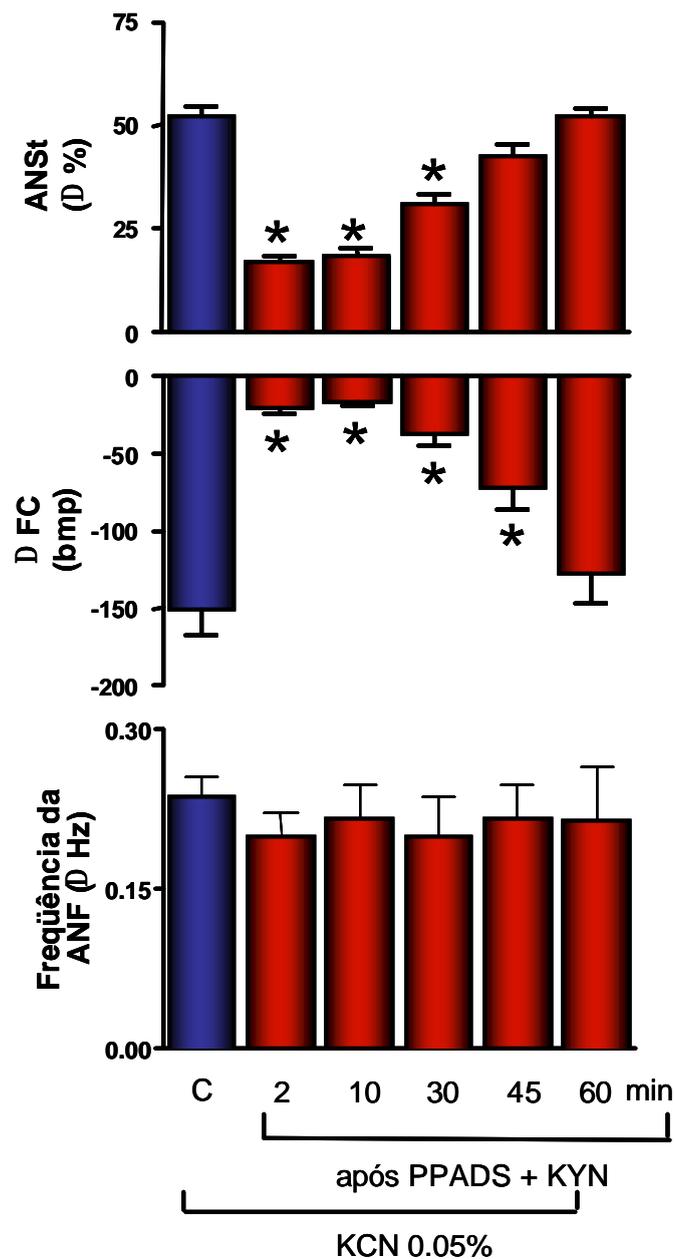


Figura 17: Alterações na atividade do nervo simpático torácico (ANSt, $n = 9$), na frequência cardíaca (FC, $n = 9$) e na atividade do nervo frênico (ANF, $n = 7$) decorrentes de ativações do quimiorreflexo (KCN 0.05%), antes (controle: C) e 2, 10, 30, 45 e 60 minutos após duplo bloqueio [PPADS (20 mM) + KYN (250 mM)]. * diferente da ativação controle do quimiorreflexo ($p=0,05$).

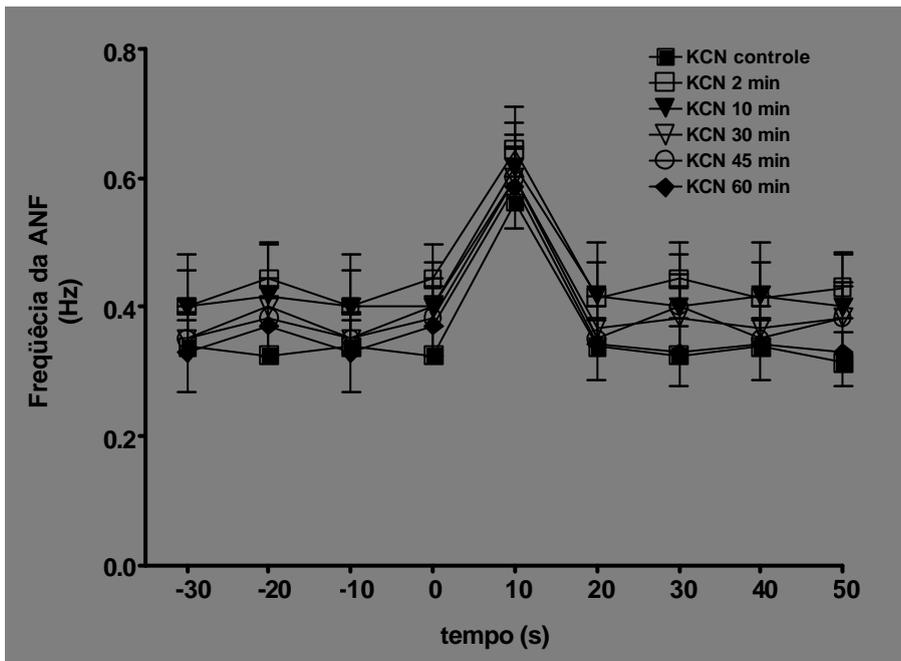


Figura 18: Avaliação no domínio do tempo das alterações na frequência de despolarização do nervo frênico decorrentes de ativações do quimiorreflexo com KCN (0,05%, $n = 7$) antes (controle) e aos 2, 10, 30, 45 e 60 minutos após duplo bloqueio no NTS caudal.

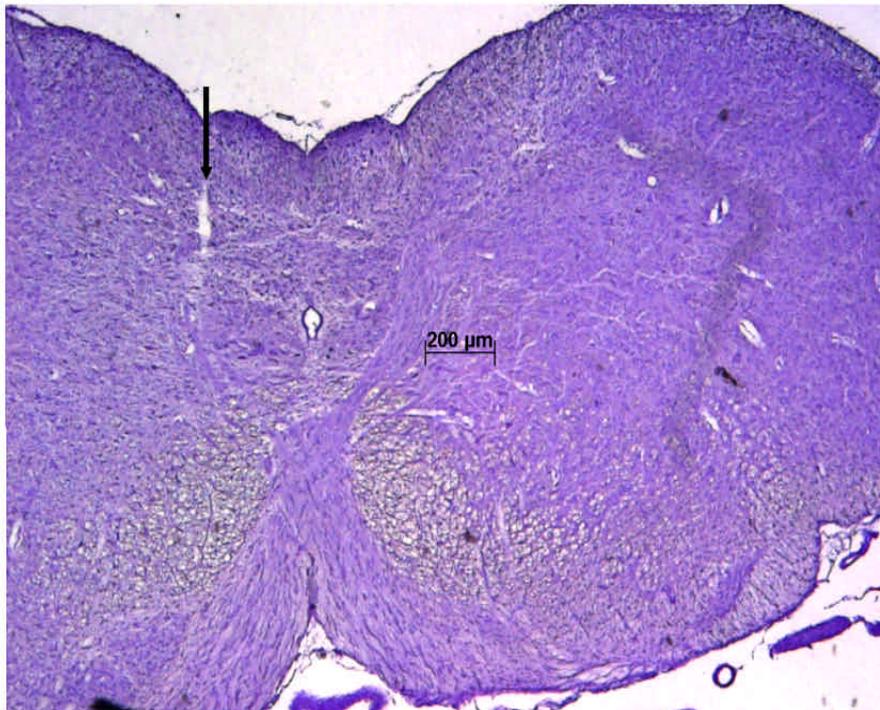


Figura 19: Fotomicrografia de uma secção transversal do tronco cerebral de um animal no qual foi aplicada uma microinjeção unilateral no NTS caudal. O sítio da microinjeção está indicado pela seta.

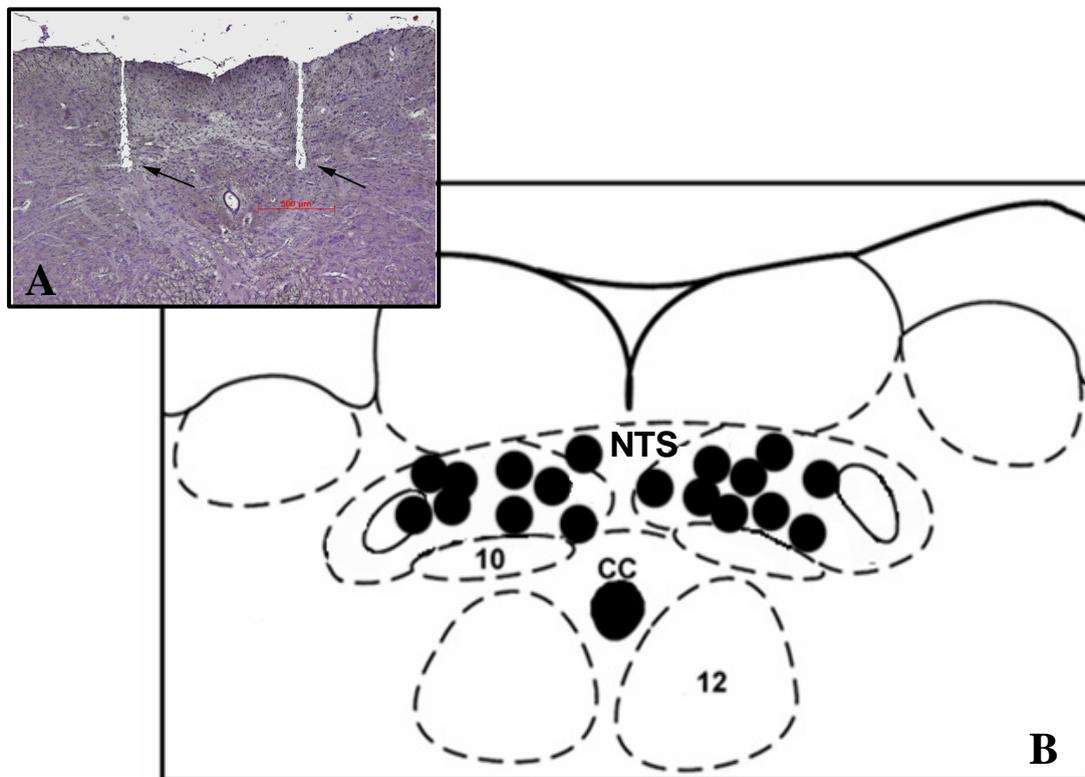


Figura 20: A: Fotomicrografia de uma secção transversal do tronco cerebral ao nível do NTS caudal de um animal no qual foram aplicadas duas microinjeções (microinjeção bilateral). As setas indicam os sítios das microinjeções. B: Representação esquemática do NTS caudal baseada no atlas de Paxinos e Watson (1996). Os círculos escuros representam a localização relativa dos sítios das microinjeções bilaterais (n = 9). 10: Núcleo motor dorsal do vago; 12: Núcleo hipoglossos; CC: Canal Central.

5. DISCUSSÃO

As microinjeções bilaterais do PPADS ou da combinação PPADS e KYN (duplo bloqueio) não afetaram a resposta taquipnéica do quimiorreflexo, sugerindo que os receptores ionotrópicos purinérgicos e glutamatérgicos, pelo menos ao nível do NTS caudal, não parecem estar envolvidos com processamento dessa resposta. Por outro lado, a resposta simpato-excitatória do quimiorreflexo foi significativamente atenuada após o bloqueio simultâneo dos receptores purinérgicos e glutamatérgicos, implicando no envolvimento do ATP e do glutamato na neurotransmissão do componente simpato-excitatório do quimiorreflexo no NTS caudal.

Os receptores purinérgicos P_{2x} e a neurotransmissão dos componentes simpato-excitatório e taquipnéico do quimiorreflexo no NTS caudal

Para avaliarmos o possível envolvimento dos receptores ionotrópicos purinérgicos P_{2x} na neurotransmissão dos componentes simpato-excitatório e respiratório do quimiorreflexo no NTS caudal, precisávamos estabelecer a princípio a concentração efetiva do antagonista seletivo (PPADS) desses receptores para posteriormente testá-lo frente a ativações do quimiorreflexo antes e após a microinjeção bilateral do mesmo no NTS caudal. Essa concentração do antagonista pôde ser determinada após a realização de um primeiro protocolo no qual o agonista seletivo dos receptores ionotrópicos purinérgicos P_{2x} (α,β -metileno-ATP) foi microinjetado unilateralmente em concentrações crescentes no NTS caudal para o estabelecimento da sua curva concentração-efeito. A partir dessa curva, determinamos qual a concentração desse agonista capaz de promover cerca de aproximadamente 50% da sua resposta máxima, considerando-se seu efeito sobre os três parâmetros registrados. Num segundo protocolo, testamos o agonista (50

mM) frente ao antagonista (PPADS) na concentração 10 mM; essa concentração foi baseada em experimentos realizados com o PPADS em ratos não-anestesiados no nosso laboratório (Braga e cols.). Nessa concentração o antagonista não promoveu alterações significativas nas respostas promovidas pelo agonista. Após aumentarmos a concentração do antagonista para 20 mM realizamos novamente o protocolo e, dessa vez, as respostas promovidas pela microinjeção do agonista foram significativamente atenuadas. Uma vez determinada a concentração do antagonista (PPADS, 20 mM) efetiva em antagonizar os efeitos promovidos pelo agonista, avaliamos, num terceiro protocolo experimental, o efeito das ativações do quimiorreflexo com KCN (0,05%) antes e após o bloqueio dos receptores purinérgicos P_{2x} , o qual foi realizado por meio da microinjeção bilateral do antagonista desses receptores (PPADS, 20 mM) no NTS caudal, para, assim, testarmos a nossa hipótese que o ATP e seus receptores ionotrópicos P_{2x} participariam da neurotransmissão dos componentes simpato-excitatório e respiratório do quimiorreflexo no NTS caudal.

A primeira etapa do nosso estudo foi, como mencionado acima, determinar a curva concentração-efeito do agonista (α,β -metileno-ATP). Para tanto, foram aplicadas microinjeções unilaterais do α,β -metileno-ATP em concentrações crescentes (10, 25, 50, 100 e 200 mM) no NTS caudal, as quais promoveram as seguintes alterações concentração-dependentes autonômicas e respiratórias: redução da frequência cardíaca (FC), aumento da atividade do nervo simpático torácico (ANSt) e diminuição da atividade do nervo frênico (ANF).

Respostas autonômicas promovidas pelo α,β -metileno-ATP

O aumento concentração-dependente da atividade simpática em resposta ao α,β -metileno-ATP no NTS caudal está de acordo com os estudos de Antunes e cols. (2005a) no qual os autores mostraram que o ATP microinjetado no NTS caudal de ratos não-anestesiados promoveu aumento concentração-dependente na pressão arterial. O aumento na ANSt observado após a microinjeção do α,β -metileno-ATP no NTS caudal foi bloqueado pelo PPADS e pode ter sido mediado pela ativação dos receptores purinérgicos P_{2x} pós-sinápticos. Essa sugestão se fundamenta no estudo de Paula e cols. (2004), no qual foi mostrado que a simpato-excitação promovida pela microinjeção do ATP no NTS intermediário de ratos não-anestesiados não foi atenuada pelo bloqueio dos receptores ionotrópicos do glutamato e nem pelo bloqueio dos receptores A_1 da adenosina, implicando que essa resposta não envolve a participação do glutamato, o qual poderia ser liberado na fenda sináptica a partir da ativação dos receptores P_{2x} pré-sinápticos pelo ATP; e também não é mediada pela formação da adenosina, a partir do catabolismo do ATP, e a conseqüente ativação dos receptores A_1 da adenosina, os quais inibem a liberação do glutamato (Kato e Shigetomi, 2001). De alguma forma, a partir da microinjeção do α,β -metileno-ATP no NTS caudal, parece ter ocorrido a excitação de neurônios do NTS que enviam projeções excitatórias para neurônios pré-simpáticos (geradores da atividade simpática) do RVLM (Koshiya e Guyenet, 1996), os quais, por sua vez, estimulam a atividade dos neurônios pré-ganglionares simpáticos da coluna intermédio-lateral (IML) da medula espinhal. Os registros da atividade do nervo simpático no nosso trabalho foram feitos na região torácica da cadeia simpática paravertebral. Os neurônios dessa cadeia simpática são estimulados pelos neurônios da IML.

A bradicardia promovida pela microinjeção do α,β -metileno-ATP no NTS caudal está de acordo com os estudos de Antunes e cols (2005a; 2005b) realizados, respectivamente, em ratos não-anestesiados e na preparação CTCI, nos quais também foram realizadas microinjeções unilaterais do ATP no NTS caudal. O α,β -metileno-ATP ao atuar sobre os receptores P_{2x} pré-sinápticos pode estimular a liberação do glutamato (Shigetomi e Kato, 2004), o qual promove bradicardia quando microinjetado no NTS caudal na preparação CTCI conforme foi mostrado no estudo de Braga e cols. (2006). A favor do envolvimento dos receptores P_{2x} pré-sinápticos e a conseqüente liberação do glutamato na resposta bradicárdica ao α,β -metileno-ATP estão 1) o trabalho de Paula e cols. (2004) no qual o bloqueio dos receptores P_{2x} com o PPADS e o bloqueio dos receptores ionotrópicos do glutamato com o ácido quinurênico atenuaram a bradicardia ao ATP; e 2) os achados do presente estudo, no qual o PPADS, ao bloquear os receptores P_{2x} pré-sinápticos, impedindo a suposta liberação do glutamato, atenuou a bradicardia ao α,β -metileno-ATP. A ativação de neurônios do NTS que enviam projeções excitatórias para o núcleo ambíguo [NA, (Kalia e Sullivan, 1982)] estimularia os neurônios pré-ganglionares parassimpáticos do NA promovendo parassimpato-excitação e, conseqüentemente, bradicardia. É possível especular, pois, que a excitação de neurônios do NTS seria promovida a partir da ativação dos receptores P_{2x} pré-sinápticos pelo α,β -metileno-ATP no NTS caudal, ocorrendo a liberação do glutamato e, em última instância, a estimulação de neurônios pré-ganglionares parassimpáticos do núcleo ambíguo pelos neurônios do NTS caudal. Kitchen e cols. (2005) mostraram que a contribuição relativa da diminuição da atividade simpática cardíaca e do aumento da atividade parassimpática na bradicardia promovida pela ativação dos receptores P_{2x} de neurônios do NTS com o

α,β -metileno-ATP dependeu da extensão da ativação desses receptores, i.e., em baixas concentrações do agonista a bradicardia foi mediada predominantemente pela redução da atividade simpática cardíaca, enquanto que em concentrações mais elevadas a bradicardia promovida pela ativação dos receptores P_{2x} foi mediada por ambos os efeitos: redução da atividade simpática cardíaca e parassimpato-excitação.

Alterações respiratórias promovidas pelo α,β -metileno-ATP

A redução na ANF pode ter sido mediada pela liberação do glutamato a partir da ativação dos receptores P_{2x} pré-sinápticos pelo α,β -metileno-ATP, pois no estudo de Braga e cols. (2006) foi mostrado que a microinjeção do glutamato no NTS caudal também promoveu uma diminuição na ANF (apnéia). A liberação do glutamato após ativação dos receptores P_{2x} pré-sinápticos pelo α,β -metileno-ATP poderia ter estimulado neurônios do NTS (grupo respiratório dorsal) que enviariam projeções excitatórias para os neurônios expiratórios do Kölliker-Fuse (K-F) e do núcleo parabraquial (PBN), determinando a inibição de neurônios inspiratórios e a excitação de neurônios expiratórios, prolongando assim o intervalo entre os disparos do nervo frênico (Koshiya e Guyenet, 1994; Chamberlin e Saper, 1994; 1998).

Diferente da apnéia promovida pela microinjeção do α,β -metileno-ATP no NTS caudal, no estudo de Antunes e cols. (2005b) a microinjeção do ATP (25 mM) na mesma região e também na preparação CTCI promoveu um aumento na ANF. No intuito de avaliar essa disparidade qualitativa nas respostas promovidas pelo ATP e pelo α,β -metileno-ATP realizamos um protocolo experimental comparativo no qual foram

aplicadas microinjeções dos agonistas purinérgicos, α,β -metileno-ATP num lado e ATP no outro lado, no NTS caudal de um mesmo animal.

A microinjeção unilateral do ATP no NTS caudal, numa concentração (25 mM) capaz de promover aproximadamente 50% da resposta máxima, considerando-se seu efeito sobre a ANF, estabelecida a partir da curva concentração-efeito do ATP no estudo de Antunes e cols. (2005b), promoveu bradicardia, aumento na ANF e aumento na ANSt. As respostas ao α,β -metileno-ATP foram bradicardia, redução na ANF e aumento na ANSt; respostas essas que já tinham sido obtidas quando da realização do protocolo da curva concentração-efeito do α,β -metileno-ATP.

No trabalho de Antunes e cols. (2005b) o ATP (25 mM) também tinha promovido bradicardia e aumento na ANF, porém nenhuma alteração na ANSt tinha sido observada. Num trabalho anterior dos mesmos autores (Antunes e cols., 2005a) foi mostrado que a microinjeção do ATP no NTS caudal de ratos não-anestesiados promoveu bradicardia, taquipnéia e resposta pressora. Num estudo de Paula e cols. (2004) foi mostrado que a resposta pressora ao ATP no NTS intermediário foi decorrente da estimulação simpática (simpato-excitação), pois a administração intravenosa de prazosin (antagonista α_1 -adrenérgico) praticamente aboliu essa resposta. As respostas pressora, taquipnéica e bradicárdica que tinham sido observadas em ratos não-anestesiados (Antunes e cols., 2005a) foram também obtidas na preparação CTCl quando da microinjeção do ATP no NTS caudal no nosso protocolo comparativo como simpato-excitação, aumento da ANF e bradicardia. No trabalho de Antunes e cols. (2005b) realizado na preparação CTCl, embora não tenha sido evidente, aparentemente ocorreu um aumento da atividade simpática quando da microinjeção do ATP no NTS caudal, principalmente em função do

acoplamento observado entre os disparos do nervo frênico e a atividade simpática no momento da resposta taquipnéica ao ATP. Assim, é possível que os achados de Antunes e cols. (2005b) tenham sido afetados por algum tipo de problema técnico na aquisição dos potenciais gerados pelo nervo simpático torácico.

No protocolo comparativo observamos 1) que a microinjeção do α, β -metileno-ATP no NTS caudal promoveu uma redução na ANF, enquanto que o ATP promoveu um aumento na ANF, aumento esse que foi observado tanto no presente trabalho quanto naquele de Antunes e cols. (2005b); 2) que esses agonistas purinérgicos P_2 promoveram respostas opostas apenas quanto à ANF; e 3) que houve diferença quantitativa na resposta bradicárdica, mas não na simpato-excitatória.

A primeira hipótese que nos pareceu plausível para explicar as razões dessa disparidade entre as respostas promovidas pelo ATP e pelo α, β -metileno-ATP foi que o ATP estaria sendo catabolizado em adenosina pela ação da 5'-ectonucleotidase (Ralevic e Burnstock, 1998; Zimmermann, 2000) e a adenosina formada a partir desse processo poderia estar exercendo seus efeitos biológicos. A adenosina ao interagir com os receptores purinérgicos A_1 e A_{2a} desempenha um papel neuromodulatório nos mecanismos de controle cardiovascular no NTS (Barraco e cols., 1991). Scislo e O'Leary (2000) mostraram, por meio da estimulação seletiva dos receptores A_{2a} e o bloqueio seletivo dos receptores ionotrópicos do glutamato, que, diferente do que havia sido proposto em trabalhos anteriores, as respostas à ativação dos receptores A_{2a} no NTS caudal é mediada, pelo menos em parte, por mecanismos não-glutamatérgicos. Scislo e O'Leary (2005) também mostraram que a estimulação seletiva de receptores A_1 promove respostas de ativação simpática regional diferentes. Kato e Shigetomi (2001) mostraram

que após a catabolização do ATP, a adenosina resultante, ao atuar pré-sinápticamente nos seus receptores A_1 , inibiu a liberação do glutamato, enquanto que a liberação do glutamato, por outro lado, pôde ser estimulada pelo efeito do ATP atuando pré-sinápticamente nos seus receptores P_{2x} . Trabalhos na literatura mostram que a microinjeção de adenosina no NTS promoveu alterações na pressão arterial e na frequência cardíaca (Barraco e cols., 1988; Tseng e cols., 1988; de Paula e Machado, 2001).

Diante das evidências que a adenosina pode ser gerada a partir do ATP liberado na fenda sináptica (Ralevic e Burnstock, 1998; Zimmermann, 2000) e que essa exerce um papel neuromodulatório sobre a liberação de neurotransmissores ou neuromoduladores (Scislo e O'Leary, 2000; 2005; Kato e Shigetomi, 2001), realizamos um protocolo relativo ao efeito da adenosina no NTS caudal, considerando principalmente a possibilidade da adenosina ser responsável pela resposta taquipnéica ao ATP no NTS caudal. Nossos resultados mostraram, porém, que a microinjeção de adenosina no NTS não promoveu nenhuma resposta, nem mesmo nos parâmetros cardiovasculares, pelo menos na máxima concentração passível de diluição obtida nos nossos experimentos (35 mM). Como não sabíamos se a microinjeção da adenosina no NTS caudal na preparação CTCI promoveria algum efeito, e nos experimentos-pilotos nenhum efeito estava sendo obtido, diferente daqueles experimentos realizados com o α, β -metileno-ATP, aplicamos microinjeções prévias do glutamato apenas nesse protocolo, com a finalidade de indicar o sítio efetivo de microinjeção, pois as respostas ao glutamato no NTS caudal na preparação CTCI (Braga e cols., 2006) já eram conhecidas.

Frente a esses nossos achados da ausência de efeitos quando da microinjeção de adenosina no NTS caudal, desconsideramos na nossa hipótese a possibilidade da formação da adenosina a partir do ATP, e, assim, a nossa segunda hipótese para explicar as razões da disparidade entre as respostas promovidas pelo ATP e pelo α,β -metileno-ATP foi baseada 1) na seletividade diferencial de ativação dos receptores P_2 (P_{2x} e P_{2y}); e 2) na localização e expressão diferenciais dos receptores purinérgicos P_{2x} e P_{2y} em sub-populações de neurônios fenotipicamente diferentes do NTS caudal, sub-populações essas que estariam envolvidas com as vias neurais de processamento de cada um dos componentes avaliados (simpático, parassimpático e respiratório).

Estudos de Paula e cols. (2004) mostraram que a microinjeção do ATP no NTS intermediário de ratos não-anestesiados promoveu uma resposta pressora mediada por simpato-excitação. Esses autores mostraram, ainda, que a resposta pressora ao ATP não foi atenuada pelo bloqueio dos receptores ionotrópicos do glutamato e nem pelo bloqueio dos receptores A_1 da adenosina. O fato da resposta pressora ao ATP não ter sido alterada após o bloqueio desses receptores consolidou a nossa hipótese de que a resposta simpato-excitatória ao ATP teria sido mediada pela interação do ATP com seus receptores P_{2x} pós-sinápticos, agindo como um neurotransmissor independente de ação rápida (Edwards e cols., 1992; Edwards e Gibb, 1993). A simpato-excitação ao ATP não ocorreria pela interação desse agonista com seus receptores P_{2x} pré-sinápticos, os quais estimulam a liberação do glutamato (Gu e Macdermott, 1997; Khakh e Henderson, 1998), e nem pela formação da adenosina, a partir da ação catabólica da 5'-ectonucleotidase sobre o ATP liberado na fenda sináptica (Ralevic e Burnstock, 1998; Zimmermann, 2000), e a conseqüente ação neuromoduladora da adenosina sobre a liberação de neurotransmissores

ou neuromoduladores pela sua interação com os receptores purinérgicos A_1 e A_{2a} (Barraco e cols., 1995; 1996; Scislo e cols., 2001). O ATP é o neurotransmissor endógeno dos receptores purinérgicos P_2 , e, portanto, é capaz de ativar tanto os receptores P_{2x} (ionotrópicos) quanto os P_{2y} (metabotrópicos) (Ralevic e Burnstock, 1998). O α,β -metileno-ATP é um agonista seletivo para os receptores purinérgicos P_{2x} , estável, i.e, não é catabolizado em adenosina na fenda sináptica pela 5'-ectonucleotidase, e que, portanto, exerce seus efeitos biológicos por meio da ativação exclusiva dos receptores P_{2x} pré- e pós-sinápticos (Ralevic e Burnstock, 1998). Assim como o ATP, a ativação dos receptores P_{2x} pré-sinápticos pelo α,β -metileno-ATP pode estimular a liberação do glutamato (Nakatsuka e Gu, 2001; Shigetomi e Kato, 2004).

Uma vez que o ATP não parece ter atuado, conforme sugestão do estudo de Paula e cols. (2004), por meio de mecanismos glutamatérgicos ionotrópicos e nem a partir da formação da adenosina para promover seu efeito pressor mediado pela estimulação simpática, e também que no presente trabalho promoveu simpato-excitação de mesma magnitude quando comparada àquela promovida pelo seu análogo não-catabolizável, o α,β -metileno-ATP, sugerimos que esses agonistas P_2 , o ATP e o α,β -metileno-ATP, parecem ter promovido os efeitos simpato-excitatórios ao ativarem os receptores P_{2x} pós-sinápticos de neurônios do NTS caudal. Essa hipótese relativa à simpato-excitação promovida por ambos os agonistas purinérgicos P_2 seria plausível somente se considerarmos a possibilidade de não haver a expressão de receptores pré-sinápticos P_{2y} e P_{2x} nos axônios dos neurônios do NTS caudal envolvidos com a resposta simpato-excitatória à ativação purinérgica. A simpato-excitação parece ter ocorrido em função dos neurônios geradores da atividade simpática da região pressora bulbar,

conhecida como RVLM, terem sido excitados pelos neurônios do NTS que foram estimulados pelos agonistas purinérgicos P_2 . A projeção excitatória do NTS para o RVLM foi demonstrada por meio de estudos eletrofisiológicos realizados por Koshiya e Guyenet (1996).

Conforme já mencionado, para explicarmos as razões das diferentes respostas promovidas pelo ATP e pelo α,β -metileno-ATP sobre os componentes avaliados precisam ser consideradas a localização e a expressão diferenciais dos sub-tipos de receptores purinérgicos em sub-populações de neurônios fenotipicamente diferentes do NTS caudal. Além disso, cada sub-população está envolvida no processamento de uma resposta específica. Uma vez mencionados esses aspectos, e acrescentando ainda as evidências que o glutamato promove bradicardia quando microinjetado no NTS caudal na preparação CTCl (Braga e cols., 2006); e que a ativação dos receptores B_2 inibe a liberação do glutamato (Mendoza-Fernandez e cols., 2000), a bradicardia ao ATP apresentou-se de menor magnitude em relação àquela ao α,β -metileno-ATP supostamente pelas seguintes razões: 1) o ATP atuaria a) sobre receptores P_{2x} pré-sinápticos, estimulando a liberação do glutamato (Nakatsuka e Gu, 2001; Shigetomi e Kato, 2004), o qual promoveria a bradicardia quando da microinjeção do ATP, e b) sobre os receptores P_{2y} (Ralevic e Burnstock, 1998) pré-sinápticos, os quais podem inibir a liberação do glutamato (Mendoza-Fernandez e cols., 2000), modulando o efeito bradicárdico ao ATP; enquanto que 2) o α,β -metileno-ATP ativaria apenas os receptores P_{2x} (Ralevic e Burnstock, 1998) pré-sinápticos, estimulando a liberação do glutamato (Nakatsuka e Gu, 2001; Shigetomi e Kato, 2004), sem a ocorrência de modulação mediada pelos B_2 pré-sinápticos. Essa nossa hipótese foi baseada no estudo de Paula e cols. (2004) no qual a

resposta bradicárdica ao ATP foi atenuada após a microinjeção prévia do ácido quinurênico, o que indica que o efeito bradicárdico ao ATP é mediado pela liberação do glutamato. O α,β -metileno-ATP atuando sobre os receptores P_{2x} pré-sinápticos poderia estimular a liberação do glutamato, liberação essa que não seria modulada pelos receptores P_{2y} pré-sinápticos, pois esses não são ativados pelo α,β -metileno-ATP; em função, pois, da ausência de modulação, a bradicardia ao α,β -metileno-ATP foi de maior magnitude que aquela ao ATP. A favor do envolvimento dos receptores P_{2x} pré-sinápticos na resposta bradicárdica, tanto ao ATP quanto ao α,β -metileno-ATP, estão o trabalho de de Paula e cols. (2004) no qual o PPADS atenuou a bradicardia ao ATP e o presente estudo no qual o PPADS atenuou a bradicardia ao α,β -metileno-ATP.

Uma vez que os aspectos gerais da nossa hipótese acerca das respostas autonômica e respiratória aos agonistas purinérgicos já foram destacados, resta-nos considerar a disparidade qualitativa das alterações da ANF observada frente à microinjeção do ATP e do α,β -metileno-ATP. Para tanto, vamos mais uma vez mencionar o papel do glutamato, porém, desta vez, atuando no controle da respiração. Foi observado num estudo do nosso laboratório (Bracciali, comunicação pessoal) realizado em ratos não-anestesiados que o bloqueio dos receptores ionotrópicos do glutamato no NTS caudal com ácido quinurênico promoveu um aumento da frequência respiratória basal. Isso nos leva a crer que o glutamato exerce um papel tônico inibitório da frequência respiratória basal. Além dessa evidência relativa ao papel do glutamato em inibir tonicamente a frequência respiratória, também já foi mostrado que a microinjeção do glutamato no NTS caudal na preparação CTCI (Braga e cols., 2006) e a microinjeção dos agonistas de receptores ionotrópicos do glutamato (AMPA e NMDA) no NTS caudal

de ratos não-anestesiados (Almado e Machado, 2005) promoveram redução da atividade respiratória (apnéia). A nossa hipótese acerca dos efeitos do ATP e do α,β -metileno-ATP sobre a ANF (frequência respiratória) baseia-se nos seguintes fatos: 1) o glutamato parece inibir tonicamente a frequência respiratória (Braccialli, comunicação pessoal); 2) a ativação dos receptores P_{2y} pré-sinápticos pelo ATP promove uma inibição da liberação do glutamato (Mendoza-Fernandez e cols., 2000); 3) a ativação seletiva dos receptores P_{2x} pré-sinápticos pelo α,β -metileno-ATP estimula a liberação do glutamato (Shigetomi e Kato, 2004); e na suposição que 4) sub-populações distintas de neurônios fenotipicamente diferentes entre si a) quanto à expressão de receptores P_2 e b) quanto às suas projeções para diferentes áreas envolvidas no controle central da respiração estariam envolvidas nas respostas ventilatórias à ativação purinérgica P_2 . Nesse contexto, o ATP atuaria sobre os receptores P_{2y} , os quais inibem a liberação do glutamato (Mendoza-Fernandez e cols., 2000), teriam maior expressão que os P_{2x} pré-sinápticos e estariam exclusivamente localizados em neurônios do NTS que seriam estimulados pelo glutamato e que enviariam projeções excitatórias para neurônios inspiratórios, fazendo com que a ANF aumentasse. O ATP ao ativar os receptores P_{2y} , os quais inibem a liberação do glutamato, promoveu um aumento da ANF, aumento esse que também ocorreu quando foram antagonizados os receptores ionotrópicos do glutamato (Braccialli, comunicação pessoal). O envolvimento exclusivo dos receptores P_{2y} na respiração foi estudado apenas no trabalho de Gourine e cols. (2005). Esses autores mostraram que a aplicação de UTP (agonista seletivo de receptores P_{2y}) na superfície ventral do bulbo promoveu um aumento na atividade respiratória (taquipnéia). O α,β -metileno-ATP é um agonista seletivo para receptores P_{2x} (Ralevic e Burnstock, 1998; Burnstock, 2006) que ao atuar

nos receptores P_{2x} pré-sinápticos libera glutamato (Jin e cols., 2004; Shigetomi e Kato, 2004). Estudos de Almado e Machado (2005) e de Braga e cols. (2006) mostraram que o glutamato promoveu um efeito apnéico quando microinjetado no NTS caudal. Assim, o α,β -metileno-ATP atua sobre os receptores P_{2x} pré-sinápticos, os quais estimulariam a liberação do glutamato (Shigetomi e Kato, 2004), teriam menor expressão que os P_{2y} e estariam localizados em neurônios do NTS caudal que seriam estimulados pelo glutamato e enviariam projeções excitatórias para neurônios expiratórios, prolongando o intervalo entre os disparos do nervo frênico. Uma outra possibilidade seria que a liberação do glutamato pelo α,β -metileno-ATP poderia estimular os neurônios do NTS (grupo respiratório dorsal), neurônios inspiratórios do tipo **B**, os quais por sua vez inibem a atividade dos neurônios inspiratórios do tipo **Ia**, promovendo a apnéia. No NTS os neurônios **Ib** são estimulados e inibem os neurônios **Ia** quando da ativação do reflexo de insuflação pulmonar de Hering-Breuer (Bonham e McCrimmon, 1990; Bonham e cols., 1993).

O bloqueio dos receptores purinérgicos ionotrópicos P_{2x} e a neurotransmissão do quimiorreflexo no NTS caudal

Uma vez determinada a concentração do PPADS (20 mM), efetiva em antagonizar os efeitos promovidos pela microinjeção do agonista (α,β -metileno-ATP; 50 mM), testamos a nossa hipótese de que os receptores P_{2x} estariam envolvidos com a neurotransmissão dos componentes simpato-excitatório e respiratório do quimiorreflexo no NTS caudal por meio de ativações do quimiorreflexo com KCN (0,05%) antes e 2, 10, 30 e 45 minutos após o bloqueio dos receptores purinérgicos P_{2x} .

O antagonismo dos receptores purinérgicos P_{2x} realizado por meio da microinjeção bilateral do PPADS no NTS caudal não afetou as respostas autonômicas e respiratórias promovidas pela ativação do quimiorreflexo, indicando que o ATP não participaria isoladamente do processamento das respostas quimiorreflexas.

Diferente dos nossos achados, estudos de Paton e cols. (2002) mostraram que a microinjeção bilateral do PPADS no NTS caudal na preparação CTCl atenuou a bradicardia do quimiorreflexo. De acordo com os resultados de Braga e Machado (2006), a microinjeção bilateral do ácido quinurênico no NTS caudal na preparação CTCl foi capaz de atenuar a bradicardia do quimiorreflexo, indicando que o glutamato está envolvido nessa resposta; o envolvimento do glutamato na bradicardia do quimiorreflexo também foi observado nos estudos de Haibara e cols. (1995; 1999). Paton e cols. (2002) observaram que a resposta taquipnéica do quimiorreflexo não foi atenuada após a microinjeção bilateral do PPADS no NTS caudal, o que está de acordo com os nossos resultados. Também estão de acordo com os achados do presente trabalho estudos em andamento no nosso laboratório (Braccialli, comunicação pessoal) no qual a microinjeção bilateral do PPADS no NTS caudal de ratos não-anestesiados não alterou a resposta taquipnéica do quimiorreflexo, e os estudos de Braga e cols. no qual as respostas simpato-excitatória e bradicárdica do quimiorreflexo também não foram atenuadas após microinjeções do PPADS no NTS intermediário (bilateral) e caudal (medial) de ratos não-anestesiados.

O duplo bloqueio (bloqueio dos receptores P_{2x} e dos receptores ionotrópicos do glutamato) e a neurotransmissão dos componentes simpato-excitatório e ventilatório do quimiorreflexo

A neurotransmissão mediada simultaneamente pelo glutamato e pelo ATP está sendo consideravelmente estudada em diversas estruturas do sistema nervoso central, inclusive nos neurônios do NTS caudal, de modo que existem vários trabalhos relativos às interações sinápticas entre mecanismos purinérgicos e glutamatérgicos (Kato e Shigetomi, 2001; Jin e cols., 2004; Shigetomi e Kato, 2004). Foi mostrado que a ativação dos receptores P_{2x} pré-sinápticos dos terminais de axônios de neurônios excitatórios estimulou a liberação sináptica do glutamato em culturas de neurônios da medula espinhal (Gu e Macdermott, 1997). Estudos de Nakatsuka e Gu (2001) mostraram que o α,β -metileno-ATP estimulou a liberação sináptica do glutamato em fatias da lâmina V do corno dorsal da medula espinhal de ratos. Além da interação entre o ATP e o glutamato, já foi documentada também a ocorrência de uma interação modulatória sobre o sistema cardiovascular envolvendo ATP, glutamato e noradrenalina no locus coeruleus de ratos anestesiados (Yao e Lawrence, 2005).

A interação entre o ATP e o glutamato nos neurônios do NTS caudal foi primeiramente estudada por Kato e Shigetomi (2001). Nesse estudo foi documentado, em neurônios de segunda ordem do NTS caudal, que o ATP atuando pré-sinápticamente nos receptores P_{2x} estimulou a liberação do glutamato, e que o ATP após ser catabolizado em adenosina, e essa ter atuado nos seus receptores A₁ pré-sinápticos, inibiu a liberação do glutamato. Estudos de Jin e cols (2004) mostraram que a ativação dos receptores purinérgicos P_{2x} pelo α,β -metileno-ATP no NTS caudal promoveu liberação do

glutamato, e Shigetomi e Kato (2004) mostraram que o α,β -metileno-ATP estimulou a liberação do glutamato em neurônios do NTS caudal por um mecanismo dependente de canais de Ca^{+2} . Portanto, há evidências na literatura a favor da interação entre o glutamato e o ATP no NTS, especialmente na sub-região caudal do NTS, onde foram feitas as nossas microinjeções. Diante desse cenário na literatura relativo à interação entre o ATP e o glutamato no NTS caudal, e levando-se em consideração 1) os achados do presente trabalho no qual o α,β -metileno-ATP, assim como o ATP, promoveu simpato-excitação, e que apenas o bloqueio dos receptores purinérgicos P_{2x} não alterou as respostas quimiorreflexas; e 2) os achados de outros trabalhos realizados no nosso laboratório nos quais foi mostrado que a microinjeção do glutamato no NTS caudal na preparação CTCl também promoveu simpato-excitação (Braga e cols., 2006), e que apenas o bloqueio dos receptores ionotrópicos glutamatérgicos não alterou a resposta simpato-excitatória do quimiorreflexo (Machado e Bonagamba, 2005; Braga e Machado, 2006) e também não afetou a resposta taquipnéica desse reflexo (Braga e Machado, 2006), testamos a nossa hipótese que poderia ocorrer uma interação purinérgica e glutamatérgica nas vias neurais do quimiorreflexo no NTS caudal. Uma vez que foram estabelecidas a) no presente estudo a concentração do antagonista de receptores purinérgicos P_{2x} (PPADS, 20 mM), efetiva em antagonizar em mais de 50% a magnitude das respostas à DE_{50} do agonista (α,β -metileno-ATP), e b) no estudo de Braga e cols. (2006) a concentração efetiva do antagonista não-seletivo de receptores ionotrópicos glutamatérgicos (ácido quinurênico, KYN, 250 mM), realizamos um protocolo experimental no qual as respostas autonômicas e respiratórias decorrentes da ativação do quimiorreflexo foram avaliadas antes e após microinjeções bilaterais e seqüenciais do ácido quinurênico (antagonista

ionotrópico glutamatérgico) e do PPADS (antagonista ionotrópico purinérgico, P_{2x}) no NTS caudal. Por meio da realização desse protocolo de duplo bloqueio, constatamos, pela primeira vez, que a resposta simpato-excitatória do quimiorreflexo foi significativamente atenuada.

A resposta simpato-excitatória promovida pela ativação do quimiorreflexo não tinha sido bloqueada, de acordo com o estudo de Braga e Machado (2006) na preparação CTCL no NTS caudal, 1) após a microinjeção bilateral do ácido quinurênico (KYN); 2) após a microinjeção bilateral do MCPG (antagonista de receptores metabotrópicos do glutamato); 3) após microinjeções bilaterais e seqüenciais do KYN e do MCPG, ou seja, após o bloqueio simultâneo dos receptores iônico e metabotrópicos do glutamato no NTS caudal; e nem no presente estudo 4) após a microinjeção bilateral do PPADS no NTS caudal. Os dados apresentados no presente estudo mostram que a simpato-excitação quimiorreflexa é bloqueada apenas sob a condição do bloqueio simultâneo dos receptores ionotrópicos do ATP e do glutamato.

A atenuação do componente simpato-excitatório do quimiorreflexo no NTS caudal na preparação CTCL, após o duplo bloqueio, verificada no nosso protocolo experimental, também foi observada num estudo realizado em ratos não-anestesiados no nosso laboratório (Braga e cols.). Esses autores ativaram o quimiorreflexo com KCN antes e 3, 10, 30 e 60 minutos após microinjeções seqüenciais do ácido quinurênico (KYN) e do PPADS nas sub-regiões intermediária e caudal do NTS. Como o KYN promove um aumento da PA basal (Haibara e cols., 1999; Machado e Bonagamba, 2005), aos 3, 10 e 30 minutos após as microinjeções daqueles antagonistas no NTS o quimiorreflexo foi ativado durante a infusão i.v. de nitroprussiato de sódio (NPS) para a

normalização da PA. Nessas condições experimentais foi observada uma atenuação da resposta pressora do quimiorreflexo após o duplo bloqueio. Portanto, de acordo com os dados obtidos no presente estudo realizado na preparação CTCI, assim como naquele estudo de Braga e cols. realizado em ratos não-anestesiados, o ATP e o glutamato parecem atuar conjuntamente na neurotransmissão do componente simpato-excitatório do quimiorreflexo no NTS caudal.

Considerando-se a limitação da nossa técnica, i.e., microinjeções de antagonistas no NTS, podemos sugerir o envolvimento de sub-populações distintas de neurônios, os quais a) se utilizariam de neurotransmissores diferentes, como o glutamato e o ATP; b) expressariam predominantemente em suas membranas receptores purinérgicos ou glutamatérgicos; e c) enviariam projeções para diferentes centros integradores do sistema nervoso central relacionados com a geração ou a modulação da atividade eferente simpática, como, por exemplo, o RVLM, o núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) e o núcleo parabraquial (PBN). Uma vez que no procedimento cirúrgico para a obtenção da preparação CTCI é feita uma descerebração e uma transecção suprajacente ao colículo superior, não podemos considerar o papel do PVN na modulação da atividade eferente simpática nessa abordagem experimental. As considerações citadas acima são válidas para explicar as razões pelas quais a microinjeção bilateral no NTS caudal de apenas um dos antagonistas - no caso deste nosso estudo, o PPADS, ou no caso do estudo de Braga e Machado (2006), o KYN - não atenuou a resposta simpato-excitatória do quimiorreflexo no NTS caudal. Nesse contexto, quando do bloqueio dos receptores de um dos neurotransmissores, o outro neurotransmissor assumiria o papel na via neural, recrutando uma sub-população diferente de neurônios, os quais enviariam projeções excitatórias para

uma outra região do SNC envolvida com resposta simpato-excitatória do quimiorreflexo. Uma provável via neural adicional, recrutada supostamente quando do bloqueio da outra via, caracterizaria o processamento neural do quimiorreflexo como um sistema de redundância. Nesse sentido, a única maneira de se abolir a simpato-excitação quimiorreflexa seria por meio do bloqueio concomitante dos receptores dos dois neurotransmissores.

A atenuação da resposta bradicárdica do quimiorreflexo após o duplo bloqueio observada no presente estudo era esperada, pois já tinha sido mostrado a) nos estudos de Braga e Machado (2006) que a microinjeção bilateral do ácido quinurênico (KYN) no NTS caudal promoveu uma atenuação da resposta bradicárdica do quimiorreflexo e b) nos estudos de Haibara e cols. (1995) que o componente parassimpático do quimiorreflexo no NTS é mediado pelos receptores NMDA. Portanto, apenas o bloqueio dos receptores ionotrópicos glutamatérgicos já é suficiente para atenuar a bradicardia quimiorreflexa. O achado do presente trabalho no qual o duplo bloqueio não promoveu uma atenuação de maior magnitude na bradicardia do quimiorreflexo quando comparada àquela atenuação promovida após a microinjeção do KYN no NTS caudal [Braga e Machado (2006)] está de acordo com os achados anteriores.

Embora tenha ocorrido uma atenuação significativa das respostas simpato-excitatória e parassimpato-excitatória do quimiorreflexo após o bloqueio simultâneo dos receptores ionotrópicos purinérgicos e glutamatérgicos no NTS caudal, a resposta taquipnéica desse reflexo não foi atenuada após o duplo bloqueio no NTS caudal. Diante desses achados, percebemos que, diferente do processamento autonômico do quimiorreflexo, o processamento do componente respiratório desse reflexo não parece

limitar-se ao envolvimento dos neurotransmissores ATP e glutamato, pelo menos ao nível do NTS caudal. O componente ventilatório do quimiorreflexo não deveria realmente ser, e parece não ser, processado a partir de uma única região, o NTS caudal. Assim, o duplo bloqueio dos receptores ionotrópicos do ATP e do glutamato no NTS caudal não foi capaz de atenuar a principal resposta quimiorreflexa, a taquipnéia, a qual parece contar com vias neurais alternativas. No estudo de Braga e Machado (2006) foi mostrado que a microinjeção bilateral do ácido quinurênico (KYN), do MCPG ou da combinação de ambos os antagonistas no NTS caudal na preparação CTCI também não alterou a resposta taquipnéica do quimiorreflexo, indicando que o glutamato, pelo menos no NTS caudal, não parece estar envolvido com a neurotransmissão do componente ventilatório do quimiorreflexo. No presente estudo, a microinjeção do PPADS no NTS caudal também não afetou a taquipnéia quimiorreflexa, implicando que o ATP também não parece estar envolvido nessa resposta. A microinjeção bilateral e seqüencial de ambos os antagonistas (KYN e PPADS) no NTS caudal no presente estudo e no estudo de Braga e cols. realizado em ratos não-anestesiados, não afetou o componente ventilatório do quimiorreflexo, indicando que esse componente não parece ser mediado pelos neurotransmissores ATP e glutamato, pelo menos no NTS caudal.

6. SUMÁRIO

- A microinjeção do α,β -metileno-ATP promoveu bradicardia, simpato-excitação e redução na atividade do nervo frênico, enquanto que a microinjeção do ATP gerou bradicardia, simpato-excitação e aumento na atividade do nervo frênico.
- Os efeitos promovidos pela microinjeção do ATP não parecem ser decorrentes de sua degradação em adenosina, uma vez que a microinjeção dessa purina não promoveu nenhuma alteração nos parâmetros registrados. Especialmente quanto à ANF o efeito do ATP parece ser dependente da ativação dos receptores P_{2y} de neurônios do NTS caudal envolvidos, direta ou indiretamente, com a modulação da fase inspiratória do ciclo respiratório.
- O antagonista de receptores purinérgicos, PPADS, foi efetivo no bloqueio das respostas promovidas pela microinjeção do α,β -metileno-ATP, porém não afetou as respostas do quimiorreflexo, indicando que apenas o bloqueio dos receptores ionotrópicos purinérgicos no NTS caudal não afeta a neurotransmissão dos componentes autonômico e ventilatório do quimiorreflexo.
- As microinjeções bilaterais do PPADS ou da combinação PPADS + KYN não alteraram a resposta taquipnéica do quimiorreflexo, sugerindo que o componente ventilatório do quimiorreflexo parece não ser dependente de mecanismos purinérgicos e glutamatérgicos, pelo menos ao nível do NTS caudal.

- A resposta simpato-excitatória do quimiorreflexo foi significativamente atenuada apenas após o duplo bloqueio dos receptores purinérgicos e glutamatérgicos, implicando na participação conjunta de mecanismos purinérgicos e glutamatérgicos na neurotransmissão do componente simpático do quimiorreflexo no NTS caudal.

7. CONCLUSÕES

A neurotransmissão do componente respiratório do quimiorreflexo no NTS caudal não parece ser mediada pelos sistemas purinérgico e glutamatérgico, enquanto a neurotransmissão do componente simpato-excitatório do quimiorreflexo no NTS caudal parece ser dependente desses sistemas, os quais atuam por meio de mecanismos que ainda precisam ser estudados e esclarecidos.

8. RESUMO

Diante das evidências encontradas na literatura que: a) o componente simpato-excitatório do quimiorreflexo não é alterado após o antagonismo dos receptores ionotrópicos e/ou metabotrópicos do glutamato (Haibara e cols., 1999; Machado e Bonagamba, 2005; Braga e Machado, 2006); b) a microinjeção de glutamato no NTS caudal promove simpato-excitação (Braga e cols., 2006); c) ocorre uma interação entre o ATP e o glutamato nos neurônios do NTS caudal (Kato e Shigetomi, 2001; Shigetomi e Kato, 2004; Jin e cols., 2004); e d) a microinjeção do ATP no NTS caudal promove respostas pressora e taquipnéica semelhantes àsquelas do quimiorreflexo (Antunes e cols., 2005a; 2005b), o principal objetivo do presente trabalho foi avaliar se o ATP atuando sobre os receptores P_{2x} e interagindo com o glutamato estaria envolvido na neurotransmissão dos componentes simpato-excitatório e respiratório do quimiorreflexo no NTS caudal.

Utilizamos em todo o nosso estudo a preparação coração-tronco cerebral isolados, a qual a) consiste numa preparação descerebrada, não sendo necessário, pois, o uso de anestésicos durante os experimentos; b) permite o registro direto da atividade simpática e do nervo frênico; c) é retrogradamente perfundida a uma pressão de perfusão média de 65 mmHg, funcionando, portanto, sem a influência tônica do barorreflexo; e d) apresenta a superfície dorsal do tronco cerebral exposta, o que facilita as microinjeções no NTS, aumentando o índice de acerto.

Nossos resultados mostraram que a microinjeção do α,β -metileno-ATP, agonista de receptores purinérgicos P_{2x} , promoveu bradicardia, simpato-excitação e redução na ANF, enquanto que a microinjeção do ATP gerou bradicardia, simpato-excitação e aumento na ANF. Os efeitos promovidos pela microinjeção do ATP não parecem ser

decorrentes de sua degradação em adenosina, pois a microinjeção dessa purina, na concentração máxima testada (35 mM), não promoveu nenhuma alteração na FC, ANF ou ANSt. Por essa razão, parece que a disparidade entre os efeitos promovidos pelos agonistas P_2 , α,β -metileno-ATP e ATP, pode ser atribuída à interação do ATP com seus receptores P_{2y} . O antagonista de receptores purinérgicos P_{2x} , PPADS (20 mM), foi efetivo no bloqueio das respostas promovidas pela microinjeção do α,β -metileno-ATP, porém não afetou as respostas do quimiorreflexo. As microinjeções bilaterais do PPADS ou da combinação PPADS + KYN (duplo bloqueio) não afetaram a resposta taquipnéica do quimiorreflexo, indicando que os receptores ionotrópicos purinérgicos e glutamatérgicos, pelo menos ao nível do NTS caudal, não parecem estar envolvidos com processamento dessa resposta. A resposta simpato-excitatória do quimiorreflexo foi significativamente atenuada após o duplo bloqueio dos receptores purinérgicos e glutamatérgicos.

Diante desses achados concluímos que a neurotransmissão do componente respiratório do quimiorreflexo no NTS caudal não parece ser mediada pelos sistemas glutamatérgico e purinérgico, enquanto a neurotransmissão do componente simpato-excitatório do quimiorreflexo no NTS caudal envolve esses dois sistemas, os quais atuam por meio de mecanismos que ainda precisam ser estudados e esclarecidos.

9. ABSTRACT

Considering the following evidences: a) chemoreflex sympathoexcitatory component is not altered after the antagonism of ionotropic and/or metabotropic glutamatergic receptors in the NTS (Haibara e cols., 1999; Machado e Bonagamba, 2005; Braga e Machado, 2006); b) glutamate microinjection into caudal NTS evokes sympathoexcitation (Braga e cols., 2006); c) interaction involving ATP and glutamate takes place in the caudal NTS neurons (Kato e Shigetomi, 2001; Shigetomi e Kato, 2004; Jin e cols., 2004); and d) ATP microinjection into caudal NTS produces pressor and tachypnoeic responses similar to those evoked by chemoreflex activation, the main aim of this study was to evaluate whether ATP acting on P_{2x} receptors and interacting together with glutamate would be playing a role in the mediation of the sympathoexcitatory and respiratory components of the chemoreflex at caudal NTS level.

Our study was performed in the working heart brain stem preparation, which a) is a decerebrated preparation, and, therefore, anaesthetics are not necessary during experiments; b) permits direct recordings of the sympathetic and phrenic nerves; c) is retrogradely perfused under perfusion pressure of 65 mmHg, working, thus, without the tonic influence of the baroreflex; and d) presents exposed dorsal surface of the brain stem, which facilitates the microinjections into the NTS, increasing the index of positive histologies.

The results showed that α, β -methylene-ATP microinjection evoked bradycardia, sympathoexcitation and decrease in the frequency of phrenic nerve activity, whereas ATP microinjection evoked bradycardia, sympathoexcitation and increase in the frequency of phrenic nerve activity. Effects produced by ATP microinjection do not seem to be due to ATP catabolism, since Adenosine microinjection, in a maximum used concentration (35

mM), did not change any recorded parameters. Thus, it seems that the differences between the responses produced by microinjection of P₂ receptors agonists, α -methylene-ATP and ATP, can be attributed to ATP action on its P_{2y} receptors. PPADS (20 mM), a purinergic receptors antagonist, antagonized the responses evoked by α -methylene-ATP microinjection, however it did not change chemoreflex responses. Bilateral microinjections of PPADS or both PPADS and KYN (double blockade) did not modify the chemoreflex tachypnoea, indicating that ionotropic, purinergic and glutamatergic receptors, at least at caudal NTS level, does not seem to play a role in this response. Chemoreflex sympathoexcitation was significantly attenuated following double blockade on purinergic and glutamatergic receptors.

We conclude that the neurotransmission of the chemoreflex respiratory component at caudal NTS level does not seem to be mediated by either purinergic or glutamatergic system, whereas the neurotransmission of the chemoreflex sympathoexcitatory component at caudal NTS level involves these two systems, which work by means of mechanisms that need to be studied and elucidated.

10. REFERÊNCIAS

- Accorsi-Mendonca D, Leao RM, Aguiar JF, Varanda WA e Machado BH.** Urethane inhibits the GABAergic neurotransmission in the nucleus of solitary tract (NTS) of rat brainstem slices. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.*, 292(1): 396-402, 2007.
- Almado CEL e Machado BH.** Respiratory and autonomic responses to microinjection of NMDA and AMPA into the commissural subnucleus of the NTS of awake rats. *Brain Res.*, 1063(1): 59-68, 2005.
- Antunes VR, Bonagamba LGH e Machado BH.** Hemodynamic and respiratory responses to microinjection of ATP into the intermediate and caudal NTS of awake rats. *Brain Res.*, 1032(2): 85-93, 2005a.
- Antunes VR, Braga VA e Machado BH.** Autonomic and respiratory responses to microinjection of ATP into the intermediate or caudal nucleus tractus solitarius in the working heart-brainstem preparation of the rat. *Clin Exp Pharmacol Physiol.*, 32, 467-472, 2005b.
- Barraco RA, Clough-Helfman C, Goodwin BP, e Anderson GF.** Evidence for presynaptic adenosine A2a receptors associated with norepinephrine release and their desensitization in the rat nucleus tractus solitarius. *J Neurochem.*, 65(4): 1604-11, 1995.
- Barraco RA, el-Ridi MR, Ergene E e Phillis JW.** Adenosine receptor subtypes in the brainstem mediate distinct cardiovascular response patterns. *Brain Res Bull.*, 26(1): 59-84, 1991.
- Barraco RA, Janusz CJ, Polasek PM, Parizon M e Roberts PA.** Cardiovascular effects of microinjection of adenosine into the nucleus tractus solitarius. *Brain Res Bull.*, 20(1): 129-32, 1988.

- Barraco RA, O'Leary DS, Ergene E e Scislo TJ.** Activation of purinergic receptor subtypes in the nucleus tractus solitarius elicits specific regional vascular response patterns. *J Auton Nerv Syst.*, 59(3): 113-24, 1996.
- Barros RC, Bonagamba LG, Okamoto-Canesin R, de Oliveira M, Branco LG e Machado BH.** Cardiovascular responses to chemoreflex activation with potassium cyanide or hypoxic hypoxia in awake rats. *Auton Neurosci.*, 97(2): 110-5, 2002.
- Biscoe TJ, Sampson SR e Purves MJ.** Stimulus response curves of single carotid body chemoreceptor afferent fiber. *Nature.*, 215, 654-655, 1967.
- Biscoe TJ, Bradley GW e Purves MJ.** The relation between carotid body chemoreceptor activity and carotid sinus pressure in the cat. *J. Physiol.*, 203, 40, 1969.
- Biscoe TJ e Dundren MR** Monitoring PO₂ by the carotid chemoreceptor. *News in Physiol. Sci.*, 5, 229-233, 1990.
- Bonham AC e Mccrimmon DR.** Neurons in a discrete region of the nucleus tractus solitarius are required for the Breuer-Hering reflex in rat. *J. Physiol.*, 427, 261-80, 1990.
- Bonham AC, Coles SK e Mccrimmon DR.** Pulmonary stretch receptor afferents activate excitatory amino acid receptors in the nucleus tractus solitarii in rats. *J. Physiol.*, 464, 725-45, 1993.
- Braga VA e Machado BH.** Chemoreflex sympathoexcitation is not altered by the antagonism of glutamate receptors in the commissural NTS in the working heart-brainstem preparation of rat. *Exp Physiol.*, 91, 551-559, 2006.

Braga VA, Antunes VR e Machado BH. Autonomic and respiratory responses to microinjection of L-glutamate into the commissural subnucleus of the NTS in the working heart-brainstem preparation of the rat. *Brain Res.*, 1093, 150-60, 2006.

Braga VA, Soriano RN, Bracciali AL, de Paula PM, Bonagamba LGH, Paton JFR e Machado BH. Involvement of L-glutamate and ATP in the neurotransmission of the sympathoexcitatory component of the chemoreflex in the commissural NTS of awake rats and in the working heart brainstem preparation. Artigo submetido ao: *Journal of Physiology*.

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

Burnstock G. Development and perspectives of the purinoceptor concept. *J Auton Pharmacol.*, 16(6): 295-302, 1996.

Burnstock G. Historical review: ATP as a neurotransmitter. *Trends Pharmacol Sci.*, 27(3): 166-76, 2006.

Callera JC, Sévoz C, Laguzzi R e Machado B.H. Microinjection of serotonin₃ receptor agonist into the NTS of unanesthetized rats inhibits the cardiovagal component of the baro- and chemoreflex. *J Auton Nerv Syst.*, 63, 127-136, 1997.

Callera JC, Bonagamba LGH, Nosjean A, Laguzzi R e Machado BH Activation of GABA_A but not GABA_B receptors in the NTS blocked bradycardia of chemoreflex in awake rats. *Am J Physiol.*, 276, H1902-1910, 1999.

Chamberlin NL e Saper CB. Topographic organization of respiratory responses to glutamate microstimulation of the parabrachial nucleus in the rat. *J Neurosci.*, 326(2): 245-62, 1994.

- Chamberlin NL e Saper CB.** A brainstem network mediating apneic reflexes in the rat. *J Neurosci.*,18(15): 6048-56, 1998.
- Chitravanshi VC, Kachroo A e Sapru HN.** A midline area in the nucleus commissuralis of NTS mediates the phrenic nerve responses to carotid chemoreceptor stimulation. *Brain Research.*, 662(1-2): 127-133, 1994.
- Chitravanshi VC e Sapru HN.** Chemoreceptor-sensitive neurons in commissural subnucleus of nucleus tractus solitarius of the rat. *Am. J. Physiol.*, 268(4 Pt 2): 851-8, 1995.
- Ciriello J, Hochstenbach SL e Roder S.** Central projections of baroreceptor afferent fiber in the rat. *Nucleus of the Solitary Tract.* Edited by Robin A. Barraco, CRC Press, London, 35-50, 1994.
- Colombari E, Bonagamba LGH e Machado BH.** Mechanisms of pressor and bradycardic responses to L-glutamate microinjected into the NTS of conscious rats. *Am J Physiol.*, 266(3): 730-738, 1994.
- de Paula PM e Machado BH.** Antagonism of adenosine A₁ receptors in the NTS does not affect the chemoreflex in awake rats. *Am J Physiol.*, 281(6): R2072-78, 2001.
- de Paula PM, Antunes VR, Bonagamba LGH e Machado BH.** Cardiovascular responses to microinjection of ATP into the nucleus tractus solitarii of awake rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.*, 287(5): R1164-71, 2004.
- Edwards FA e Gibb AJ.** ATP: a fast neurotransmitter. *FEBS Lett.*, 325(1-2): 86-9, 1993.
- Edwards FA, Gibb AJ e Colquhoun D.** ATP receptor-mediated synaptic currents in the central nervous system. *Nature.* 359(6391): 144 -7, 1992.

- Ergene E, Dunbar JC, O'Leary DS e Barraco RA.** Activation of P2-purinoceptors in the nucleus tractus solitarius mediate depressor responses. *Neurosci Lett.* 174(2): 188-92, 1994.
- Fagura MS, Jarvis GE, Dougall IG e Leff P.** Adventures in the pharmacological analysis of P2 receptors. *J Auton Nerv Syst.* 81(1-3): 178-86, 2000.
- Franchini KG e Krieger EM.** Cardiovascular responses of conscious rats to carotid body chemoreceptor stimulation by intravenous injection of KCN. *J. Autonom. Nerv. Syst.*, 42, 63-70, 1993.
- Fredholm BB.** Purinoceptors in the nervous system. *Pharmacol Toxicol.*, 76(4): 228-39, 1995.
- González C, López-López RJ, Obeso A, Pérez-García MT e Roecher A** Cellular mechanisms of oxygen chemoreception in carotid body. *Respiration Physiol.*, 102, 137-147, 1995.
- Gordon FJ e Talman WT.** Role of excitatory amino acids and their receptors in bulbospinal control of cardiovascular function. In: *Central Neural Mechanisms in Cardiovascular Regulation*. Edited by Kunos, G. e Ciriello, J., Birkhauser, Boston, 209–225, 1992.
- Gourine AV, Llaudet E, Dale N e Spyer KM.** ATP is a mediator of chemosensory transduction in the central nervous system. *Nature.* 436(7047): 108-11, 2005.
- Gu JG e MacDermott AB.** Activation of ATP P2X receptors elicits glutamate release from sensory neuron synapses. *Nature.* 389(6652): 749-53, 1997.

Haibara AS, Colombari E, Chianca-Jr DA, Bonagamba LGH e Machado BH. NMDA receptors in NTS are involved in bradycardic but not in pressor response of chemoreflex. *Am. J. Physiol.*, 26, 1421-1427, 1995.

Haibara AS, Bonagamba LGH e Machado BH. Sympathoexcitatory neurotransmission of the chemoreflex in the NTS of awake rats. *Am. J. Physiol.*, 276(45): 69-80, 1999.

Jin YH, Bailey TW, Li BY, Schild JH e Andresen MC. Purinergic and vanilloid receptor activation releases glutamate from separate cranial afferent terminals in nucleus tractus solitarius. *J Neurosci.*, 24(20): 4709-4717, 2004.

Kalia M e Sullivan JM. Brainstem projections of sensory and motor components of the vagus nerve in the rat. *J Comp Neurol.*, 211(3): 248-65, 1982.

Kato F e Shigetomi E. Distinct modulation of evoked and spontaneous EPSCs by purinoceptors in the nucleus tractus solitarii of the rat. *J. Physiol.*, 530(3): 1311-28, 2001.

Khakh BS e Henderson G. ATP receptor-mediated enhancement of fast excitatory neurotransmitter release in the brain. *Mol Pharmacol.*, 54(2): 372-8, 1998.

Kitchen AM, O'Leary DS e Scislo TJ. Sympathetic and parasympathetic component of bradycardia triggered by stimulation of NTS P2X receptors. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*, 290(2): H807-812, 2005.

Koshiya N e Guyenet P. Role of the pons in the carotid sympathetic chemoreflex. *Am J Physiol.*, 267(2): R508-R518, 1994.

Koshiya N e Guyenet P. NTS neurons with carotid chemoreceptor inputs arborize in the rostral ventrolateral medulla. *Am. J. Physiol.*, 270, R1273-78, 1996.

- Llewellyn-Smith IJ e Burnstock G.** Ultrastructural localization of P2X3 receptors in rat sensory neurons. *Neuroreport.* 9(11): 2545-2550, 1998.
- Loewy AD.** Central autonomic pathways. *Central Regulation of Autonomic Functions*, New York, Oxford University Press, 88-103, 1990.
- Machado BH e Bonagamba LG.** Antagonism of glutamate receptors in the intermediate and caudal NTS of awake rats produced no changes in the hypertensive response to chemoreflex activation. *Auton Neurosci.* 117(1): 25-32, 2005.
- Mendoza-Fernandez V, Andrew RD e Barajas-Lopez C.** ATP inhibits glutamate synaptic release by acting at P2Y receptors in pyramidal neurons of hippocampal slices. *J Pharmacol Exp Ther.*, 293(1): 172-9, 2000.
- Mifflin SW.** Arterial chemoreceptor input to nucleus tractus solitarius. *Am. J. Physiol.* 263(32): 362-375, 1992.
- Mizusawa A, Ogawa H, Kikuchi Y, Hida W, Kurosawa O, Okabe S, Takishima T e Shirato K.** In vivo release of glutamate in nucleus tractus solitarii of the rat during hypoxia. *J. Physiol.*, 478, 55–65, 1994.
- Nakatsuka T e Gu JG.** ATP P2X receptor -mediated enhancement of glutamate release and evoked EPSCs in dorsal horn neurons of the rat spinal cord. *J Neurosci.*, 21(17): 6522-31, 2001.
- Paton JFR.** A working heart-brainstem preparation of the mouse. *Journal of Neuroscience Methods*, 65, 63-68, 1996.
- Paton JFR, de Paula PM, Spyer KM, Machado BH e Boscan P.** Sensory afferent selective role of P2 receptors in the nucleus tractus solitarii for mediating the

cardiac component of the peripheral chemoreceptor reflex in rats. *J Physiol.* 543(Pt 3): 995-1005, 2002.

Paxinos, G. e Watson, C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates.* Academic Press, New York, 1996.

Pimentel FF, Bonagamba LGH e Machado BH. Pressor response to chemoreflex activation before and after microinjection of glycine into the NTS of awake rats. *Am J Physiol.*, 284, R1000-9, 2003.

Potts JT, Spyer KM e Paton JF. Somatosympathetic reflex in a working heart-brainstem preparation of the rat. *Brain Res Bull.*, 53(1): 59-67, 2000.

Ralevic V e Burnstock G. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev.*, 50(3): 413-92, 1998.

Scislo TJ, Augustyniak RA, Barraco RA, Woodbury DJ e O'Leary DS. Activation of P2x-purinoceptors in the nucleus tractus solitarius elicits differential inhibition of lumbar and renal sympathetic nerve activity. *J Auton Nerv Syst.*, 62(1-2): 103-10, 1997.

Scislo TJ, Ergene E e O'Leary DS. Impaired arterial baroreflex regulation of heart rate after blockade of P2-purinoceptors in the nucleus tractus solitarius. *Brain Res Bull.*, 47(1): 63-7, 1998.

Scislo TJ, Kitchen AM, Augustyniak RA, e O'Leary DS. Differential patterns of sympathetic responses to selective stimulation of nucleus tractus solitarius purinergic receptor subtypes. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 28, 120-24, 2001.

- Scislo TJ e O'Leary DS.** Differential control of renal vs. adrenal sympathetic nerve activity by NTS A_{2a} and P_{2x} purinoceptors. *Am J Physiol.* 275(6 Pt 2): H2130-9, 1998.
- Scislo TJ e O'Leary DS.** Differential role of ionotropic glutamatergic mechanism in responses to NTS P_{2X} and A_{2A} receptor stimulation. *Am J Physiol.*, 278, H2057-68, 2000.
- Scislo TJ e O'Leary DS.** Purinergic mechanisms of the nucleus of the solitary tract and neural cardiovascular control. *Neurol Res.*, 27(2): 182-94, 2005.
- Shigetomi E e Kato F.** Action potential-independent release of glutamate by Ca²⁺ entry through presynaptic P_{2X} receptors elicits postsynaptic firing in the brainstem autonomic network *J Neurosci.*, 24(12): 3125-35, 2004.
- Vardhan A, Kachroo A, e Sapru HN.** Excitatory amino acid receptor in commissural nucleus of the NTS mediate carotid chemoreceptor responses. *Am. J. Physiol.*, 264, R41-50, 1993.
- Yao ST, Barden JA, e Lawrence AJ.** On the immunohistochemical distribution of ionotropic P_{2X} receptors in the nucleus tractus solitarius of the rat. *Neuroscience*, 108(4): 673-685, 2001.
- Yao ST e Lawrence AJ.** Purinergic modulation of cardiovascular function in the rat locus coeruleus. *Br J Pharmacol.*, 145(3): 342-52, 2005.
- Zimmermann H.** Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.*, 362(4-5): 299-309, 2000.
- Zhang CH, Bonagamba LGH e Machado BH.** Blockade of NK-1 receptors in the lateral commissural nucleus tractus solitarii of awake rats had no effect on the

cardiovascular responses to chemoreflex activation. *Braz J Med Biol Res.*, 33, 1379-85, 2000.

Zhang W e Mifflin SW. Excitatory amino acid receptors within NTS mediate arterial chemoreceptor reflexes in rats. *Am J Physiol.*, 265, H770-H773, 1993.

11. APÊNDICE

Tabela 1: Alterações na atividade do nervo frênico (? ANF, em Hz) promovidas por microinjeções unilaterais do α,β -metileno-ATP em concentrações crescentes (10, 25, 50, 100, 200 mM) no NTS caudal. A frequência média basal de disparos do nervo frênico era $0,33\pm 0,02$ Hz. As alterações na frequência de despolarização do nervo frênico foram avaliadas durante os 10 primeiros segundos após as microinjeções (pico da resposta).

Animal	Salina	α,β - metileno- ATP (10 mM)	α,β - metileno- ATP (25 mM)	α,β - metileno- ATP (50 mM)	α,β - metileno- ATP (100 mM)	α,β - metileno- ATP (200 mM)
1	-0,02	0	0	-0,2	-0,4	-0,4
2	-0,05	0	-0,7	-0,2	-0,3	-0,3
3	-0,02	0	-0,1	-0,4	-0,6	-0,4
4	-0,01	-0,1	0,1	-0,2	-0,1	-0,5
5	-0,02	-0,2	-0,1	-0,2	-0,6	-0,4
6	-0,03	-0,1	-0,1	-0,3	-	-
7	-	-	-0,1	-0,3	-	-
8	-	-	-0,3	-0,4	-	-
9	-	-	-0,1	-0,5	-	-
10	-	-	0	-0,4	-	-
11	-	-	-	-0,3	-	-
Média\pmepm	-0,03\pm0,01	-0,07\pm0,03	-0,14\pm0,07	-0,31\pm0,03	-0,4\pm0,09	-0,4\pm0,03

Tabela 2: Alterações na frequência cardíaca (Δ FC, em bpm) promovidas por microinjeções unilaterais do α,β -metileno-ATP em concentrações crescentes (10, 25, 50, 100, 200 mM) no NTS caudal.

Animal	Salina	α,β - metileno- ATP (10 mM)	α,β - metileno- ATP (25 mM)	α,β - metileno- ATP (50 mM)	α,β - metileno- ATP (100 mM)	α,β - metileno- ATP (200 mM)
1	0	-1	-26	-62	-89	-78
2	-	-13	-2	-70	-63	-49
3	-1	1	-105	-18	-31	-39
4	1	-1	-22	-136	-51	-91
5	3	-1	-2	-17	-51	-51
6	-2	-6	-2	-13	-	-
7	-2	-8	-3	-119	-	-
8	3	-	8	0	-	-
9	-	-	-12	19	-	-
10	-	-	-23	-10	-	-
11	-	-	-7	-76	-	-
12	-	-	-	-59	-	-
Média\pmepm	1\pm1	-4\pm2	-18\pm9	-47\pm14	-57\pm9	-62\pm10

Tabela 3: Alterações percentuais ($\Delta\%$) na atividade do nervo simpático torácico (ANSt) promovidas por microinjeções unilaterais do α,β -metileno-ATP em concentrações crescentes (10, 25, 50, 100, 200 mM) no NTS caudal.

Animal	Salina	α,β - metileno- ATP (10 mM)	α,β - metileno- ATP (25 mM)	α,β - metileno- ATP (50 mM)	α,β - metileno- ATP (100 mM)	α,β - metileno- ATP (200 mM)
1	4	3	10	14	55	51
2	7	-3	18	13	24	16
3	3	1	-8	43	21	34
4	1	2	7	14	24	24
5	0	5	36	13	26	32
6	-2	0	24	48	-	-
7	-	-	-	28	-	-
Média\pmepm	2\pm1	3\pm1	13\pm7	23\pm6	30\pm6	32\pm6

Tabela 4: Alterações na atividade do nervo frênico (? ANF, em Hz) promovidas por microinjeções unilaterais do α,β -metileno-ATP (50 mM) e do ATP (25 mM) no NTS caudal. As alterações na frequência de despolarização do nervo frênico foram avaliadas durante os 10 primeiros segundos após as microinjeções (pico da resposta).

Animal	α,β - metileno- ATP (50 mM)	ATP (25 mM)
1	-0,30	0,30
2	-0,40	0,20
3	-0,30	0,10
4	-0,40	0,20
5	-0,40	0,10
6	-0,20	0,10
Média±epm	-0,33±0,03	0,17±0,03*

* diferente em relação à microinjeção do α,β -metileno-ATP no NTS caudal ($p = 0,05$).

Tabela 5: Alterações na frequência cardíaca (? FC, em bpm) promovidas por microinjeções unilaterais do α,β -metileno-ATP (50 mM) e do ATP (25 mM) no NTS caudal.

Animal	α,β - metileno- ATP (50 mM)	ATP (25 mM)
1	-70	-26
2	-74	-39
3	-94	-65
4	-40	-27
5	-58	-23
6	-77	-32
Média\pmepm	-69\pm7	-35\pm6 *

* diferente em relação à microinjeção de α,β -metil-ATP no NTS caudal ($p = 0,05$).

Tabela 6: Alterações percentuais ($\Delta\%$) na atividade do nervo simpático torácico (ANSt) promovidas por microinjeções unilaterais do α,β -metileno-ATP (50 mM) e do ATP (25 mM) no NTS caudal.

Animal	α,β - metileno- ATP (50 mM)	ATP (25 mM)
1	25,5	28,6
2	21,9	32,1
3	31,5	33,3
4	32,6	32,4
5	16,8	27,9
6	31,9	21,2
Média\pmepm	27\pm3	29\pm2

Tabela 7: Alterações na atividade do nervo frênico (? ANF, em Hz) promovidas por microinjeções unilaterais do glutamato (250 mM), adenosina (35 mM) ou seu veículo (aCSF) no NTS caudal. As alterações na frequência de despolarização do nervo frênico foram avaliadas durante os 10 primeiros segundos após as microinjeções (pico da resposta).

Animal	glutamato (250 mM)	Adenosina (35 mM)	aCSF
1	-0,20	0,00	0,00
2	-0,30	-0,03	0,00
3	-0,40	-0,03	-0,02
4	-0,20	-0,02	-0,02
5	-0,30	-0,02	-0,01
Média±epm	-0,28±0,04	-0,02±0,01	-0,01±0,00

Tabela 8: Alterações na frequência cardíaca (? FC, em bpm) promovidas por microinjeções unilaterais do glutamato (250 mM), adenosina (35 mM) ou seu veículo (aCSF) no NTS caudal.

Animal	glutamato (250 mM)	Adenosina (35 mM)	aCSF
1	-96	-2	3
2	-84	-3	-4
3	-62	-4	-2
4	-82	-3	-4
5	-97	-3	2
Média±epm	-84±6	-3±0	-1±1

Tabela 9: Alterações percentuais ($\Delta\%$) na atividade do nervo simpático torácico (ANSt) promovidas por microinjeções unilaterais do glutamato (250 mM), adenosina (35 mM) ou seu veículo (aCSF) no NTS caudal.

Animal	glutamato (250 mM)	Adenosina (35 mM)	aCSF
1	22	2	1
2	20	0	0
3	20	1	1
4	21	1	0
5	25	1	1
Média\pmepm	22\pm1	1\pm0	1\pm0

Tabela 10: Alterações na atividade do nervo frênico (Δ ANF, em Hz) promovidas por microinjeções unilaterais do α,β -metileno-ATP (50 mM) no NTS caudal, antes (controle) e 2, 10, 30 e 45 minutos após microinjeção unilateral de PPADS (10 mM) no NTS caudal. As alterações na frequência de despolarização do nervo frênico foram avaliadas durante os 10 primeiros segundos após cada microinjeção do α,β -metileno-ATP (pico da resposta).

Animal	Microinjeção de α,β -metileno-ATP (50 mM)				
	Controle	2	10	30	45 min após
		PPADS (10 mM)	PPADS (10 mM)	PPADS (10 mM)	PPADS (10 mM)
1	-0,3	-0,4	-0,4	-0,3	-0,3
2	-0,4	-0,4	-0,3	-0,3	-0,3
3	-0,3	-0,3	-0,4	-0,4	-0,3
4	-0,4	-0,4	-0,4	-0,4	-0,3
5	-0,4	-0,4	-0,4	-0,2	-0,4
6	-0,2	-0,2	-0,2	-0,3	-0,4
Média\pmepm	-0,33\pm0,03	-0,35\pm0,03	-0,35\pm0,03	-0,32\pm0,03	-0,33\pm0,02

Tabela 11: Alterações na frequência cardíaca (Δ FC, em bpm) promovidas por microinjeções unilaterais do α, β -metileno-ATP (50 mM) no NTS caudal, antes (controle) e 2, 10, 30 e 45 minutos após microinjeção unilateral de PPADS (10 mM) no NTS caudal.

Animal	Microinjeção de α, β -metileno-ATP (50 mM)				
	Controle	2	10	30	45 min após
		PPADS (10 mM)	PPADS (10 mM)	PPADS (10 mM)	PPADS (10 mM)
1	-70	-22	-53	-107	-90
2	-74	-60	-47	-40	-51
3	-94	-79	-39	-56	-60
4	-40	-50	-65	-49	-56
5	-58	-50	-48	-69	-79
6	-77	-17	-89	-66	-89
Média\pmepm	-69\pm28	-46\pm19	-57\pm23	-65\pm10	-71\pm7

Tabela 12: Alterações percentuais na atividade do nervo simpático torácico (ANSt, em $\Delta\%$) promovidas por microinjeções unilaterais do α,β -metileno-ATP (50 mM) no NTS caudal, antes (controle) e 2, 10, 30 e 45 minutos após microinjeção unilateral de PPADS (10 mM) no NTS caudal.

Animal	Microinjeção de α,β -metileno-ATP (50 mM)				
	Controle	2	10	30	45 min após
		PPADS (10 mM)	PPADS (10 mM)	PPADS (10 mM)	PPADS (10 mM)
1	25	21	37	34	36
2	22	30	25	31	23
3	31	24	24	29	25
4	33	23	22	33	24
5	17	10	11	14	29
6	32	14	16	19	32
Média\pmepm	27\pm3	20\pm3	22\pm4	27\pm3	28\pm2

Tabela 13: Alterações na atividade do nervo frênico (Δ ANF, em Hz) promovidas por microinjeções unilaterais do α,β -metileno-ATP (50 mM) no NTS caudal, antes (controle) e 2, 10, 30 e 45 minutos após microinjeção unilateral de PPADS (20 mM) no NTS caudal. As alterações na frequência de despolarização do nervo frênico foram avaliadas durante os 10 primeiros segundos após cada microinjeção do α,β -metileno-ATP (pico da resposta).

Animal	Microinjeção de α,β -metileno-ATP (50 mM)				
	Controle	2	10	30	45 min após
		PPADS (20 mM)	PPADS (20 mM)	PPADS (20 mM)	PPADS (20 mM)
1	-0,3	-0,2	-0,1	-0,1	-0,3
2	-0,4	-0,2	-0,2	-0,2	-0,3
3	-0,2	-0,1	-0,2	0	-0,3
4	-0,2	0,1	0,1	0	-0,3
5	-0,2	-0,1	0,1	0	-0,4
6	-0,2	-0,2	0	-0,2	-0,2
7	-0,3	-0,1	-0,1	-0,4	-0,3
Média\pmepm	-0,26\pm0,03	-0,11\pm0,04*	-0,06\pm0,05*	-0,13\pm0,06*	-0,30\pm0,02

*diferente em relação à resposta controle ($p \leq 0,05$).

Tabela 14: Alterações na frequência cardíaca (Δ FC, em bpm) promovidas por microinjeções unilaterais do α, β -metileno-ATP (50 mM) no NTS caudal, antes (controle) e 2, 10, 30 e 45 minutos após microinjeção unilateral de PPADS (20 mM) no NTS caudal.

Animal	Microinjeção de α, β -metileno-ATP (50 mM)				
	Controle	2	10	30	45 min após
		PPADS (20 mM)	PPADS (20 mM)	PPADS (20 mM)	PPADS (20 mM)
1	-66	-43	-22	-38	-86
2	-63	-11	-10	-26	-21
3	-62	22	-1	-30	-117
4	-100	3	-23	-23	-51
5	-103	11	-29	-45	-89
6	-55	-25	-12	-26	-65
7	-85	-27	-8	-26	-50
Média\pmepm	-76\pm29	-10\pm9*	-15\pm4*	-31\pm3*	-68\pm12

*diferente em relação à resposta controle ($p \leq 0,05$).

Tabela 15: Alterações percentuais na atividade do nervo simpático torácico (ANSt, em $\Delta\%$) promovidas por microinjeções unilaterais do α,β -metileno-ATP (50 mM) no NTS caudal, antes (controle) e 2, 10, 30 e 45 minutos após microinjeção unilateral de PPADS (20 mM) no NTS caudal.

Animal	Microinjeção de α,β -metileno-ATP (50 mM)				
	Controle	2	10	30	45 min após
		PPADS (20 mM)	PPADS (20 mM)	PPADS (20 mM)	PPADS (20 mM)
1	32	14	4	4	23
2	10	19	7	3	13
3	38	11	4	9	28
4	23	7	5	10	20
5	26	1	1	20	31
6	37	7	5	15	38
7	41	11	17	28	40
Média\pmepm	30\pm4	10\pm2*	6\pm2*	13\pm3*	28\pm4

*diferente em relação à resposta controle ($p \leq 0,05$).

Tabela 16: Alterações na atividade do nervo frênico (Δ ANF, em Hz) promovidas por injeções de KCN (0,05%) no sistema de perfusão, antes (controle) e 2, 10, 30 e 45 minutos após microinjeção bilateral de PPADS (20 mM) no NTS caudal. As alterações na frequência de despolarização do nervo frênico foram avaliadas durante os 10 primeiros segundos após cada injeção de KCN (pico da resposta).

Animal	Injeção de KCN (0,05%)				
	Controle	2	10	30	45 min após
		PPADS (20 mM)	PPADS (20 mM)	PPADS (20 mM)	PPADS (20 mM)
1	0,2	0,2	0,2	0,2	0,1
2	0,2	0,3	0,3	0,2	0,2
3	0,3	0,3	0,3	0,2	0,2
4	0,2	0,2	0,2	0,1	0,1
5	0,4	0,3	0,3	0,3	0,3
6	0,3	0,3	0,3	0,3	0,4
7	0,2	0,1	0,2	0,3	0,3
8	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Média±epm	0,25±0,03	0,24±0,03	0,25±0,02	0,23±0,03	0,23±0,04

*diferente em relação à resposta controle ($p \leq 0,05$).

Tabela 17: Alterações na frequência cardíaca (Δ FC, em bpm) promovidas por injeções de KCN (0,05%) no sistema de perfusão, antes (controle) e 2, 10, 30 e 45 minutos após microinjeção bilateral de PPADS (20 mM) no NTS caudal.

Animal	Injeção de KCN (0,05%)				
	Controle	2	10	30	45 min após
		PPADS (20 mM)	PPADS (20 mM)	PPADS (20 mM)	PPADS (20 mM)
1	-148	-75	-40	-102	-82
2	-109	-90	-119	-128	-109
3	-137	-189	-177	-218	-201
4	-177	-173	-133	-150	-151
5	-134	-99	-151	-119	-168
6	-69	-108	-100	-115	-133
7	-81	-55	-77	-60	-99
8	-103	-95	-117	-108	-100
Média\pmepm	-120\pm13	111\pm16	-114\pm15	-125\pm16	-130\pm14

Tabela 18: Alterações percentuais na atividade do nervo simpático torácico (ANSt, em $\Delta\%$) promovidas por injeções de KCN (0,05%) no sistema de perfusão, antes (controle) e 2, 10, 30 e 45 minutos após microinjeção bilateral de PPADS (20 mM) no NTS caudal.

Animal	Injeção de KCN (0,05%)				
	Controle	2	10	30	45 min após
		PPADS (20 mM)	PPADS (20 mM)	PPADS (20 mM)	PPADS (20 mM)
1	57	61	52	54	42
2	47	43	49	40	52
3	56	50	62	56	56
4	43	46	44	55	53
5	59	62	60	59	55
6	62	57	49	59	40
7	60	61	51	54	60
8	56	32	21	54	47
Média\pmepm	55\pm2	52\pm4	48\pm5	54\pm2	51\pm2

Tabela 19: Alterações na atividade do nervo frênico (Δ ANF, em Hz) promovidas por injeções de KCN (0,05%) no sistema de perfusão, antes (controle) e 2, 10, 30, 45 e 60 minutos após microinjeções bilaterais de PPADS (20 mM) e de ácido quinurênico (KYN, 250 mM) (duplo bloqueio) no NTS caudal. As alterações na frequência de despolarização do nervo frênico foram avaliadas durante os 10 primeiros segundos após cada injeção de KCN (pico da resposta).

Animal	Injeção de KCN (0,05%)					
	Controle	2	10	30	45	60 min após
		PPADS + KYN	PPADS + KYN	PPADS + KYN	PPADS + KYN	PPADS + KYN
1	0,2	0,2	0,2	0,3	0,3	0,3
2	0,3	0,2	0,3	0,2	0,1	0,4
3	0,3	0,2	0,3	0,2	0,2	0,2
4	0,2	0,2	0,2	0,3	0,2	0,1
5	0,2	0,3	0,2	0,1	0,2	0,3
6	0,2	0,1	0,1	0,1	0,3	0
7	0,3	0,2	-	-	-	0,2
8	0,2	-	-	-	-	-
Média±epm	0,24±0,02	0,20±0,02	0,22±0,03	0,20±0,04	0,22±0,03	0,21±0,05

Tabela 20: Alterações na frequência cardíaca (Δ FC, em bpm) promovidas por injeções de KCN (0,05%) no sistema de perfusão, antes (controle) e 2, 10, 30, 45 e 60 minutos após microinjeções bilaterais de PPADS (20 mM) e de ácido quinurênico (KYN, 250 mM) (duplo bloqueio) no NTS caudal.

Animal	Injeção de KCN (0,05%)					
	Controle	2	10	30	45	60 min após
		PPADS + KYN	PPADS + KYN	PPADS + KYN	PPADS + KYN	PPADS + KYN
1	-86	-21	-8	-22	-26	-69
2	-133	-7	-21	-38	-53	-127
3	-112	-26	-13	-14	-30	-85
4	-128	-13	-10	-17	-20	-38
5	-158	-13	-13	-30	-85	-103
6	-194	-25	-28	-39	-112	-168
7	-99	-29	-21	-21	-115	-205
8	-214	-35	-13	-79	-110	-149
9	-231	-21	-22	-73	-101	-202
Média±epm	-151±17	-21±3*	-17±2*	-37±8*	-72±13*	-127±20

*diferente em relação à resposta controle ($p \leq 0,05$).

Tabela 21: Alterações percentuais na atividade do nervo simpático torácico (ANSt, em $\Delta\%$) promovidas por injeções de KCN (0,05%) no sistema de perfusão, antes (controle) e 2, 10, 30, 45 e 60 minutos após microinjeções bilaterais de PPADS (20 mM) e de ácido quinurênico (KYN, 250 mM) (duplo bloqueio) no NTS caudal.

Animal	Injeção de KCN (0,05%)					
	Controle	2	10	30	45	60 min após
		PPADS + KYN	PPADS + KYN	PPADS + KYN	PPADS + KYN	PPADS + KYN
1	45	17	15	18	40	56
2	54	13	14	27	61	64
3	44	14	18	29	36	42
4	57	16	17	36	42	55
5	65	26	29	37	48	55
6	46	20	12	34	42	50
7	53	13	12	40	42	52
8	53	16	25	27	36	44
9	55	18	23	30	38	51
Média±epm	52±2	17±1*	18±2*	31±2*	43±3	52±2

*diferente em relação à resposta controle ($p \leq 0,05$).

12. ANEXO

Anexo: Tabela indicativa das doses equivalentes às concentrações das drogas testadas.

Drogas	Concentração (mM)	Dose (nmol/20nl)
	10	0,2
	25	0,5
a,β-metileno-ATP	50	1
	100	2
	200	4
ATP	25	0,5
Adenosina	35	0,7
Glutamato	250	5
	10	0,2
PPADS	20	0,4
KYN	250	5

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](#)