

HILDEBRANDO CANDIDO FERREIRA NETO

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

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

São Paulo
2014

HILDEBRANDO CANDIDO FERREIRA NETO

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

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

Área de concentração: Fisiologia Humana

Orientador: Prof. Dr. Vagner Roberto Antunes

Versão original

São Paulo
2014

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução não autorizada pelo autor

Ferreira Neto, Hildebrando Candido.

Estudo da interação entre ATP e glutamato em neurônios do núcleo paraventricular do hipotálamo e sua relação com a resposta simpatoexcitatória induzida por alterações na osmolaridade / Hildebrando Candido Ferreira Neto. -- São Paulo, 2014.

Orientador: Prof. Dr. Vagner Roberto Antunes.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Fisiologia e Biofísica. Área de concentração: Fisiologia Humana. Linha de pesquisa: Controle central da pressão arterial.

Versão do título para o inglês: Study of the interaction between ATP and glutamate in neurons of the paraventricular nucleus of the hypothalamus and its relationship with the sympathoexcitatory response induced by changes in osmolarity.

1. Sistema nervoso simpático 2. Sistema cardiovascular 3. Adenosina trifosfato 4. Receptores de glutamato 5. Equilíbrio hidroeletrolítico I. Antunes, Prof. Dr. Vagner Roberto II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana III. Título.

ICB/SBIB0169/2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Hildebrando Candido Ferreira Neto.

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

Orientador(a): Prof. Dr. Vagner Roberto Antunes.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

Aprovado(a)

Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - CEP. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

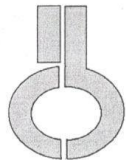
CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **065** nas fls. **88** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) Wagner Roberto Antunes, Coordenador(a) da Linha de pesquisa **Papel dos receptores purinérgicos do núcleo paraventricular do hipotálamo na hipertensão neurogênica** do qual participam o(s) alunos **Hildebrando Candido Ferreira Neto**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)** em **21.06.2010, com validade de 3 anos.**

São Paulo, 21 de junho de 2010.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEUA - ICB/USP

Profa. Dra. PATRÍCIA GAMA
Secretária
CEUA - ICB/USP



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 e-mail: cep@icb.usp.br

Of. CEUA. 078.13

São Paulo, 08 de outubro de 2013.

REF.: Protocolo nº 65/10.

"Papel dos receptores purinérgicos do núcleo paraventricular do hipotálamo na hipertensão neurogênica"

Prezado Professor,

Sua licença para uso de animais em experimentação, constante no protocolo em epígrafe, **foi prorrogada até 21.06.2016.**

Reitero que havendo alteração de metodologia e inserção de novos alunos ao projeto de pesquisa vinculado à referida licença a CEUA/ICB deverá ser informada.

Cordialmente,

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador - CEUA-ICB/ /USP

Ilmo. Sr.
Prof. Dr. Vagner Roberto Antunes
Departamento de Fisiologia e Biofísica
Instituto de Ciências Biomédicas - USP

Dedico este trabalho a todos que
verdadeiramente me apoiaram.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro.

Ao Prof. Dr. Vagner Roberto Antunes, pela oportunidade de realizar o doutorado em seu laboratório, por compartilhar seus conhecimentos e ajudar em momentos críticos durante todo o processo.

Ao Prof. Javier Stern, pela oportunidade de desenvolver o doutorado sanduíche em seu laboratório e proporcionar uma experiência única no que diz respeito à pesquisa científica.

À Rosana Pagano, por ter ficado do meu lado durante todo esse processo, com muita paciência, administrando minhas emoções e tentando levantar minha autoestima.

Aos colegas de laboratório, Laiali, Karol, Helena pelos momentos vividos no laboratório e reuniões científicas e especialmente, à Natalia, Izabela e Lais pela oportunidade de trabalharmos, discutirmos e colaborarmos cientificamente e também pelos momentos de diversão.

Aos colegas de Augusta, Krishna, Sole, Meng, Wenting, Zhou, Evgeniy, Sook Jin, Dr. Jessica, Helena, Jennifer, Ki Jun, Cam, Theo, Ane, Cris, Roberta, Sherif, Rosvita e em especial à André, Camilla, Rubens, Vinicia e Wagner, pela ajuda, suporte, conversas, festas em todo o período que eu estive na cidade desenvolvendo o doutorado sanduíche.

Aos professores das disciplinas que cursei e os laboratórios que frequentei, pois os conceitos ensinados serão levados não apenas para a carreira científica, mas para toda a vida.

Aos funcionários do Departamento de Fisiologia e Biofísica e do Instituto de Ciências Biomédicas, pois todos são essenciais para o bom funcionamento da estrutura e para o andamento das pesquisas.

Aos funcionários da Georgia Regents University, que ajudaram e facilitaram o processo para a realização do doutorado sanduíche.

Aos meus pais Hildebrando e Sonia, meu irmão Felipe, e minhas tias e primos, por me apoiar e acreditar que um dia eu serei alguém.

RESUMO

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

Os receptores P2X de ATP são expressos em neurônios do núcleo para ventricular do hipotálamo (PVN) que se projetam para o bulbo ventrolateral rostral (RVLM). Neste estudo avaliamos os mecanismos celulares da interação ATP-glutamato em neurônios pré-simpáticos do PVN, e investigamos se o acoplamento entre receptores purinérgicos e glutamatérgicos contribuiria para a atividade destes neurônios e da atividade simpática induzida por hiperosmolaridade. Utilizamos como técnicas metodológicas a imunohistoquímica e abordagens eletrofisiológicas de *whole-cell patch-clamp* e registro eletroneurográfico na preparação *in situ* de rato decorticado artificialmente perfundido para determinar o efeito da ativação de receptores P2 e a possível interação entre a sinalização purinérgica e glutamatérgica nas mudanças na atividade simpática lombar (ANSL) induzidas por estímulo osmótico. Registros de *whole-cell patch clamp* obtidos de neurônios PVN-RVLM mostraram que ATP (100 μ M, 1 min, aplicado no banho) induziu aumento da frequência de potenciais de ação (89%), um efeito bloqueado por ácido quinurênico (KYN, 1 mM) ou PPADS (10 μ M). A microinjeção unilateral de ATP no PVN aumentou a ANSL de maneira dose-dependente (1 nmol: 38 \pm 6 %, 2.5 nmol: 72 \pm 7 %, 5 nmol: 96 \pm 13 %). Este aumento foi significativamente atenuado pelo bloqueio de receptores P2 (PPADS) e receptores glutamatérgicos (KYN) ou uma combinação de ambos. O aumento na ANSL promovido pela microinjeção de L-glutamato no PVN não foi afetado pela previa injeção de PPADS. O bloqueio seletivo de receptores não-NMDA (CNQX), mas não de receptores NMDA (AP5), atenuou o efeito simpatoexcitatório do ATP no PVN. A aplicação de ATP *per se* não alterou a função sináptica glutamatérgica, no entanto, as correntes glutamatérgica dependentes da aplicação focal de L-glu (1 mM, n=10) ou AMPA (50 μ M, n=13) foram aumentadas na presença de ATP (L-glu amplitude: 110%, L-glu área: 217%; AMPA amplitude: 33%, AMPA área: 52%). A potenciação das correntes mediadas por receptores AMPA dependente de ATP foram bloqueadas pelo PPADS (n=12) e pela quelacção de Ca²⁺ intracelular (BAPTA, n=10). Adicionalmente, um estímulo hiperosmótico agudo ativou neurônios do PVN que expressam receptores P2X₂. Além disso, a estimulação hiperosmótica de neurônios PVN-RVLM (manitol 1%, + 60 mOsmol/L, n=8) potenciou as respostas induzidas pela aplicação de AMPA (53%), um efeito bloqueado por PPADS (n=6). Finalmente, demonstramos que os receptores P2 do PVN receptores são importantes para a resposta simpatoexcitatória induzida por hiperosmolaridade. Em conjunto, nossos dados suportam a hipótese de um acoplamento funcional entre receptores P2 e AMPA

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

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

ABSTRACT

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

P2X receptors are expressed on rostral ventrolateral medulla (RVLM) projecting paraventricular nucleus (PVN) neurons. Here, we evaluated precise cellular mechanisms underlying the ATP-glutamate interaction in PVN neurons, and assessed whether purinergic-glutamatergic receptor coupling contributed to osmotically-driven presympathetic PVN neuronal activity and sympathoexcitation. We used immunohistochemistry and electrophysiological approaches with whole-cell patch-clamp and an in situ arterially perfused rat preparation to determine the effect of P2 receptor activation and the putative interaction between purinergic and glutamatergic neurotransmitter systems within the PVN to modulate the lumbar SNA (LSNA) induced by osmotic stimulation. Whole-cell patch clamp recordings obtained from PVN-RVLM neurons showed that ATP (100 μ M, 1 min, bath applied) induced an increase in firing rate (89%) an effect blocked by kynurenic acid (1 mM) or PPADS (10 μ M). Unilateral microinjection of ATP into the PVN induced a dose-related increase in the LSNA (1 nmol: 38 \pm 6 %, 2.5 nmol: 72 \pm 7 %, 5 nmol: 96 \pm 13 %). This increase was significantly attenuated by blockade of P2 receptors (PPADS) and glutamate receptors (kynurenic acid, KYN) or a combination of both. The increase in LSNA elicited by L-glutamate microinjection into the PVN was not affected by a previous injection of PPADS. Selective blockade of non-NMDA receptors (CNQX), but not NMDA receptors (AP5), attenuated the ATP-induced sympathoexcitatory effects at the PVN level. While ATP *per se* did not affect glutamate synaptic function, glutamate currents evoked by focal application of L-glu (1 mM, n=10) or AMPA (50 μ M, n=13), in the presence of ATP, were increased in magnitude (L-glu amplitude: 110%, L-glu area: 217%; AMPA amplitude: 33%, AMPA area: 52%). ATP potentiation of AMPA currents were blocked by PPADS (n=12) and by chelation of intracellular Ca²⁺ (BAPTA, n=10). In addition, acute hyperosmotic stimulation activates P2X₂ receptors expressing neurons in the PVN. Furthermore, a hyperosmotic stimulus (mannitol 1%, + 60 mOsmol/L, n=8) potentiated AMPA responses (53%), an effect blocked by PPADS (n=6). Finally, we demonstrated that P2 receptors in the PVN are important for osmotically-driven sympathoexcitatory responses. Taken together, our data support a functional coupling between P2 and AMPA receptors (likely of extrasynaptic location) in PVN-RVLM neurons, which stimulate presympathetic PVN neuronal activity and increases LSNA. This coupling is

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

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

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** – Representação esquemática do modelo animal experimental de animal decorticado e artificialmente perfundido (DAP) representando os registros de sinais eletroneurográficos.....33
- Figura 2** – ATP aumenta a frequência de potenciais de ação em neurônios pré-simpáticos do PVN.....41
- Figura 3** – Administração exógena de ATP não altera as correntes espontâneas pós-sinápticas glutamatérgicas.....44
- Figura 4** – ATP aumenta a amplitude da I_{L-glu} em neurônios pré-simpáticos do PVN....46
- Figura 5** – ATP potencia I_{AMPA} em neurônios PVN-RVLM.....49
- Figura 6** – A potenciação da I_{AMPA} em neurônios pré-simpáticos do PVN induzida pelo ATP é dependente da ativação de receptores P2 e de alterações de Ca^{2+} intracelular.52
- Figura 7** – Microinjeção de ATP no PVN aumenta a atividade simpática lombar de maneira concentração dependente.....56
- Figura 8** – Microinjeção de $\alpha,\beta meATP$ no PVN induz simpatoexcitação concentração dependente.....58
- Figura 9** – Antagonismo dos receptores P2 no PVN atenua a simpatoexcitação induzida pelo ATP.....60
- Figura 10** – Antagonismo dos receptores P2 no PVN não altera a simpatoexcitação induzida pela microinjeção de L-glu no PVN.....61
- Figura 11** – A simpatoexcitação induzida pela microinjeção de ATP no PVN é reduzida após o antagonismo dos receptores ionotrópicos glutamatérgicos.....63
- Figura 12** – KYN facilita a atenuação mediada pelo PPADS no aumento da atividade simpática induzido pelo ATP quando microinjetados no PVN.....65
- Figura 13** – Receptores NMDA do PVN não contribuem para a simpatoexcitação induzida pela microinjeção de ATP.....66

Figura 14 – O aumento da atividade simpática lombar promovido pela microinjeção de ATP no PVN é dependente da ativação de receptores não-NMDA.....	67
Figura 15 – Microinjeções no PVN.....	69
Figura 16 – Aumento agudo de osmolaridade plasmática ativa neurônios do PVN que expressam receptores P2X ₂	72
Figura 17 – Quantificação dos neurônios imunopositivos para a proteína Fos, para receptores P2X ₂ e duplamente marcados com Fos e P2X ₂	74
Figura 18 – Estimulação hiperosmótica aumenta a I_{AMPA} em neurônios PVN-RVLM via ativação de receptores P2.....	76
Figura 19 – A ativação de receptores P2 no PVN contribui para a simpatotoexcitação induzida por hiperosmolaridade.....	79

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

α,β meATP – alfa, beta metileno ATP

aCSF – fluido cérebro espinal artificial

ADP – adenosina difosfato

AMP – adenosina 3',5'-monofosfato

AMPc – adenosina 3',5'-monofosfato cíclico

AngII – angiotensina II

ANOVA – análise de variância

ANF – atividade do nervo frênico

ANS – atividade do nervo simpático

ANSL ou LSNA – atividade do nervo simpático lombar

AP5 – ácido D(-)-2-Amino-5-fosfopentanóico

ATP – adenosina trifosfato

CIML – coluna intermediolateral da medula espinal

CNQX – CNQX disódio hidratado

CVOs – órgãos circumventriculares

CRH – hormônio liberador de corticotrofina

DAP – preparação de rato decorticado e artificialmente perfundido

GABA – ácido gama- aminobutírico

KYN – ácido quinurênico

L-glu – L-glutamato

NPC – neurônios parvocelulares

NMC – neurônios magnocelulares

NO – óxido nítrico

OT – oxitocina

PA – pressão arterial

PBS – tampão salina-fosfato

PFA – paraformaldeído

PLC – fosfolipase C

PPADS – atividade do nervo simpático lombar

PVN – núcleo paraventricular do hipotálamo

RVLM – bulbo rostral ventrolateral

SNC – sistema nervoso central

SON – núcleo supraóptico

TRH – hormônio liberador de tireotrofina

VP – vasopressina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 O controle da osmolaridade plasmática	19
1.2 Núcleo Paraventricular do Hipotálamo (PVN) e Atividade Simpática	20
1.3 Neurotransmissão purinérgica	21
1.4 Cotransmissão purino-glutamatérgica	24
2 HIPÓTESE DE ESTUDO	25
3 OBJETIVOS	26
3.1 Objetivos específicos	26
4 MATERIAIS E MÉTODOS	27
4.1 Experimentos de eletrofisiologia com a técnica de patch-clamp	27
4.1.1 Animais	27
4.1.2 Injeção de neurotraçador retrógrado no RVLM para a marcação dos neurônios pré-simpáticos do PVN	27
4.1.3 Registros eletrofisiológicos com a técnica de patch-clamp	28
4.1.3.1 Preparação das fatias coronais do PVN	28
4.1.3.2 Visualização dos neurônios pré-simpáticos do PVN	28
4.1.3.3 Whole-cell patch-clamp	29
4.1.3.4 Aplicação focal de L-glu e AMPA	30
4.1.4 Fármacos utilizados	30
4.1.5 Análise dos resultados	30
4.2 Experimentos de eletrofisiologia no modelo animal experimental decorticado e artificialmente perfundido (DAP)	31
4.2.1 Animais	31
4.2.2 Procedimentos cirúrgicos	31
4.2.2.1 Registro dos eletroneurogramas na preparação DAP e microinjeções no PVN	33
4.2.2.2 Estímulo hiperosmótico na DAP	34
4.2.3 Fármacos utilizados	35

4.2.4 Análise histológica	35
4.2.5 Análise estatística	36
4.3 Experimentos de imunohistoquímica	36
4.3.1 Animais	36
4.3.2 Procedimentos cirúrgicos para estímulo osmótico agudo e monitoramento da osmolaridade plasmática	36
4.3.3 Procedimentos técnicos para a coloração imunohistoquímica	37
4.3.5 Incubação dos anticorpos primários e secundários	38
4.3.6 Análise imunohistoquímica	38
4.3.7 Análise estatística	39
5 RESULTADOS	40
5.1 Aplicação exógena de ATP induz aumento da frequência de potenciais de ação em neurônios pré-simpáticos do PVN via ativação de receptores P2 e receptores ionotrópicos glutamatérgicos	40
5.2 ATP não afeta as correntes sinápticas glutamatérgicas em neurônios PVN-RVLM	42
5.3 ATP exógeno potencia as correntes mediadas por receptores AMPA em neurônios PVN-RVLM	44
5.4 A potenciação das I_{AMPA} induzidas pelo ATP em neurônios pré-simpáticos do PVN depende da ativação de receptores P2 e dos níveis intracelulares de Ca^{2+} ...	50
5.5 Efeito da microinjeção de ATP e α,βmeATP no PVN sobre a ANSL	53
5.6 Efeito da microinjeção de ATP na ANSL após o antagonismo dos receptores P2 no PVN	58
5.7 Efeito da microinjeção de L-glu na ANSL após o antagonismo dos receptores P2 no PVN	60
5.8 Efeito da microinjeção de ATP na ANSL após o antagonismo dos receptores ionotrópicos glutamatérgicos e/ou dos receptores P2 no PVN	61
5.9 Efeito da microinjeção de ATP após o antagonismo de receptores NMDA ou não-NMDA de glutamato no PVN sobre a ANSL	66

5.11 Aumento agudo da osmolaridade plasmática ativa neurônios do PVN que expressam receptores P2X₂	69
5.12 Estímulo hiperosmótico revela um acoplamento purino-glutamatérgico em neurônios pré-simpáticos do PVN	74
5.13 A simpatoexcitação induzida por estímulo hiperosmótico é abolida após o antagonismo dos receptores P2 no PVN	76
6 DISCUSSÃO	79
6.1 A ativação de receptores P2 aumenta a excitabilidade de neurônios pré-simpáticos do PVN e a atividade simpática eferente	81
6.2 Interação entre ATP e glutamato no PVN contribui para a simpatoexcitação ..	85
6.3 A simpatoexcitação induzida pelo ATP depende da ativação de receptores AMPA em neurônios PVN-RVLM via alterações de Ca²⁺ intracelular	87
6.4 Receptores P2 participam da resposta simpatoexcitatória induzida por estímulo osmótico agudo	89
7 CONCLUSÃO	92
REFERÊNCIAS	93
APÊNDICE A – Artigo(s) publicado(s) relacionados à tese	106
APÊNDICE B – Artigos em elaboração e/ou em revisão relacionados à tese	107
APÊNDICE C – Artigos publicados não relacionados à tese	108
APÊNDICE D – Artigos em elaboração e/ou em revisão não relacionados à tese	109

1 INTRODUÇÃO

1.1 O controle da osmolaridade plasmática

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

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

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

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

1.2 Núcleo Paraventricular do Hipotálamo (PVN) e Atividade Simpática

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

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

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

1.3 Neurotransmissão purinérgica

O trifosfato de adenosina (ATP) é classicamente reconhecido como uma fonte intracelular de energia, porém, há algum tempo esta purina e seus metabólitos têm sido sugeridos como moléculas de sinalização extracelular (Burnstock, 1972). O ATP foi primeiramente proposto como transmissor em neurônios sensoriais, e posteriormente estabelecido como transmissor em nervos motores e em alguns neurônios do SNC. As principais ações do ATP como neurotransmissor são via ativação dos purinoreceptores do tipo P2, os quais são divididos em duas principais classes denominados receptores purinérgicos metabotrópicos P2Y e ionotrópicos P2X (Abbracchio, Burnstock, 1994; Burnstock, 2007). Os receptores purinérgicos P2Y são receptores acoplados à proteína G (G_{q/11}, G_s, G_i e G_{i/o}) e apresentam 8 subtipos diferentes (P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆, P2Y₁₁, P2Y₁₂, P2Y₁₃, P2Y₁₄). Os receptores P2Y podem ser ativados por nucleotídeos

trifosfatos, nucleotídeos difosfatos, assim como por purinas e/ou pirimidinas dependendo do subtipo de receptor. A ativação de receptores P2Y desencadeia uma cascata de sinalização intracelular que envolve a ativação da fosfolipase C (PLC) e liberação de Ca^{2+} de estoques intracelulares ou afeta a atividade da adenilato ciclase e altera os níveis de adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (AMPc). Já os receptores P2X são canais iônicos dependentes de ligante, permeáveis ao Na^+ , K^+ e Ca^{2+} . Baseado na clonagem e expressão dos receptores purinérgicos em várias linhagens celulares, sete diferentes subtipos de receptores P2X (P2X_1 – P2X_7) já foram identificados. Os diferentes subtipos de receptores P2X tem sido classificados pelo seu grau de dessensibilização, seletividade por agonistas e antagonistas, propriedades de permeabilidade e sensibilidade às mudanças do pH extracelular (Burnstock, 2007; King et al., 1997; North, 2002).

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

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

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

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

1.4 Cotransmissão purino-glutamatérgica

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

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

2 HIPÓTESE DE ESTUDO

Diante das evidências citadas anteriormente a nossa hipótese de estudo foi de que a integração entre neurônios que expressam os receptores purinérgicos e uma possível cotransmissão com o glutamato no núcleo paraventricular do hipotálamo contribuiria para alterações na atividade simpática decorrente de alterações agudas de osmolaridade.

3 OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi avaliar os mecanismos celulares do ATP, bem como sua interação com o glutamato, na atividade de neurônios pré-simpáticos do PVN e o seu papel funcional na modulação da atividade simpática frente à alterações agudas de osmolaridade.

3.1 Objetivos específicos

- Avaliar se o ATP poderia alterar a atividade de neurônios pré-simpáticos do PVN e os possíveis mecanismos celulares envolvidos;
- Verificar se a microinjeção de agonistas purinérgicos (ATP e α,β meATP) no PVN poderia induzir alterações na ANSL seguindo um perfil concentração-dependente;
- Verificar se estas alterações na ANSL induzidas pelo ATP no PVN seriam atenuadas ou bloqueadas pela prévia injeção de um antagonista purinérgico;
- Avaliar se os efeitos da microinjeção do ATP no PVN seriam alterados com a prévia injeção de antagonistas de receptores ionotrópicos glutamatérgicos e da combinação destes com antagonistas de receptores purinérgicos;
- Analisar se um estímulo osmótico agudo ativaria neurônios do PVN que expressam receptores P2X₂;
- Avaliar se a hiperosmolaridade aguda promoveria alterações em neurônios PVN-RVLM dependentes de receptores P2;
- Verificar se os receptores P2 do PVN participariam na simpatoexcitação induzida por aumento de osmolaridade.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Experimentos de eletrofisiologia com a técnica de patch-clamp

4.1.1 *Animais*

Neste estudo foram utilizados ratos Wistar (180-220 g) adquiridos do fornecedor de animais de laboratório Harlan (Indianapolis, IN, EUA) e mantidos no biotério do Department of Physiology of Georgia Regents University em gaiolas coletivas sob condições favoráveis de temperatura (22 ± 1 °C), umidade relativa do ar (40-50%) e ciclo claro-escuro de 12 h, com livre acesso à água e ração. Os protocolos sobre o uso e cuidado de animais e apresentados neste projeto foram aprovados pela Comissão de Ética e Experimentação Animal da Georgia Regents University.

4.1.2 *Injeção de neurotraçador retrógrado no RVLM para a marcação dos neurônios pré-simpáticos do PVN*

Os neurônios pré-simpáticos do PVN que se projetam para o RVLM foram marcados retrogradamente. Para tal, os ratos foram anestesiados com uma injeção intraperitoneal de uma mistura de cetamina (100 mg/kg, i.p.) e xilazina (20 mg/kg, i.p.) Após completa anestesia dos animais, confirmada pela ausência do reflexo de dor com pinçamento da pata ou reflexo palpebral, foi realizada a tricotomia na região dorsal da cabeça e com o auxílio de um protetor auricular a cabeça foi posicionada em posição plana e fixada por meio das barras auriculares do aparelho estereotáxico (David-Kopf, Tujunga, CA, EUA). Microesferas recobertas com rodamina (Lumafluor, Naples, FL, EUA) foram injetadas unilateralmente (500 nL) sob pressão no RVLM de ratos anestesiados seguindo as seguintes coordenadas estereotáxicas: -12 mm caudal ao bregma, 2,0 mm lateral à linha média, 8,0 mm ventral à superfície cerebral. Após a injeção do traçador na região de interesse, a camada muscular e a pele foram suturadas e como medida profilática cada animal recebeu antibiótico e analgésico (Pentabiótico veterinário e Biofen 1%, 100 μ L, sc.). Os animais permaneceram em período de recuperação por 5-7 dias após a microinjeção do marcador retrógrado, a

partir dos quais foram realizados os experimentos de eletrofisiologia. A localização da injeção do marcador e a extensão da difusão da solução foram confirmadas histologicamente. Os animais que apresentaram sítios de microinjeção fora da região do RVLM foram descartados.

4.1.3 Registros eletrofisiológicos com a técnica de patch-clamp

4.1.3.1 Preparação das fatias coronais do PVN

Cinco a sete dias após a injeção do marcador retrógrado no RVLM, os ratos foram profundamente anestesiados com pentobarbital sódico (50 mg/kg, i.p.), decapitados, o encéfalo removido, e fatias coronais foram obtidas (240 µm de espessura) utilizando-se um vibrátomo (D.S.K. Microslicer, Ted Pella, Redding, CA, EUA). Uma câmara foi preenchida com fluido cerebrospinal artificial (aCSF) gelado e aerada com mistura de carbogênio (95% O₂ + 5% CO₂) durante o processo de obtenção das fatias hipotalâmicas (contendo mM: 119 NaCl, 2,5 KCl, 1 MgSO₄, 26 NaHCO₃, 1,25 NaH₂PO₄, 20 D-glucose, 0,4 ácido ascórbico, 2 CaCl₂ e 2 ácido pirúvico; pH 7,4; 290–300 mOsmol/L). As fatias foram colocadas em uma câmara de registro contendo aCSF em temperatura controlada (30–32 °C) para a realização dos registros eletrofisiológicos.

4.1.3.2 Visualização dos neurônios pré-simpáticos do PVN

As fatias foram imobilizadas na câmara de registro e os neurônios foram visualizados com o auxílio de um microscópio (Zeiss, Oberkochen, Alemanha) óptico para contraste de interferência diferencial infravermelho (DIC-IR) acoplado a uma câmera sensível aos comprimentos de onda próximos ao infravermelho, sendo que a mesma estava conectada a um computador.

4.1.3.3 Whole-cell patch-clamp

Durante o processo experimental as fatias permaneceram na câmara de registro e foram banhadas com soluções (fluxo: $\sim 2,0$ mL/min), as quais foram continuamente borbulhadas com uma mistura de carbogênio (95% O₂ + 5% CO₂) e mantidas a temperatura ambiente (22–24 °C). As pipetas para registro foram confeccionadas com capilares de vidro de borosilicato de paredes espessas [(diâmetro externo: 1,5 mm, diâmetro interno: 1,17 mm) GC150T-7.5, Clark, Reading, UK] em um estirador horizontal (P-97 puller, Sutter Instrument Co., Novato, CA, EUA). A solução interna da pipeta de registro foi constituída por (mM): 140 K⁺ gluconato, 5 EGTA, 10 HEPES, 10 KCl, 0,9 MgCl₂, 0,5 CaCl₂, 4 MgATP, 0,3 NaGTP, and 20 fosfocreatina (Na⁺); pH foi ajustado para 7,2–7,3 com KOH. A resistência final das pipetas de registro preenchidas com a solução citada anteriormente ficou entre 4 e 7 M Ω . Os registros de neurônios PVN-RVLM foram obtidos com o auxílio de um amplificador Multiclamp 700A (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA), conectado a um computador via interface analógico/digital-digital/analógico. O software pClamp 10 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA) foi utilizado para a aquisição e análise de dados, os quais foram adquiridos a 10 kHz para os experimentos em voltage-clamp ou 50 kHz para os experimentos em current-clamp, filtrados a 2 kHz (filtro passa baixo Bessel 8-pole) e arquivados em um computador para análise *off-line*. A resistência em série da pipeta de registro foi eletronicamente compensada periodicamente ao longo dos experimentos. Com esta abordagem, monitoramos em modo *current-clamp* a atividade espontânea de disparos de potenciais de ação, assim como o potencial de membrana em repouso antes, durante e após a aplicação de fármacos na solução de perfusão. A parcela média de frequência de disparos de potenciais de ação (bin = 15 s) ao longo do tempo gerada pelos neurônios registrados foi analisada e, para fins de comparação, a média de frequência de disparos durante um período de aproximadamente 3 min antes, durante e após a aplicação dos fármacos foi calculada e comparada utilizando-se o software Mini Analysis (Synptosoft Inc., Leonia, NJ, EUA).

4.1.3.4 Aplicação focal de L-glu e AMPA

A ativação farmacológica das correntes mediadas por L-glutamato e AMPA (I_{L-glu} e I_{AMPA} , respectivamente) em neurônios pré-simpáticos do PVN foi avaliada pela mensuração do pico da corrente e da área integrada na mudança induzida na corrente fixada ($I_{holding}$) seguido da aplicação focal de L-glu (1 mM, 100 ms) ou AMPA (50 μ M, 50 ms) sobre a célula registrada com um dispositivo picospritzer (Toohey, 5–10 psi), ao qual estava conectada uma pipeta similar à pipeta de registro posicionada a cerca de 10 μ m da célula registrada. A resistência de entrada e a capacitância da célula foram calculadas em *voltage clamp* usando um pulso de 5 mV com as células mantidas a -70 mV.

4.1.4 Fármacos utilizados

Os seguintes fármacos foram utilizados: adenosina trifosfato (ATP, 100 μ M), PPADS (10 μ M), ácido quinurênico (KYN, 1 mM), (RS)-AMPA (AMPA 50 μ M), BAPTA (10 mM), picrotoxina (100 μ M), L-glutamato (1 mM) e Manitol (1%).

4.1.5 Análise dos resultados

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). A comparação estatística entre os grupos foi realizada usando a análise de variância de uma ou duas vias (ANOVA), seguido pelo pós-teste de Bonferroni. Tais análises foram realizadas utilizando-se o software GraphPad Prism (versão 5, GraphPad Software Inc., CA, EUA). O nível de significância foi de $p < 0,05$ e “n” é o número de células estudadas.

4.2 Experimentos de eletrofisiologia no modelo animal experimental decorticado e artificialmente perfundido (DAP)

4.2.1 Animais

Neste estudo foram utilizados ratos Wistar (50-80 g) fornecidos pelo Biotério de criação do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da Universidade de São Paulo. Os mesmos foram mantidos no Biotério de Experimentação Animal do Departamento de Fisiologia e Biofísica e alojados em gaiolas sob condições favoráveis de temperatura (22-24 °C), umidade relativa do ar (40-50%) e ciclo claro-escuro de 12 horas, com livre acesso à água e à ração (Nuvilab®) até o dia do experimento. Os protocolos apresentados neste projeto foram submetidos à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do ICB-USP e aprovados sob o número 65 nas folhas 88 do livro 02 em 21/06/2010.

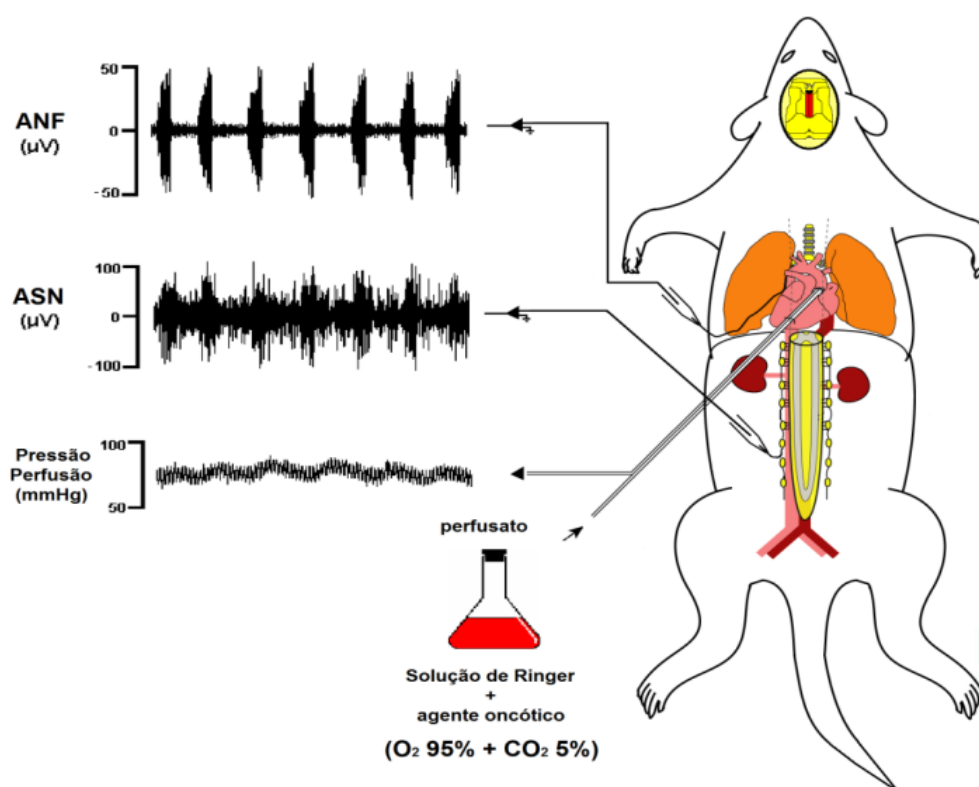
4.2.2 Procedimentos cirúrgicos

Todos os experimentos foram realizados no modelo de animal decorticado e artificialmente perfundido (DAP, figura 1) em ratos Wistar com 3-4 semanas de vida (~70 g). Nesse modelo experimental as vias hipotalâmicas, tronco encefálicas e medulares estão preservadas permitindo a manipulação em distintas regiões do cérebro (microinjeções de fármacos bem como registro extracelular de neurônios) concomitantemente ao registro da atividade simpática em diferentes territórios da cadeia paravertebral simpática, além do registro da atividade respiratória (nervo frênico).

Neste modelo experimental os animais foram anestesiados profundamente com halotano (5% de O₂ medicinal no ar inspirado) e o nível de anestesia verificado por meio de pinçamento da pata posterior e reflexo de retirada. Após completa anestesia do animal foi executada uma laparotomia mediana e o estômago, o intestino e o baço foram ligados e removidos. A seguir, a caixa torácica foi aberta para exposição do coração e administração de uma dose de heparina (250 UI/100 µL) no ventrículo cardíaco esquerdo. Logo após, o pericárdio e o timo foram removidos. Na sequência o

animal foi submerso em uma solução resfriada aCSF (em mM: NaCl 125, NaHCO₃ 24, KCl 5, CaCl₂ 2,5, MgSO₄ 1,25, KH₂PO₄ 1,25, dextrose 10, 290 mOsmol/L) e os hemisférios cerebrais foram expostos após a remoção dos ossos parietais. O córtex cerebral, o hipocampo e áreas talâmicas foram removidos com cautelosa aspiração por meio de uma bomba de vácuo. A área pré-óptica e seus núcleos septais adjacentes, assim como o hipotálamo, foram mantidos intactos. A pele do animal foi retirada e o mesmo transferido para a câmara de registro. Uma cânula de dois lumens foi introduzida no arco aórtico via uma incisão no ventrículo esquerdo. A preparação foi perfundida com fluxo de 28±2 mL/min usando uma bomba peristáltica (Watson Marlow 505S) com aCSF contendo um agente oncótico (PEG 20.000; 1,5%, Sigma, St Louis, EUA), gaseificada com mistura carbogênica (95% O₂ + 5% CO₂), aquecida a 32 °C e filtrada com filtro de nylon (tamanho do poro: 25 µm). Após a recuperação dos movimentos respiratórios foi adicionado ao perfusato um bloqueador neuromuscular (brometo de vecurônio, 40 µg/mL, Cristália, SP, Brasil) para estabilizar a preparação. O segundo lúmen da cânula estava conectado a um transdutor de pressão e foi usado para monitorar a pressão de perfusão. O nervo frênico foi isolado, cortado e sua atividade registrada na sua extremidade distal usando um eletrodo bipolar de vidro de sucção fixado em um micro-manipulador 3D. O padrão de despolarização em rampa do nervo frênico serviu de índice fisiológico contínuo da viabilidade da preparação. A cadeia simpática lombar (L2-L3) foi visualizada com o auxílio de um estereomicroscópio binocular (Leica MZ6), e a porção pós-ganglionar do ramo simpático foi isolada e seccionada para registro da ANSL na sua extremidade distal por meio de um eletrodo bipolar de vidro de sucção fixado em um micro-manipulador 3D.

Figura 1 – Representação esquemática do modelo animal experimental de animal decorticado e artificialmente perfundido (DAP) representando os registros de sinais eletroneurográficos.



ANF: atividade do nervo frênico; ANS: atividade do nervo simpático e pressão de perfusão

4.2.2.1 Registro dos eletroneurogramas na preparação DAP e microinjeções no PVN

A aquisição dos dados da preparação DAP foram feitas um sistema de registro de biopotenciais Neurolog System (Digitimer Ltd, Inglaterra, Reino Unido) usando uma interface A/D CED 1401 (CED, Cambridge Electronic Design, Cambridge, Reino Unido) e armazenado em um computador operando o software de Spike 2 (CED) com um script padrão para a aquisição dos dados e análises on-line e off-line. A ANSL foi exibida com uma constante de tempo de 100 ms e para que os dados fossem padronizados e normalizados entre as preparações utilizamos as alterações na ANSL expressas em porcentagem a partir do valor basal. O ruído da linha de base foi determinado pela aplicação de um bloqueador ganglionar (hexametônio, 330 μ M) ao final do experimento.

Após a estabilização dos registros eletroneurográficos (ANF e ANSL) a cabeça do animal foi fixada por meio de barras auriculares e um grampo nasal em uma mesa estereotáxica adaptada para este modelo experimental. A cabeça foi posicionada de forma que a superfície dorsal do hipotálamo permanecesse plana em todos os experimentos. As coordenadas estereotáxicas do PVN foram previamente estabelecidas por Antunes et al. (2006) tendo como referências anatômicas o colículo superior (2,5-2,7 mm rostral, 0,3 mm lateral à linha mediana) e a superfície cerebral (3,4 mm ventral). Uma micropipeta de multi-canal de vidro (diâmetro externo da ponta: 10 a 30 μ m) foi confeccionada com três capilares e direcionada para o PVN usando um micro-manipulador 3D. O volume injetado de 100 nL foi determinado pela observação do movimento do menisco através de um microscópio binocular com um retículo ocular graduado e pré-calibrado. As microinjeções foram feitas uni ou bilateralmente dependendo dos protocolos experimentais desenvolvidos.

4.2.2.2 Estímulo hiperosmótico na DAP

A DAP foi inicialmente perfundida com aCSF isosmótico (290 mOsmol/L). Após a estabilização da ANSL e ANF e o posicionamento da injetora, foram realizados estímulos osmóticos de 40s de duração com aCSF hiperosmótico (manitol 1%, 350

mOsmol/L). Vale ressaltar que foram utilizados dois recipientes: um para o aCSF isosmótico e outro para o aCSF hiperosmótico. Além disso, após o estímulo osmótico descartou-se parte da solução drenada para evitar a contaminação das soluções e a consequente alteração da osmolaridade das mesmas. O tempo de exposição ao estímulo hiperosmótico e a osmolaridade da solução foram estabelecidos por meio de experimentos prévios (Antunes et al., 2006) e mostrou-se capaz de produzir aumento reversível e similar na ANSL além de permitir estímulos repetidos na mesma DAP.

4.2.3 Fármacos utilizados

Os seguintes fármacos foram utilizados nesta etapa do estudo: L-glutamato (1 nmol), adenosina trifosfato (ATP, 1, 2,5 e 5 nmol), α,β -metilenoATP (α,β meATP, 0,1, 1 e 2 nmol), PPADS (antagonista de receptores P2, 0,5 nmol), ácido quinurênico (KYN, antagonista de receptores ionotrópicos glutamatérgicos, 10 nmol), AP5 (antagonista de receptores NMDA de glutamato, 10 nmol) e CNQX (antagonista de receptores não-NMDA de glutamato, 0,5 nmol). Os fármacos utilizados foram dissolvidos em solução fisiológica estéril (salina 154 mM) com pH ajustado para valores próximos de 7,4.

4.2.4 Análise histológica

Ao final dos experimentos foi realizada a microinjeção no PVN do corante Azul de Evan 2% (Vetec, Química Fina Ltda, RJ, Brasil) no volume de 100 nL. Os encéfalos de animais foram removidos e fixados em solução de paraformaldeído 4% (PFA) em tampão salina-fosfato (PBS) 0,1 M com 20% de sacarose. Após 24 h, os encéfalos foram congelados para a realização de cortes coronais em criostato (40 μ m de espessura). Os cortes histológicos foram analisados por microscopia de campo escuro para a determinação dos sítios específicos das microinjeções. Apenas os animais que apresentaram marcação no PVN foram considerados na análise dos resultados.

4.2.5 Análise estatística

Os dados foram representados como média \pm e.p.m (erro padrão da média). A análise estatística foi gerada utilizando o programa GraphPad Prism 5.02 (GraphPad Software Inc., CA, EUA). A comparação estatística entre os grupos foi realizada usando a análise de variância de uma via (ANOVA), seguido pelo teste de Bonferroni. O índice de significância foi considerado de $p < 0,05$ e “n” representa o número de animais utilizados em cada protocolo.

4.3 Experimentos de imunohistoquímica

4.3.1 Animais

Neste estudo foram utilizados ratos Wistar (300-400 g) fornecidos pelo Biotério de criação do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da Universidade de São Paulo. Os mesmos foram mantidos no Biotério de Experimentação Animal do Departamento de Fisiologia e Biofísica e alojados em gaiolas sob condições favoráveis de temperatura (22-23 °C), umidade relativa do ar (40-50%) e ciclo claro-escuro de 12 horas, com livre acesso à água e à ração (Nuvilab®) até o dia do experimento. Os protocolos apresentados neste projeto foram submetidos à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do ICB-USP e aprovados sob o número 65 nas folhas 88 do livro 02 em 21/06/2010.

4.3.2 Procedimentos cirúrgicos para estímulo osmótico agudo

No dia anterior aos experimentos de estimulação osmótica aguda, os animais foram anestesiados com uma mistura de cetamina (100 mg/kg, i.p.) e xilazina (20 mg/kg, i.p.), mantidos em respiração espontânea. Após a completa anestesia confirmada pela ausência do reflexo de dor com pinçamento da pata ou reflexo palpebral, foi realizada a tricotomia da região inguinal, seguida de assepsia da pele com solução de álcool iodado (1%). Após este procedimento, uma pequena incisão foi feita na região inguinal esquerda dos animais, e todo tecido gorduroso e conectivo foi

minuciosamente dissecado para ter acesso ao feixe vascular femoral para completo isolamento da veia femoral esquerda. A veia femoral foi ligada em sua porção distal com um fio de algodão. A cateterização foi realizada com um cateter de polietileno (PE-10 Scientific Commodities, INC, EUA – diâmetro interno: 0,28 mm/ diâmetro externo: 0,635 mm), com 2 cm de extensão, soldado a outro cateter de polietileno (PE-50 Clay Adams, EUA – diâmetro interno: 0,58 mm/ diâmetro externo: 0,965 mm), com comprimento ajustado de acordo com o tamanho do animal. O cateter foi preenchido com salina isotônica estéril heparinizada (200 a 300 UI), obstruído na extremidade livre do PE-50 com pinos de metal e, após pequena abertura na parede vascular, a porção mais fina (PE-10) foi introduzida na veia femoral em direção à veia cava inferior. Em seguida, o cateter foi exteriorizado e fixado na região dorsal interescapular dos animais; os mesmos foram colocados em gaiolas individuais e, após aproximadamente 24 horas da realização da cirurgia, com os animais acordados e andando livremente nas gaiolas, foram realizadas as infusões em bolus, no volume de 500 µL das soluções isotônicas (NaCl 154 mM) e hipertônicas (NaCl 3 M e solução de manitol 10% em NaCl 154 mM).

4.3.3 Procedimentos técnicos para a coloração imunohistoquímica

Os animais foram divididos em 3 diferentes grupos: salina isotônica (NaCl 154 mM), salina hipertônica (NaCl 3 M) e solução de manitol (10% em NaCl 154 mM). Cada animal recebeu uma infusão contínua e lenta de 500 µL na veia femoral da solução osmótica referente ao grupo que pertencia, seguida de 200 µL de NaCl 154 mM para lavagem do cateter e certificação de que o estímulo osmótico seria de mesmo volume para todos os animais. Após a estimulação osmótica aguda os animais permaneceram em suas gaiolas por 90 min em ambiente calmo sem ruídos e em seguida foram submetidos ao procedimento de perfusão e fixação dos encéfalos para posterior tratamento imunohistoquímico.

Decorridos 90 min da infusão das soluções isotônicas e hipertônicas, os animais foram profundamente anestesiados com pentobarbital de sódio (60 mg/kg) e perfundidos através do ventrículo cardíaco esquerdo com solução salina (NaCl, 154 mM, pH 7,4) seguido de paraformaldeído (PFA, 4% em 0,1 M PBS, pH 7,4). Ao término

da perfusão os encéfalos foram removidos do crânio dos animais e colocados em solução de PFA por 24 horas a 4 °C. Após este período, os encéfalos foram colocados em solução de sacarose (30%) por 24 horas. Em seguida os encéfalos foram cortados em micrótomo de congelamento (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha) em espessura de 40 µm e guardados em solução crioprotetora (20% de glicerol, 30% de etileno glicol em 50 mM de PBS, pH 7,4) a -20 °C para preservar as propriedades e a qualidade do tecido encefálico.

4.3.5 Incubação dos anticorpos primários e secundários

As fatias hipotalâmicas contendo o PVN foram lavadas em PBS com Triton X-100 (0,3%, Sigma-Aldrich, MO, EUA) por 10 min e em seguida foram incubadas com os anticorpos primários *Rabbit* Anti-c-Fos (1:70.000, Calbiochem; número de catálogo: AB-5) ou de *Guinea Pig* anti-P2X₂ (Merck Millipore, Darmstadt, Alemanha; número de catálogo: AB5894) por duas horas em temperatura ambiente e durante a noite a 4 °C. Após o período de incubação dos anticorpos primários, as fatias hipotalâmicas foram lavadas em PBS (3x de 10 min) e em seguida incubadas por 1h em temperatura ambiente em PBS com Triton X-100 (0,3%) contendo Alexa Fluor® 488 *Chicken* Anti-*Rabbit* IgG (1:500; Molecular Probes®, Life Technologies, CA, EUA) para a visualização de c-Fos ou Alexa Fluor® 594 *Goat* Anti-*Guinea Pig* IgG (1:500; Molecular Probes®, Life Technologies, CA, EUA) para visualização de P2X₂. Após as lavagens dos cortes em PBS (3x de 10 min) os cortes foram montados em laminas gelatinizadas (0,5%), deixados secar ao ar (10-15 min) e cobertos com lamínulas utilizando-se o meio de montagem para histologia com fluorescência (Vectorshield Hardset™, Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA).

4.3.6 Análise imunohistoquímica

As fatias processadas foram examinadas em um microscópio de fluorescência (Leica DMLB; Leica GmbH, Wetzlar, Alemanha) equipado com lentes N-Plan. As fotomicrografias foram adquiridas utilizando a detecção azul Q-image EXi e capturadas

usando o sistema de captura Image Pro Plus (V 7.01.688; Media Cybernetics Inc, Rockville, MD, EUA), salvas como arquivos de imagem TIFF em resolução de 300 dpi.

A análise quantitativa das marcações observada nas fatias contendo PVN foi feita pela contagem do número de neurônios imunopositivos localizados dentro dos limites do PVN de acordo com atlas de encéfalo de ratos de Paxinos e Watson (2004). Todas as coordenadas estereotáxicas e a nomenclatura também foram adaptadas do atlas citado anteriormente. As células imunopositivas foram contadas utilizando o software Image J 1.4f (NIH, EUA) usando o contador de células. As fotomicrografias foram organizadas em suas respectivas sequencias com o software Adobe Illustrator CS6 16.0 (Adobe, San Francisco, CA, EUA) para produção de figuras.

4.3.7 Análise estatística

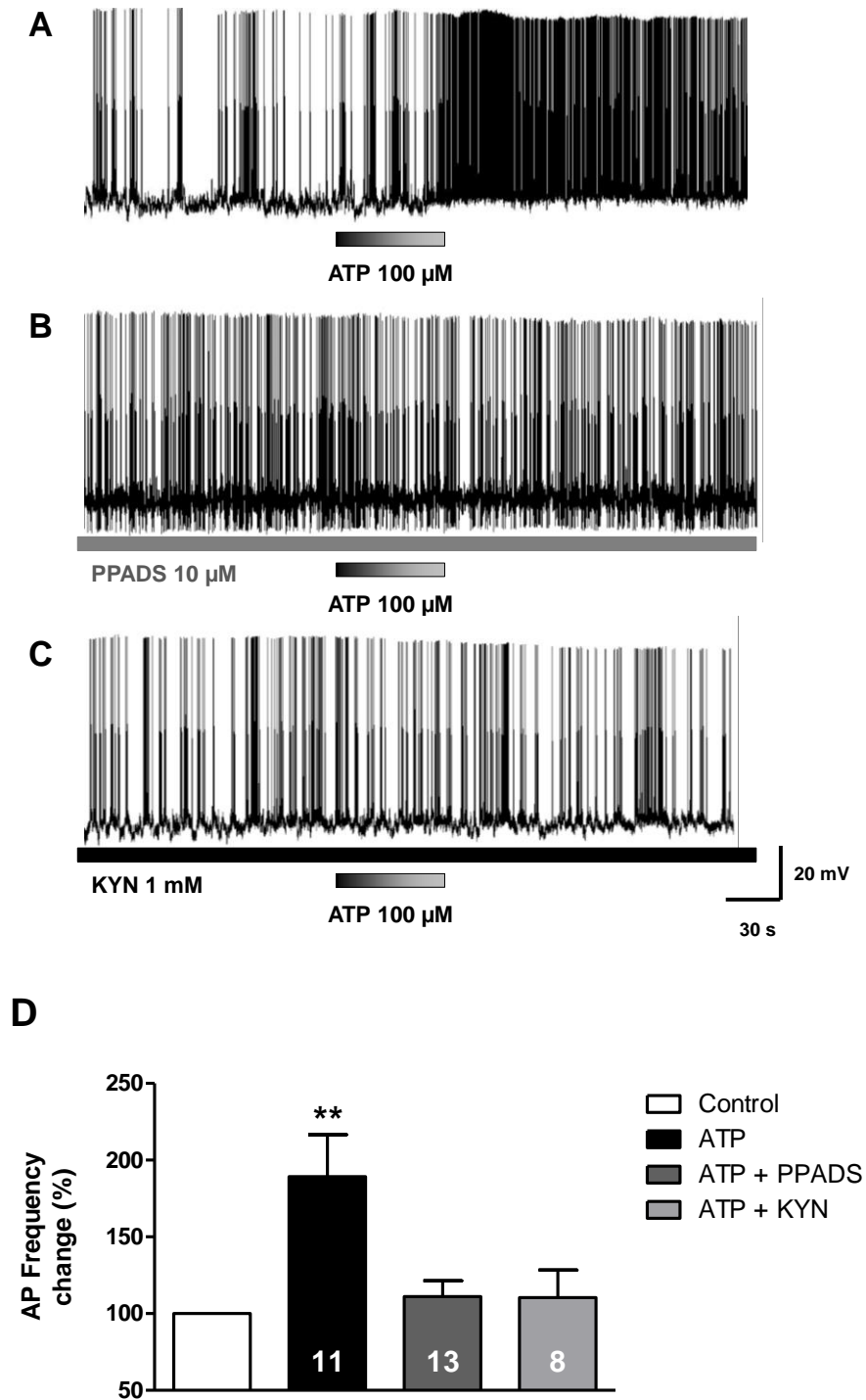
Os dados foram representados como média \pm e.p.m (erro padrão da média). A análise estatística foi gerada utilizando o programa GraphPad Prism 5.02 (GraphPad Software Inc., CA, EUA). A comparação estatística entre os grupos foi realizada usando a análise de variância de uma via (ANOVA), seguido pelo pós teste de Bonferroni. O índice de significância foi considerado de $p < 0,05$ e “n” representa o número de animais utilizados em cada protocolo.

5 RESULTADOS

5.1 Aplicação exógena de ATP induz aumento da frequência de potenciais de ação em neurônios pré-simpáticos do PVN via ativação de receptores P2 e receptores ionotrópicos glutamatérgicos

Na tentativa de avaliar se o ATP poderia alterar a frequência de potenciais de ação de neurônios pré-simpáticos do PVN, foi aplicado ATP (100 μ M por 1 min) em fatias de encéfalo na câmara de registro que continham neurônios do PVN e que foram retrogradamente marcados após injeção de esferas de rodamina injetadas no RVLM. No modo *current-clamp* da configuração *whole cell patch-clamp*, a aplicação de ATP aumentou significativamente a frequência de potenciais de ação em 70% dos 20 neurônios registrados ($89\pm 27\%$ de aumento em relação à frequência basal, Fig. 2A e D). Para avaliar se os efeitos induzidos pelo ATP em neurônios PVN-RVLM seriam dependentes da ativação de receptores P2, as fatias de PVN foram incubadas previamente com o antagonista de receptores P2, PPADS (10 μ M por 5 min) seguido da aplicação de ATP (100 μ M por 1 min). Como pode ser observado na Fig. 2B e D, o antagonismo de receptores P2 aboliu praticamente todo efeito excitatório ($11\pm 10\%$ de mudança em relação à frequência basal) produzido pelo ATP em neurônios pré-simpáticos do PVN. Como previamente mencionado, sabe-se que em diversos núcleos encefálicos existe uma cotransmissão purinérgica e glutamatérgica que medeiam efeitos excitatórios. Nesse sentido, buscamos avaliar se a prévia incubação com ácido quinurênico (KYN, 1 mM por 5 min, antagonista de receptores ionotrópicos glutamatérgicos) nas fatias de PVN contendo neurônios pré-simpáticos bloquearia o aumento da frequência de potenciais de ação induzidos pela aplicação exógena de ATP (100 μ M por 1 min). A aplicação de KYN foi efetiva em bloquear ($10\pm 18\%$ de mudança em relação à frequência basal, Fig. 2C e D) as alterações induzidas pelo ATP nos disparos de potenciais de ação em neurônios PVN-RVLM.

Figura 2 – ATP aumenta a frequência de potenciais de ação em neurônios pré-simpáticos do PVN

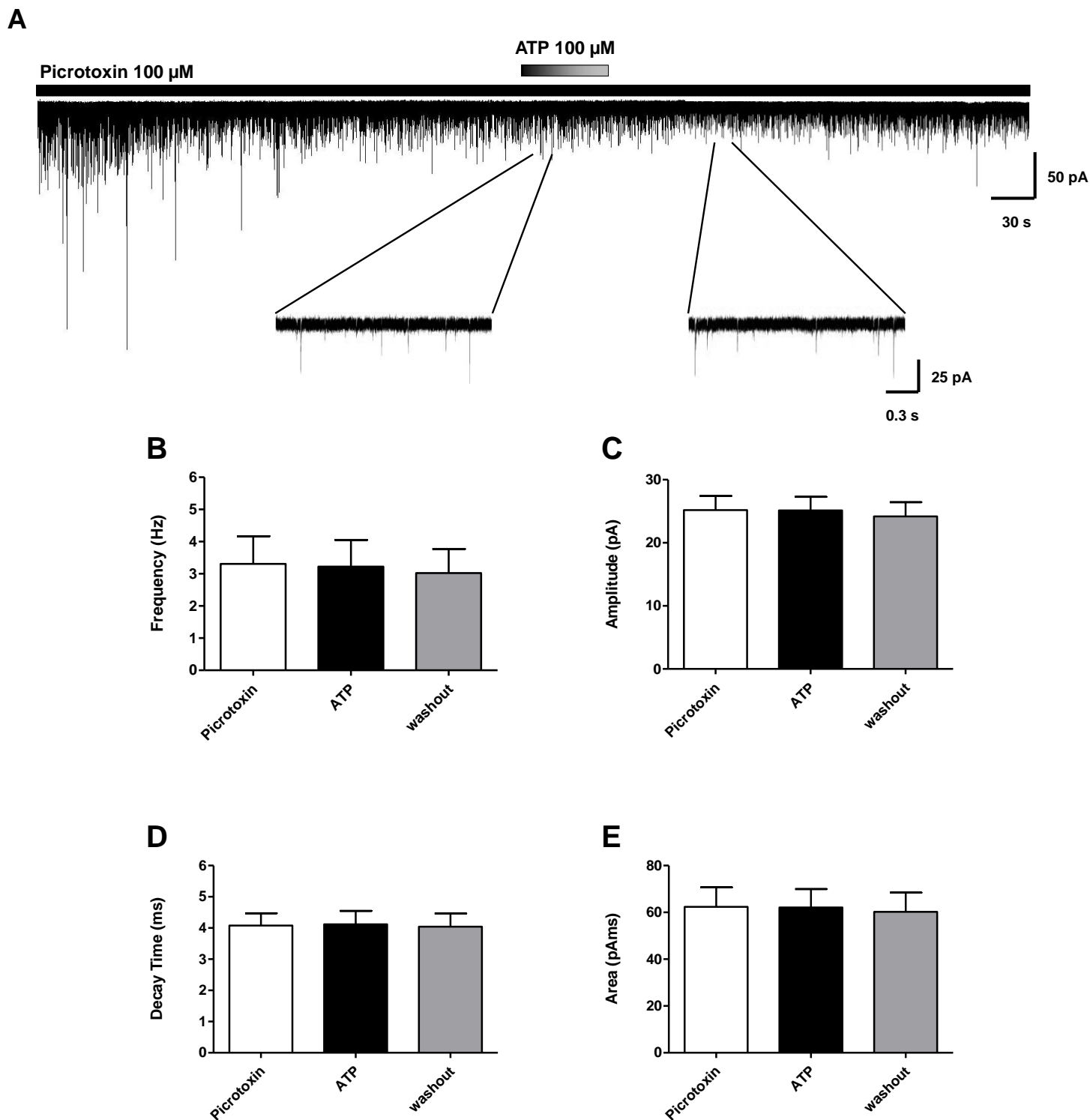


A, Registro representativo de potenciais de ação de um neurônio PVN-RVLM antes, durante e após a aplicação (barra) de ATP (100 μ M, 1 min). ATP induz aumento da frequência de potenciais de ação. **B**, O efeito excitatório do ATP em neurônios pré-simpáticos foi bloqueado pelo antagonista de receptores P2, PPADS, e pelo antagonista de receptores ionotrópicos glutamatérgicos, ácido quinurênico (KYN, **C**). **D**, Alterações percentuais na frequência de potenciais de ação induzido pela administração de ATP (barra preta, n= 11) e na presença de PPADS (barra cinza escuro, n= 13) e KYN (barra cinza claro, n= 8). ** $p < 0,01$ vs Controle, ANOVA de uma via para medidas repetidas com o pós-teste de Bonferroni.

5.2 ATP não afeta as correntes sinápticas glutamatérgicas em neurônios PVN-RVLM

Para verificar se os efeitos promovidos pelo ATP na frequência de potenciais de ação em neurônios pré-simpáticos do PVN seriam devidos a alterações nas correntes pós-sinápticas excitatórias mediadas por glutamato (EPSCs), no modo *voltage clamp* (-70 mV) da configuração whole cell patch-clamp registramos a atividade sináptica espontânea em neurônios pré-simpáticos do PVN. Para isolar as EPSCs glutamatérgicas, as fatias de PVN foram previamente incubadas com picrotoxina, um antagonista de receptores GABA_A (100 μM por 10 min) para eliminar a interferência das correntes pós-sinápticas GABAérgicas antes da aplicação de ATP (100 μM por 1 min). A aplicação de picrotoxina reduziu a frequência, amplitude, o tempo de decaimento e a área das correntes espontâneas pós-sinápticas GABAérgicas em neurônios PVN-RVLM, indicando um bloqueio efetivo dos eventos mediados por GABA. No entanto, as propriedades das EPSCs glutamatérgicas (frequência, amplitude, tempo de decaimento e área) não foram significativamente afetadas na presença de ATP ou durante os períodos de lavagem avaliados (Fig. 3B–E). Todas as correntes sinápticas foram bloqueadas após a aplicação de KYN (dados não mostrados).

Figura 3 – Administração exógena de ATP não altera as correntes espontâneas pós-sinápticas glutamatérgicas

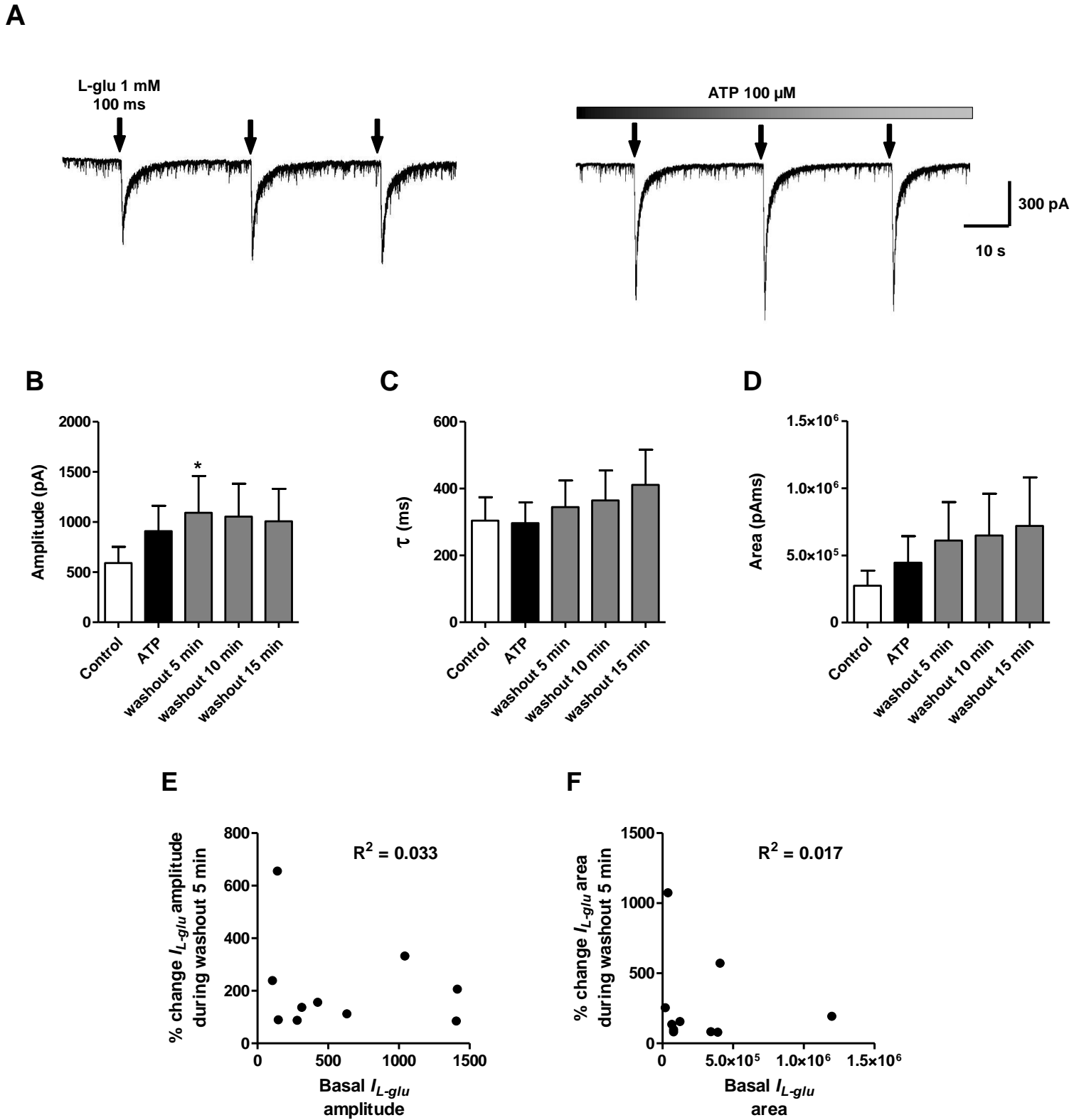


A, Traçado representativo das correntes espontâneas pós-sinápticas em registro de *voltage-clamp whole-cell* (potencial de *holding*: -70 mV) de um neurônio pré simpático do PVN na presença de picrotoxina (100 μ M) antes, durante e após a aplicação de ATP. A aplicação de ATP não alterou a frequência (**B**), amplitude (**C**), tempo de decaimento (**D**) e área (**E**) das correntes espontâneas pós-sinápticas glutamatérgicas ($n=11$). $p>0,05$, ANOVA de uma via para medidas repetidas com o pós-teste de Bonferroni.

5.3 ATP exógeno potencia as correntes mediadas por receptores AMPA em neurônios PVN-RVLM

Para avaliar se o ATP poderia afetar as propriedades de receptores glutamatérgicos em neurônios pré-simpáticos do PVN, avaliamos os efeitos do ATP nas correntes glutamatérgicas induzidas por aplicação focal de L-glutamato (L-glu), uma abordagem que ativa receptores sinápticos e extra sinápticos. Para este fim, 1 mM de L-glu foi aplicado focalmente na célula registrada com uma pipeta de vidro posicionada a cerca de 10 μm de distância da pipeta de registro, com uma pressão de 5 a 10 psi por 100 ms, antes, durante e após a aplicação exógena de ATP (100 μM , 3 min). Como mostrado na Figura 4A, com um potencial de *holding* de -70 mV e em aCSF com baixa concentração de Mg^{2+} , L-glu induziu uma grande corrente de entrada (I_{L-glu}) (amplitude: 590 ± 163 pA, área: $2.74 \times 10^5 \pm 1.13 \times 10^5$ pA*ms, tempo de decaimento (Tau): 304 ± 70 ms). Além disso, foi observado um aumento na amplitude da I_{L-glu} na presença de ATP, um efeito que foi estatisticamente significativo 5 min após a lavagem da solução contendo ATP ($\sim 110\%$, Fig. 4B, 1093 ± 366 pA, $p < 0,05$ vs controle), sugerindo um efeito desencadeado lentamente pelo ATP. No entanto, o tempo de decaimento e a área da I_{L-glu} não foram significativamente alterados na presença de ATP e nos períodos de lavagem avaliados (Fig. 4C e D). Uma plotagem da porcentagem de mudança da amplitude e da área da I_{L-glu} 5 min após a aplicação de ATP em função dos valores basais absolutos de amplitude e área da I_{L-glu} não mostrou uma correlação significativa entre estes parâmetros (amplitude $R^2 = 0,033$, área $R^2 = 0,017$, Fig. 4E e F, respectivamente).

Figura 4 – ATP aumenta a amplitude da I_{L-glu} em neurônios pré-simpáticos do PVN

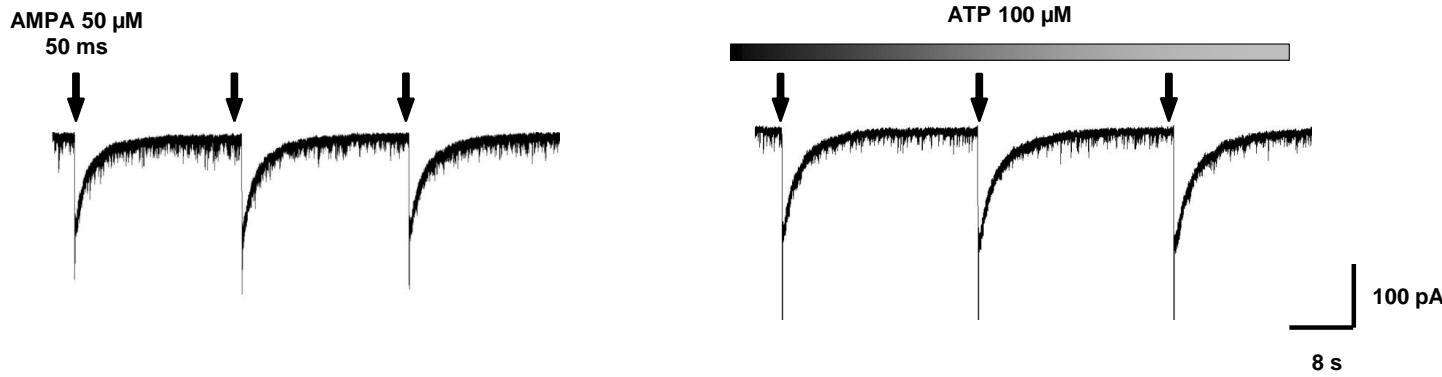


A, Traçados representativos em registro de *voltage-clamp whole-cell* (potencial de *holding*: -70 mV em aCSF com baixa concentração de Mg^{2+}) de correntes induzida por três aplicações focais de L-glu (1 mM, 100 ms, 5-10 psi) com um intervalo de 8s entre elas, antes e durante a administração de ATP. **B**, amplitude média da I_{L-glu} , **(C)** o tempo de decaimento médio da I_{L-glu} (τ) e **(D)** da área média da I_{L-glu} antes, durante e após a administração de ATP (n=10). **E** e **F**, Alteração percentual da amplitude (**E**) e área (**F**) da I_{L-glu} na presença de ATP em função dos valores absolutos basais da I_{L-glu} amplitude e área, mostrando a ausência de correlação entre estes fatores. * $p < 0,05$ vs basal, ANOVA de uma via para medidas repetidas com o pós-teste de Bonferroni.

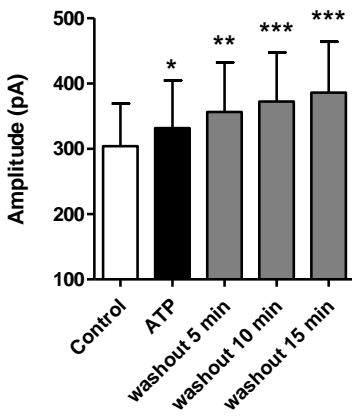
Diversos estudos já demonstraram uma forte interação entre receptores P2 e AMPA (D'Amico et al., 2010; Gordon et al., 2005; Khakh, 2009; Khakh et al., 2003). Nesse sentido, buscamos investigar se as correntes mediadas por receptores AMPA em neurônios pré-simpáticos do PVN seriam alteradas pela aplicação exógena de AMPA na presença de ATP. Como observado na Figura 5A, a aplicação focal de AMPA (50 μ M, 50 ms) induziu uma grande corrente de entrada (I_{AMPA} , amplitude: 304 ± 65 pA, área: $5.5 \times 10^5 \pm 0.7 \times 10^5$ pA*ms, tempo de decaimento (τ): 2669 ± 399 ms) em neurônios. A I_{AMPA} aumentou significativamente em amplitude (Fig. 5B, ~9% de aumento, 332 ± 73 pA, $p < 0,05$, $n=13$) e área (Fig. 5D, ~22% de aumento, $6.7 \times 10^5 \pm 1.0 \times 10^5$ pA*ms, $p < 0,01$) sem alterar (Fig. 5C, 2968 ± 392 ms, $p > 0,05$) durante a administração exógena de ATP. Vale destacar que, todos os parâmetros da I_{AMPA} continuaram a aumentar após a lavagem de ATP, alcançando significância estatística após 5 min (~20%, 36% e 15% para amplitude, área e Tau, respectivamente). De maneira semelhante a I_{L-glut} , não houve correlação positiva entre a porcentagem de mudança da amplitude e da área da I_{AMPA} 5 min após a aplicação de ATP e os valores basais absolutos de amplitude e área de I_{AMPA} (amplitude $R^2 = 0,085$, área $R^2 = 0,001$, Fig. 5E e F). Devido ao efeito persistente e desencadeado lentamente pelo ATP, não foi capaz avaliar durante a duração dos registros a cinética de recuperação dos efeitos promovidos pelo ATP.

Figura 5 – ATP potencia I_{AMPA} em neurônios PVN-RVLM

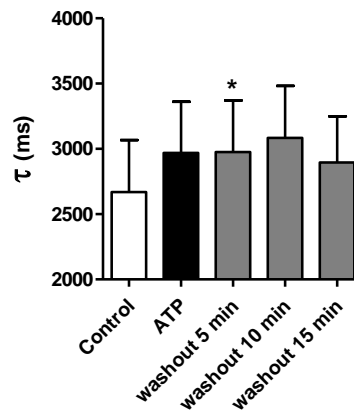
A



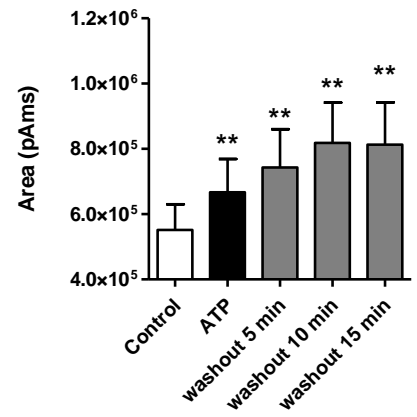
B



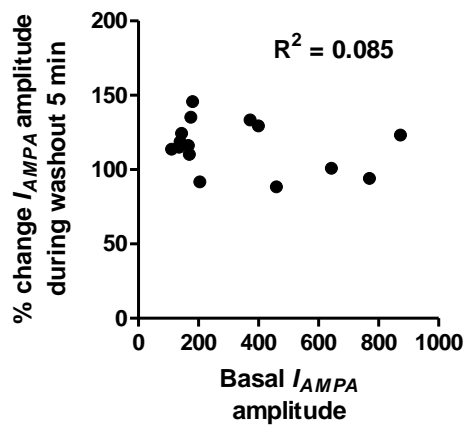
C



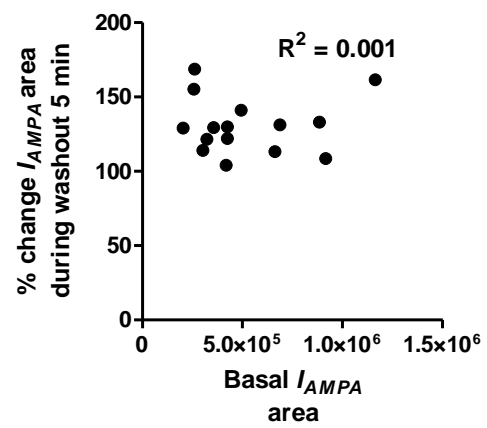
D



E



F

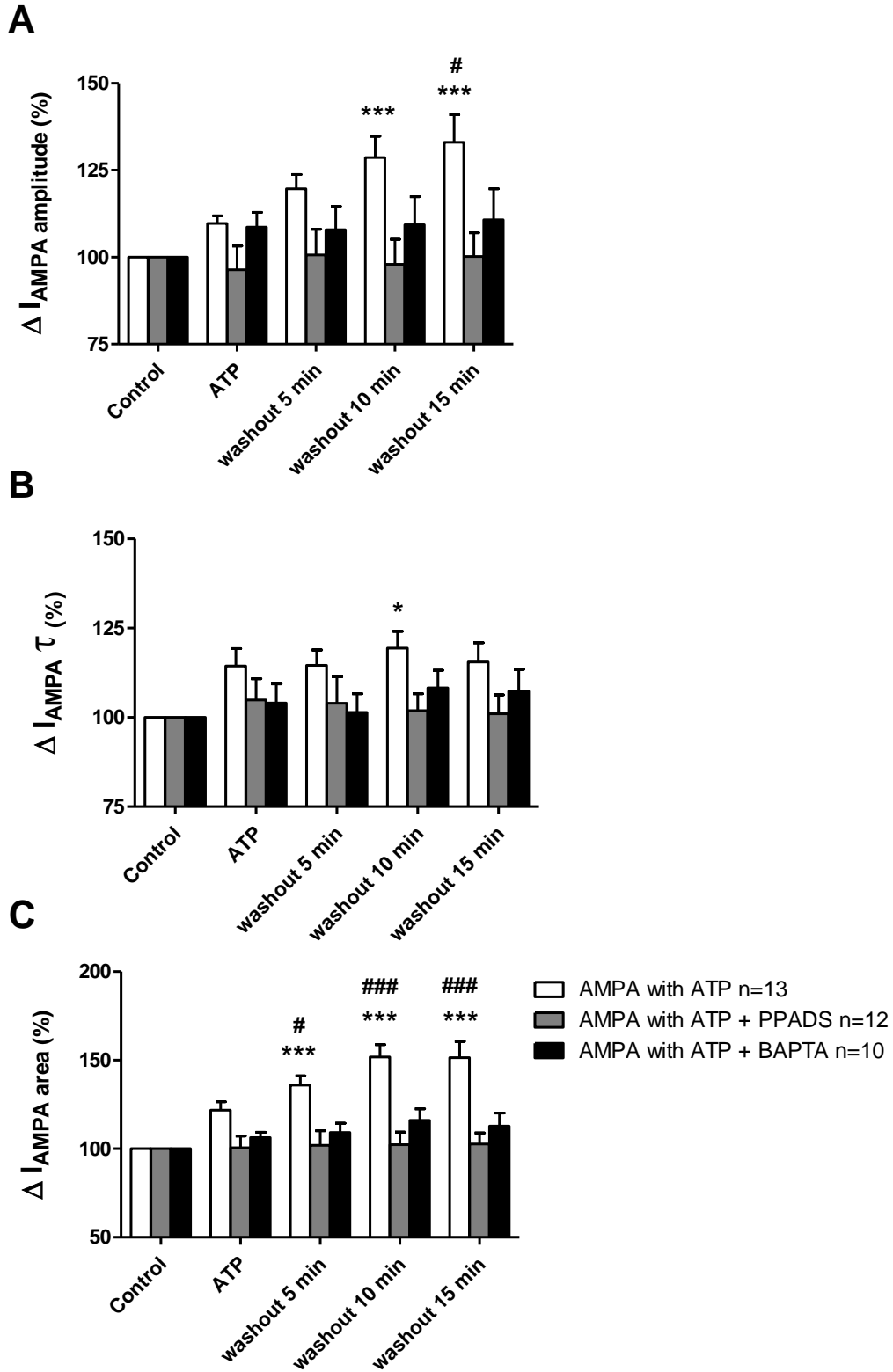


A, Traçados representativos em registro de *voltage-clamp whole-cell* (potencial de *holding*: -70 mV) de correntes induzida por três aplicações focais de AMPA (50 μ M, 50 ms, 5-10 psi) com um intervalo de 40s entre elas, antes e durante a administração de ATP. Resumo dos dados mostrando **(B)** a amplitude média da I_{AMPA} , **(C)** o tempo de decaimento médio da I_{AMPA} (τ) e **(D)** da área média da I_{AMPA} antes, durante e após a administração de ATP ($n=10$). **E** e **F**, Alteração percentual da amplitude **(E)** e área **(F)** da I_{AMPA} na presença de ATP em função dos valores absolutos basais da I_{AMPA} amplitude e área, mostrando a ausência de correlação entre estes fatores. * $p<0,05$, ** $p<0,01$ e *** $p<0,001$ vs basal, ANOVA de uma via para medidas repetidas com o pós-teste de Bonferroni.

5.4 A potenciação das I_{AMPA} induzidas pelo ATP em neurônios pré-simpáticos do PVN depende da ativação de receptores P2 e dos níveis intracelulares de Ca^{2+}

Para determinar se o aumento da I_{AMPA} durante o estímulo do ATP seria dependente da ativação de receptores P2, foi aplicado PPADS (10 μ M) 5 min antes da aplicação exógena de ATP. Além disso, buscamos avaliar se a potencialização da I_{AMPA} seria dependente do aumento de Ca^{2+} intracelular, e para isso realizamos experimentos nos quais os neurônios pré-simpáticos do PVN foram dialisados com BAPTA (10 mM), um quelante de Ca^{2+} , presente na pipeta de registro. Uma vez que os diferentes grupos estudados (AMPA com ATP, AMPA com ATP+PPADS e AMPA com ATP+BAPTA) foram realizados em diferentes grupos de neurônios, os dados foram normalizados e expressos como porcentagem de mudança em relação ao controle (aplicação focal de AMPA antes do estímulo de ATP foi considerada como 100%), para facilitar comparações relativas entre os grupos. Como mostrado na Figura 6, a aplicação prévia de PPADS bloqueou completamente a potenciação da amplitude de I_{AMPA} mediada por ATP aos 10 (Fig. 6A, AMPA lavagem 10 min: $29 \pm 6\%$ vs AMPA+PPADS lavagem 10 min: $-2 \pm 7\%$, $p < 0,001$) e 15 min (Fig. 6A, AMPA lavagem 15 min: $33 \pm 8\%$ vs AMPA+PPADS lavagem 15 min: $1 \pm 7\%$, $p < 0,001$) após o estímulo de ATP. Além disso, o antagonismo de receptores P2 reduziu o tempo de decaimento de I_{AMPA} 10 min após a aplicação de ATP no banho (Fig. 6B, AMPA lavagem 10 min: $19 \pm 4\%$ vs AMPA+PPADS lavagem 10 min: $2 \pm 5\%$, $p < 0,05$). Em relação, a área de I_{AMPA} (Fig. 6C), PPADS aboliu significativamente o aumento da área de I_{AMPA} induzido por ATP aos 5 (AMPA lavagem 5 min: $36 \pm 5\%$ vs AMPA+PPADS lavagem 5 min: $2 \pm 8\%$, $p < 0,001$), 10 (AMPA lavagem 10 min: $52 \pm 7\%$ vs AMPA+PPADS lavagem 10 min: $2 \pm 7\%$, $p < 0,001$) e 15 min após a aplicação de ATP em neurônios pré-simpáticos do PVN (AMPA lavagem 15 min: $51 \pm 9\%$ vs AMPA+PPADS lavagem 15 min: $3 \pm 6\%$, $p < 0,001$). Similarmente ao PPADS, a diálise intracelular de BAPTA em neurônios PVN-RVLM preveniu os efeitos induzidos pelo ATP na I_{AMPA} em termos de amplitude e tempo de decaimento e área (Fig. 6A–C). Em conjunto, estes dados são consistentes com a idéia de que a ativação de receptores P2 promove aumento de $[Ca^{2+}]_i$, o qual leva a potenciação de I_{AMPA} em neurônios pré-simpáticos do PVN.

Figura 6 – A potenciação da I_{AMPA} em neurônios pré-simpáticos do PVN induzida pelo ATP é dependente da ativação de receptores P2 e de alterações de Ca^{2+} intracelular



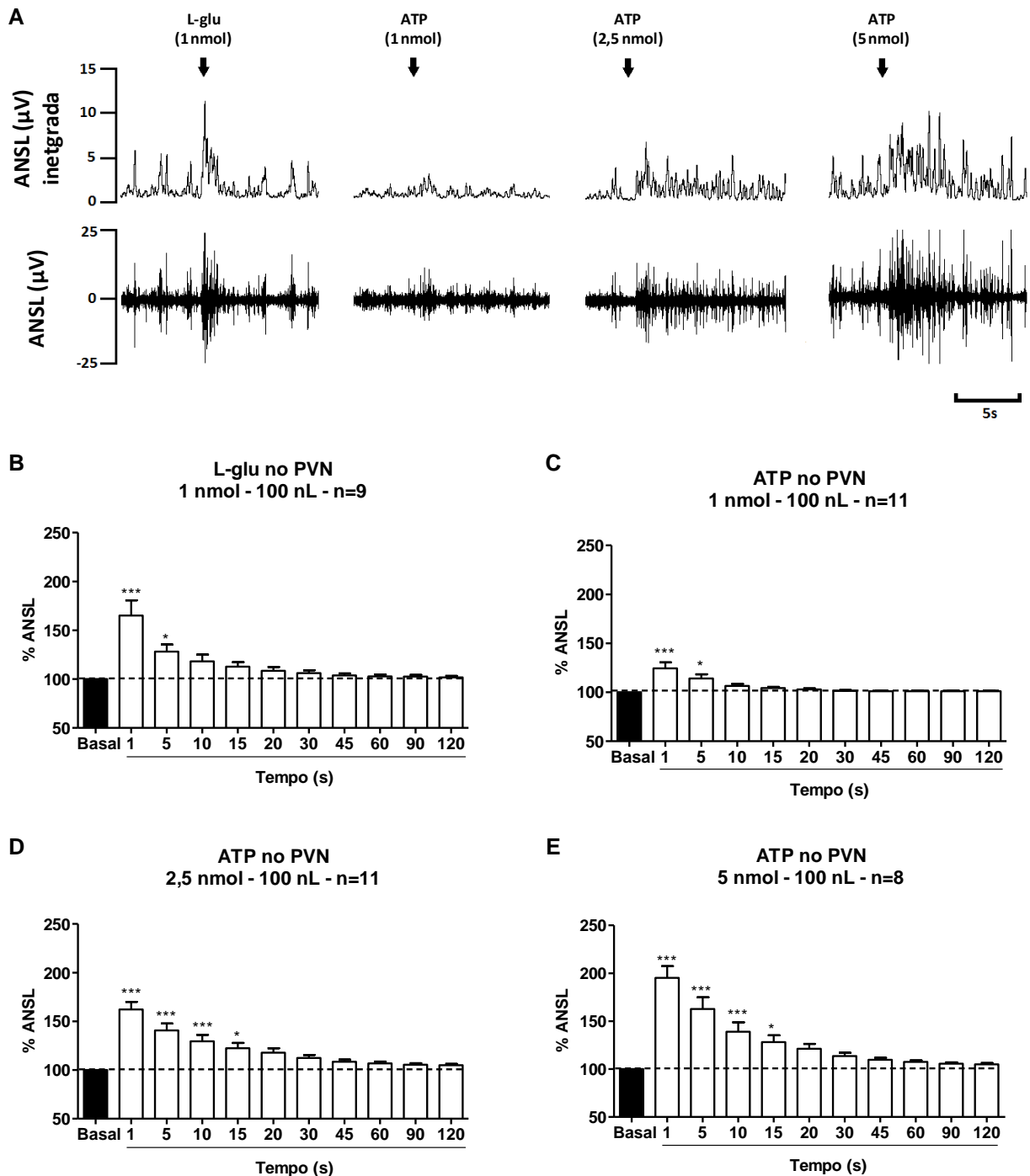
Alteração percentual média (**A**) na amplitude, (**B**) no tempo de decaimento e (**C**) na área da antes, durante e após a administração de ATP em neurônios PVN-RVLM previamente tratados com PPADS (barras cinza, n=12) e em neurônios dialisados com BAPTA (barras pretas, n=10). * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ comparado a $I_{AMPA} + ATP$ (barras brancas, n=13) vs PPADS no mesmo período avaliado. # $p < 0,05$ e ### $p < 0,001$ comparado a $I_{AMPA} + ATP$ vs BAPTA no mesmo período avaliado, ANOVA de uma via para medidas repetidas com o pós-teste de Bonferroni.

5.5 Efeito na ANSL decorrente da microinjeção de ATP e α,β meATP no PVN

Uma vez que o ATP foi capaz de aumentar a frequência de potenciais de ação de neurônios PVN-RVLM, buscou-se verificar se a microinjeção de ATP no PVN seria capaz de promover alterações na ANSL. Para tal, os experimentos foram conduzidos no sentido de identificar o PVN com a microinjeção de L-glu (1 nmol) seguido da aplicação de ATP (1, 2,5 e 5 nmol). A figura 7A mostra os traçados representativos dos efeitos na ANSL produzidos pela microinjeção unilateral no PVN de L-glu e ATP nas três diferentes concentrações. A microinjeção de L-glu no PVN promoveu um aumento rápido e robusto na ANSL. No primeiro segundo após a injeção de L-glu a ANSL aumentou $65\pm 16\%$ acima da atividade simpática basal (Fig. 7A e B). O efeito simpatoexcitatório do L-glu no PVN teve duração de no máximo 15s, sendo que após este período o nível da atividade simpática retornou aos valores basais. Após a identificação do PVN foi realizada a aplicação de ATP para testar seus possíveis efeitos. Como pode ser observado na Figura 7A, o ATP foi capaz de induzir aumento rápido e marcante na ANSL de maneira concentração-dependente. A injeção de ATP aumentou a ANSL logo no primeiro segundo de acordo com as diferentes concentrações microinjetadas no PVN: 1 nmol: $24\pm 6\%$; 2,5 nmol: $62\pm 8\%$; 5 nmol: $95\pm 12\%$, em relação a atividade simpática basal (Fig. 7C, D, e E). Além disso, a duração da resposta do ATP na ANSL também foi concentração-dependente. Para a concentração de 1 nmol a duração da resposta foi entre 5 e 10s até retornar aos valores basais (Fig 7C). Com relação à concentração de 2,5 nmol, a simpatoexcitação teve duração de 15 a 20s, porém observamos a ANSL ainda levemente aumentada 30s mais tarde (Fig. 7D). No que diz respeito à concentração de 5 nmol, o efeito simpatoexcitatório do ATP estendeu-se por 20 a 25s e manteve-se ligeiramente aumentado até 45s após a microinjeção (Fig. 7E). Além disso, as respostas induzidas pelo ATP foram reproduzíveis, uma vez que subsequentes microinjeções promoveram respostas similares, independente da sequência de concentrações microinjetadas no PVN do mesmo animal, evidenciando que a viabilidade dos neurônios mesmo após sucessivas microinjeções neste núcleo. Cabe ressaltar que a injeção de salina

diretamente no PVN ou ATP em regiões adjacentes ao PVN não produziu alterações significativas na ANSL.

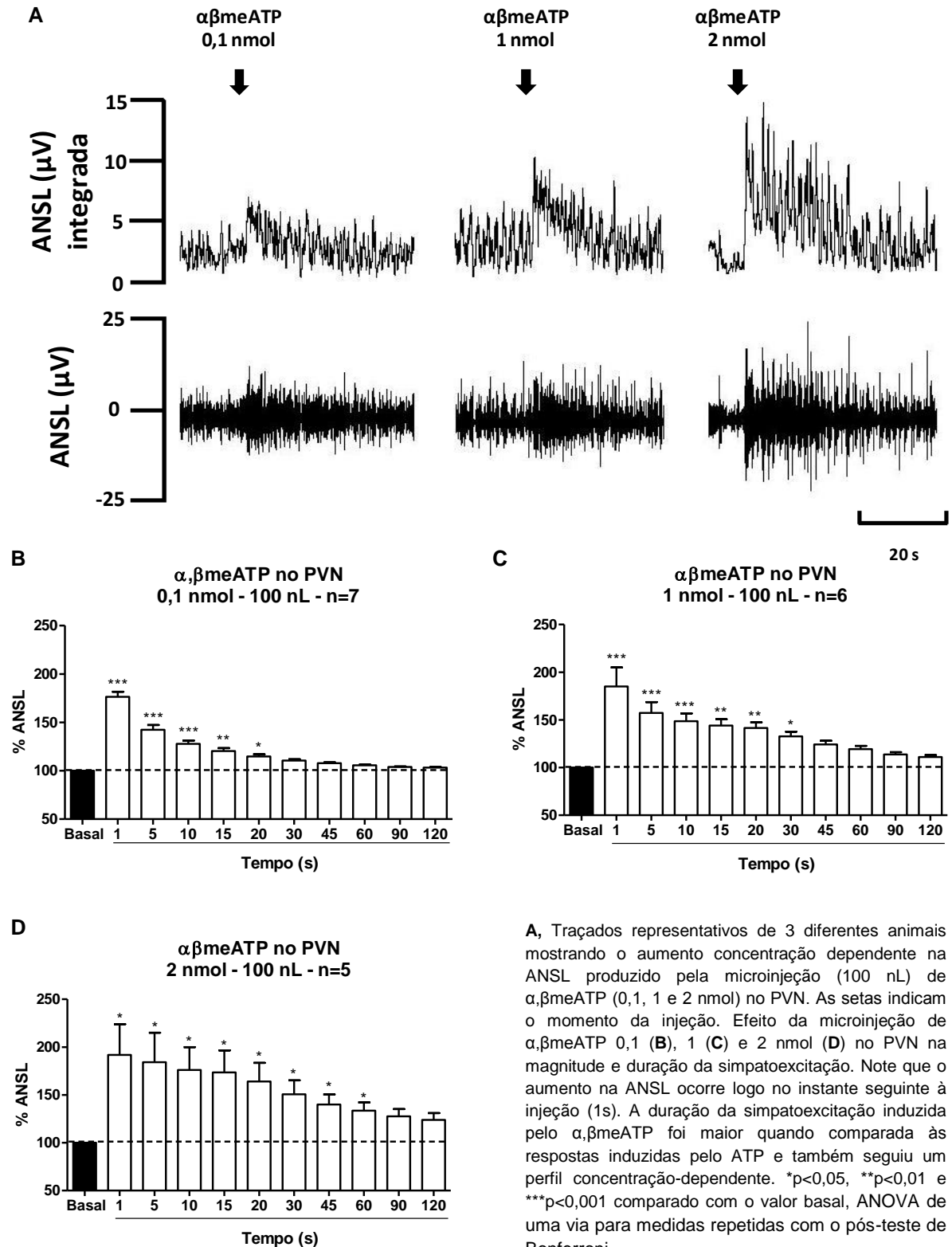
Figura 7 – Microinjeção de ATP no PVN aumenta a atividade simpática lombar de maneira concentração dependente



A, Traçados representativos de 4 diferentes animais mostrando o aumento concentração dependente na ANSL produzido pela microinjeção (100 nL) de ATP (1, 2,5 e 5 nmol) ou L-glu (1 nmol) no PVN. As setas indicam o momento da injeção. Efeito da microinjeção de L-glu 1 nmol (**B**) e ATP 1 (**C**), 2,5 (**D**) e 5 nmol (**E**) no PVN sobre a magnitude e duração da simpatooexcitação. Note que o aumento na ANSL ocorre logo no instante seguinte a injeção (1s). A duração da simpatooexcitação induzida pelo ATP também foi dose dependente. * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ comparado com o valor basal, ANOVA de uma via para medidas repetidas com o pós-teste de Bonferroni.

Em complemento aos experimentos com ATP, também foram avaliados os efeitos do $\alpha,\beta\text{meATP}$, um análogo estável do ATP. A figura 8A ilustra os traçados representativos dos efeitos produzidos na ANSL após a aplicação de $\alpha,\beta\text{meATP}$ (0,1, 1 e 2 nmol) diretamente no PVN. De forma similar ao observado com o ATP, a microinjeção unilateral de $\alpha,\beta\text{meATP}$ no PVN induziu respostas rápidas e intensas de aumento na ANSL seguindo um perfil concentração dependente (Figura 8). A microinjeção de $\alpha,\beta\text{meATP}$ no PVN promoveu aumento significativo na ANSL logo no primeiro segundo de acordo com as diferentes concentrações: 0,1 nmol: $76\pm 5\%$; 1 nmol: $85\pm 20\%$; 2 nmol: $92\pm 32\%$, em relação a atividade simpática basal (Fig. 8B, C e D). Além disso, a duração da resposta sobre a ANSL induzida pelo $\alpha,\beta\text{meATP}$ no PVN também foi concentração-dependente, igualmente ao observado nos resultados com a microinjeção de ATP. A duração da simpatoexcitação induzida pela administração de $\alpha,\beta\text{meATP}$ (0,1 nmol) no PVN foi de 20 a 30s até que a ANSL retornasse aos valores basais (Fig. 8B). A microinjeção de uma concentração maior de $\alpha,\beta\text{meATP}$ (1 nmol) promoveu uma resposta ainda mais duradoura na ANSL, com efeitos estendendo-se por 45 ou até 60s (Fig. 8C). Além do mais, a microinjeção da maior concentração de $\alpha,\beta\text{meATP}$ (2 nmol) no PVN fez com que o aumento na atividade simpática se prolongasse além de 120s antes retornar aos valores basais (Fig. 8D). Da mesma forma ao observado com o ATP, as respostas do $\alpha,\beta\text{meATP}$ foram reproduzíveis e não sujeitas a dessensibilização, uma vez que repetidas injeções, no mesmo animal, produziram respostas comparáveis, independente da sequência de aplicação das diferentes concentrações de $\alpha,\beta\text{meATP}$. É importante mencionar que a microinjeção de $\alpha,\beta\text{meATP}$ fora do PVN não promoveu qualquer alteração na ANSL.

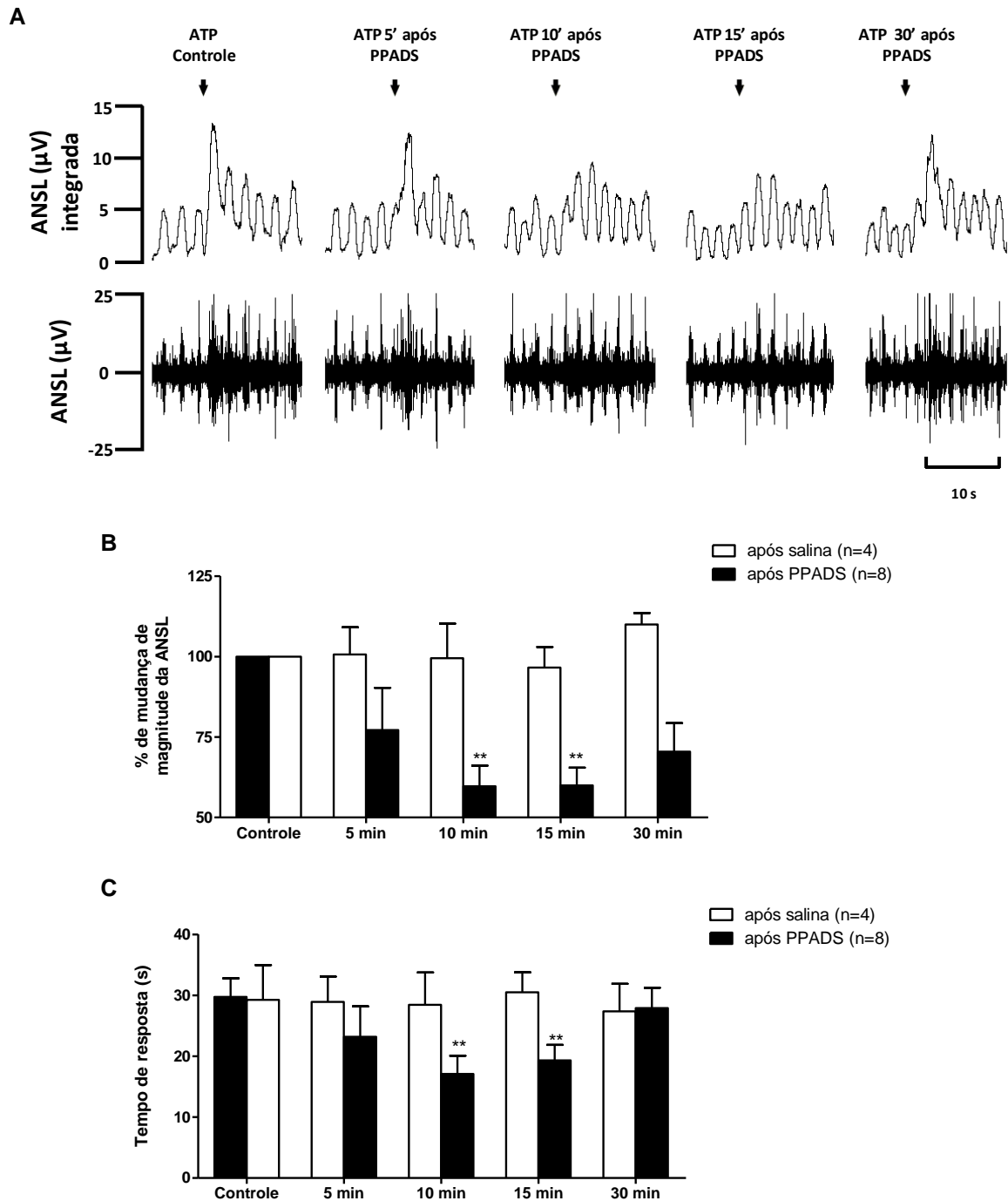
Figura 8 – Microinjeção de α,β meATP no PVN induz simpatooexcitação concentração dependente



5.6 Efeito da microinjeção de ATP na ANSL após o antagonismo dos receptores P2 no PVN

Após a determinação do efeito concentração dependente para o ATP no PVN e os efeitos sobre a atividade simpática, propusemos avaliar se o antagonismo de receptores P2 com PPADS neste mesmo núcleo seria capaz de bloquear ou atenuar estes efeitos e para isto optamos por escolher a concentração intermediária de ATP (2,5 nmol) para execução deste protocolo. As respostas de simpatoexcitação induzidas pela microinjeção de ATP (2,5 nmol; 100 nL) diretamente no PVN antes do antagonismo com PPADS foram consideradas como 100% (ATP controle), sendo que as alterações na magnitude da ANSL induzidas pelo ATP após a injeção de PPADS no mesmo sítio foram sempre analisadas em relação a este controle. Esta forma de avaliação também foi utilizada para os resultados dos protocolos seguintes. A figura 9A mostra os traçados representativos das alterações na ANSL promovidas pela microinjeção de ATP no PVN antes e após a aplicação de PPADS no mesmo sítio. A injeção de PPADS (0,5 nmol; 100 nL) não promoveu qualquer alteração na ANSL basal (dados não mostrados). O aumento na ANSL decorrente da microinjeção de ATP no PVN não foi atenuado significativamente aos 5 min (Fig. 9B e C) após a prévia aplicação de PPADS no mesmo sítio (ATP controle: 100% vs ATP 5 min: $77\pm 13\%$, n=8), assim como a duração da resposta (ATP controle: 29 ± 6 s vs ATP 5 min: 23 ± 5 s, n=8). Aos 10 e 15 min após o antagonismo dos receptores P2 (Fig. 9B e C) a simpatoexcitação induzida pelo ATP injetado no PVN foi atenuada tanto em amplitude (10 min: $59\pm 6\%$; 15 min: $59\pm 5\%$) quanto no tempo de resposta (10 min: 17 ± 3 s; 15 min: 19 ± 3 s, n=8). Aos 30 min após o antagonismo dos receptores P2 o ATP foi capaz de promover respostas muito semelhantes à situação controle quanto à duração da resposta (Fig. 9B e C; 30 min: 28 ± 3 s), no entanto a magnitude manteve-se ainda atenuada (30 min: $70\pm 9\%$) quando comparados ao ATP controle. Os resultados com a microinjeção prévia de salina (controle veículo) no PVN não promoveu qualquer alteração no aumento da atividade simpática e a duração da resposta induzidos pelo ATP no mesmo sítio. (Fig. 9B e C).

Figura 9 – Antagonismo dos receptores P2 no PVN atenua a simpatoexcitação induzida pelo ATP

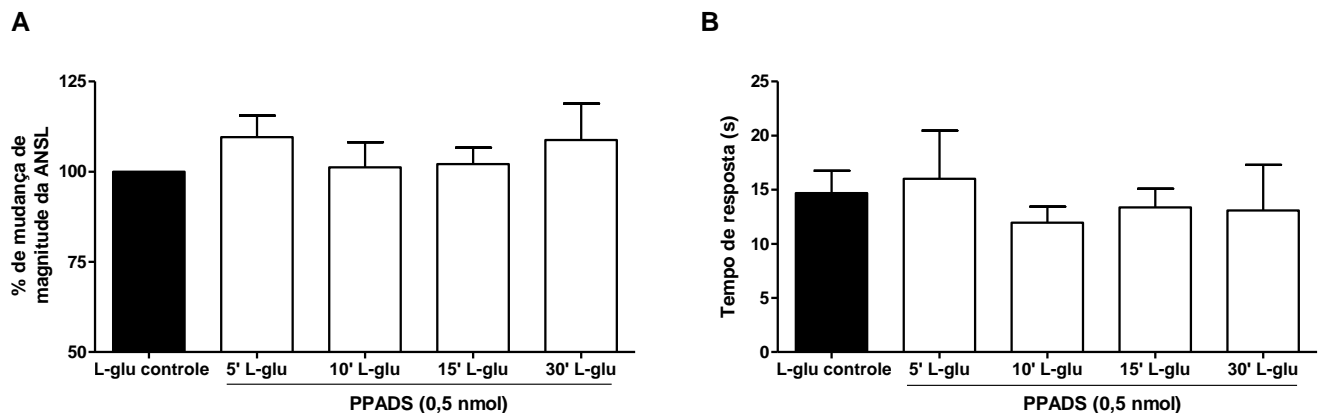


A, Traçados representativos de um animal demonstrando o efeito da microinjeção de ATP (2,5 nmol, 100 nL) no PVN na atividade simpática lombar (ANSL) antes e após a administração do antagonista de receptores purinérgicos, PPADS (0,5 nmol, 100 nL). **(B)** Porcentagem de alteração na magnitude da ANSL e **(C)** duração da simpatoexcitação (do início da resposta até o retorno à linha de base), respectivamente, induzido pela microinjeção de ATP no PVN antes e após a microinjeção de PPADS ou salina no mesmo sítio. ** $p < 0,01$ comparado com o ATP controle, ANOVA de uma via para medidas repetidas com o pós-teste de Bonferroni.

5.7 Efeito da microinjeção de L-glu na ANSL após o antagonismo dos receptores P2 no PVN

Com o objetivo de verificarmos uma possível cotransmissão entre os sistemas glutamatérgico e purinérgico no PVN, realizamos um protocolo para avaliar se a simpatoexcitação induzida pelo L-glu microinjetado diretamente no PVN seria atenuada pelo prévio antagonismo dos receptores P2 com PPADS no mesmo sítio. Como podemos observar na figura 10A e B, a prévia microinjeção de PPADS no PVN não foi capaz de alterar a magnitude nem mesmo o tempo de resposta, respectivamente, na ANSL induzidos pelo L-glu injetado no mesmo sítio.

Figura 10 – Antagonismo dos receptores P2 no PVN não altera a simpatoexcitação induzida pela microinjeção de L-glu no PVN

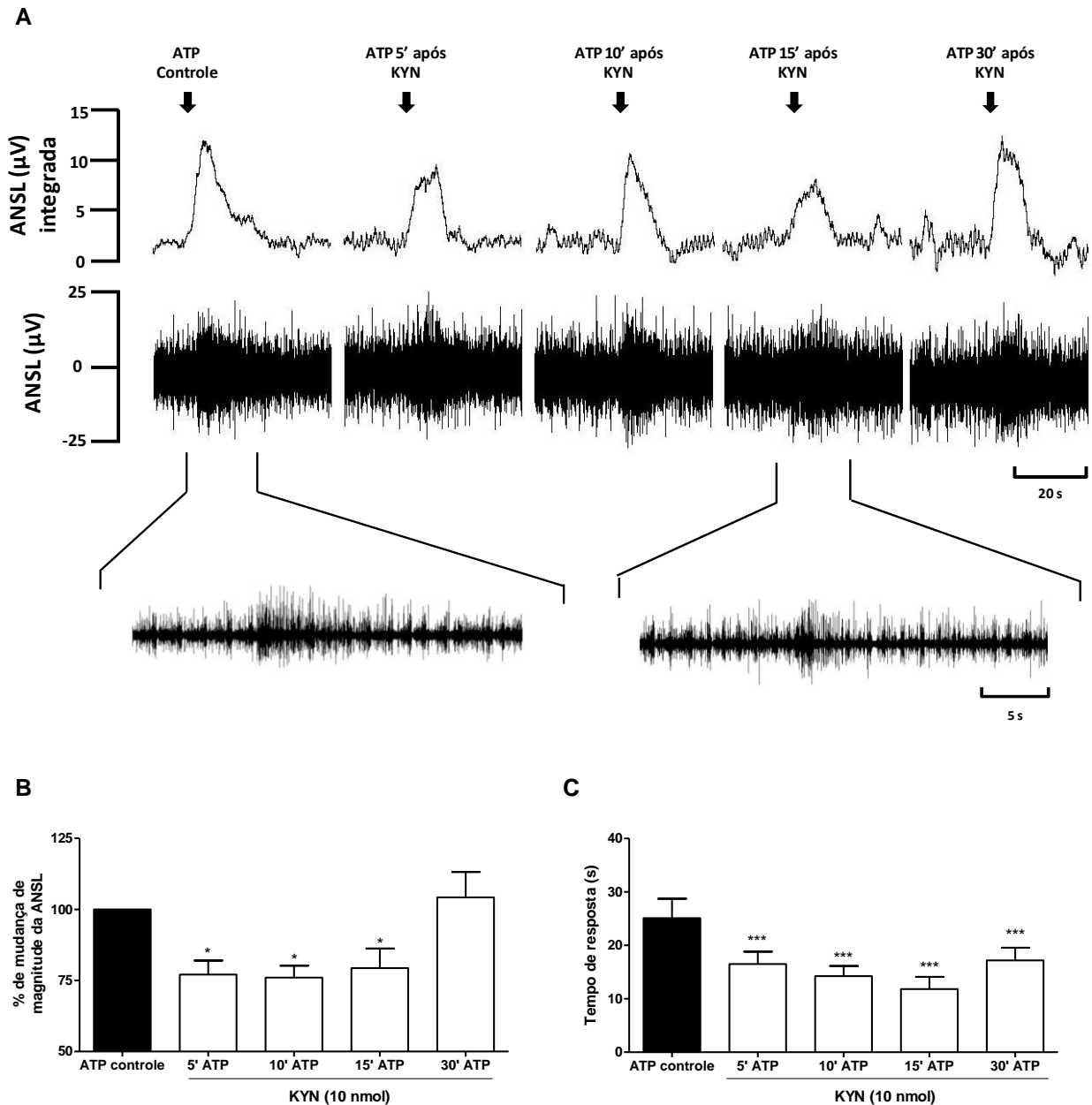


A, Alteração percentual na magnitude da ANSL e **(B)** duração da simpatoexcitação (do início da resposta até o retorno a linha de base) decorrente da microinjeção de L-glu (1 nmol, 100 nL) no PVN antes e após da aplicação de PPADS (0,5 nmol, 100 nL) no mesmo sítio; (n=6), ANOVA de uma via para medidas repetidas com o pós-teste de Bonferroni.

5.8 Efeito da microinjeção de ATP na ANSL após o antagonismo dos receptores ionotrópicos glutamatérgicos e/ou dos receptores P2 no PVN

Na sequência, avaliamos se a simpatoexcitação induzida pelo ATP microinjetado no PVN teria também a contribuição de uma liberação endógena de L-glu. Para tal, testamos os efeitos do ATP sobre a ANSL antes e após a administração de KYN neste núcleo. A figura 11A representa os efeitos da microinjeção de ATP no PVN nas alterações da ANSL antes e após a administração de KYN. Podemos observar na figura 11B que a magnitude da simpatoexcitação induzida pela microinjeção de ATP (2,5 nmol; 100 nL) no PVN foi atenuada aos 5 ($77\pm 5\%$), 10 ($76\pm 4\%$) e 15 ($79\pm 7\%$) min após a aplicação de KYN (10 nmol; 100 nL, n=7) no mesmo sítio quando comparado ao ATP controle (100%). Podemos notar ainda que aos 30 min ($104\pm 9\%$) o aumento na ANSL induzido pela microinjeção de ATP retornou aos valores próximos daqueles observados na situação controle. No que se refere à duração da resposta (Fig. 11C) promovida pela microinjeção do ATP no PVN, a mesma foi atenuada em todos os períodos testados (ATP controle: 25 ± 4 s; 5min: 16 ± 2 s; 10 min: 14 ± 2 s; 15 min: 12 ± 2 s; 30 min: 17 ± 2 s).

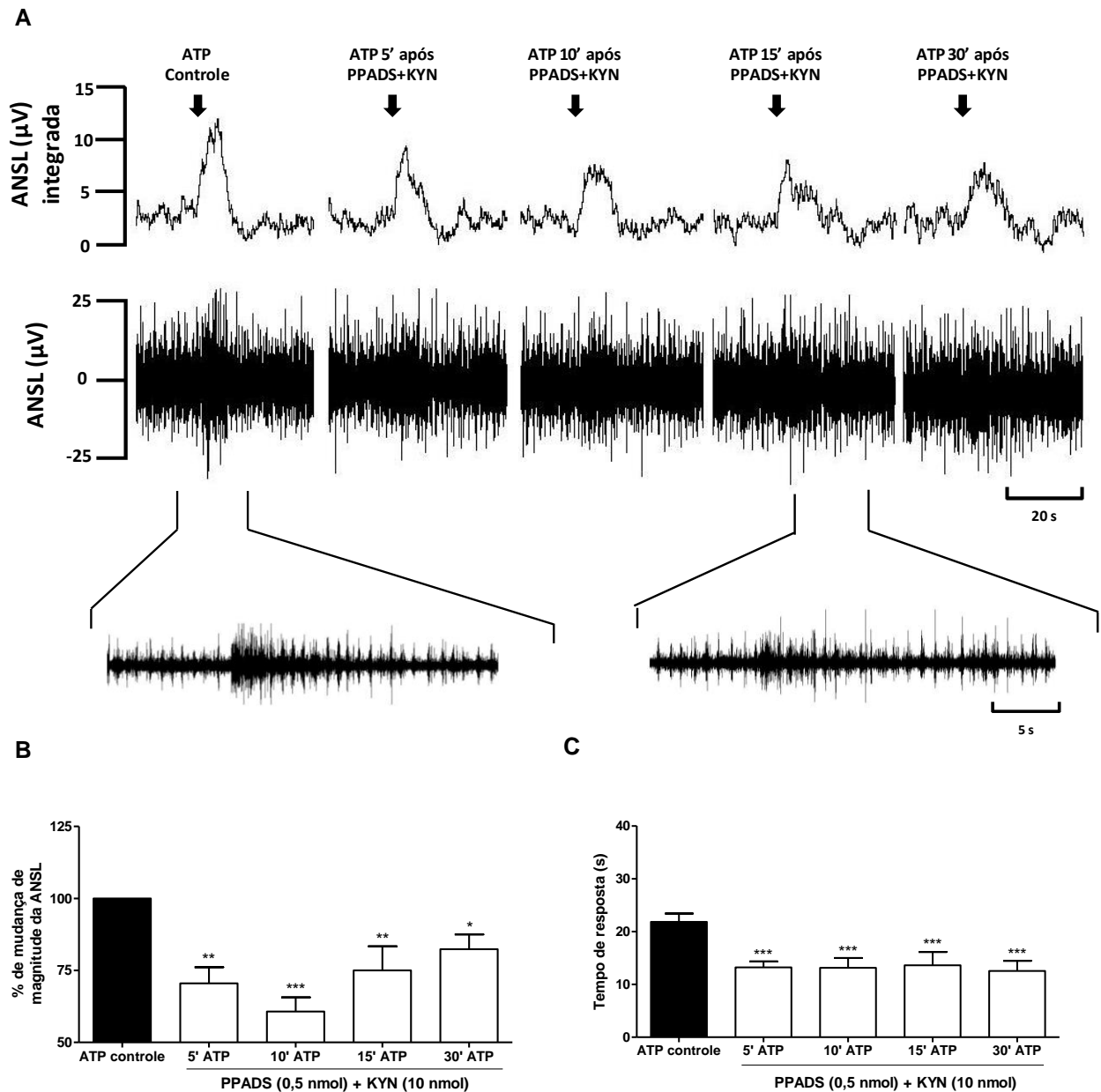
Figura 11 – A simpatoexcitação induzida pela microinjeção de ATP no PVN é reduzida após o antagonismo dos receptores ionotrópicos glutamatérgicos



A, Traçados representativos de um animal mostrando o efeito da microinjeção de ATP (2,5 nmol, 100 nL) no PVN na atividade simpática lombar (ANSL) antes e após o antagonismo de receptores ionotrópicos glutamatérgicos, KYN (10 nmol, 100 nL). **(B)** Alteração percentual na magnitude da ANSL e **(C)** duração da simpatoexcitação (do início da resposta até o retorno a linha de base) decorrente da microinjeção de ATP no PVN antes e depois do antagonismo dos receptores ionotrópicos de glutamato com KYN no mesmo sítio. * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ comparado com o ATP controle; ($n=7$), ANOVA de uma via para medidas repetidas com o pós-teste de Bonferroni.

Diante destes resultados o objetivo seguinte foi verificar uma possível cotransmissão entre ATP e L-glu, e para isso foi microinjetado uma mistura dos antagonistas PPADS e KYN (0,5 nmol + 10 nmol, respectivamente, 100 nL) antes e após os efeitos na ANSL decorrentes da microinjeção de ATP no PVN. A figura 12A mostra os traçados representativos da microinjeção de ATP no PVN na ANSL antes e após o duplo antagonismo (PPADS + KYN) no mesmo sítio. O conjunto dos resultados evidencia que o duplo antagonismo foi eficiente em atenuar a resposta simpatoexcitatória induzida pela microinjeção de ATP no PVN tanto na magnitude (ATP controle: 100%; 5 min: $70\pm 6\%$; 10 min: $61\pm 5\%$; 15 min: $75\pm 8\%$; 30 min: $82\pm 5\%$; n=6; figura 12B) bem como para a duração da resposta (ATP controle: 22 ± 2 s; 5 min: 13 ± 1 s; 10 min: 13 ± 2 s; 15 min: 14 ± 3 s; n=6), sem reversão mesmo 30 min (13 ± 2 s) mais tarde (figura 12C). Vale a pena salientar que a microinjeção da mistura dos antagonistas purinérgicos e glutamatérgicos diretamente no PVN não promoveu qualquer alteração significativa sobre a atividade simpática basal (dados não mostrados).

Figura 12 – KYN facilita a atenuação mediada pelo PPADS no aumento da atividade simpática induzido pelo ATP quando microinjetados no PVN

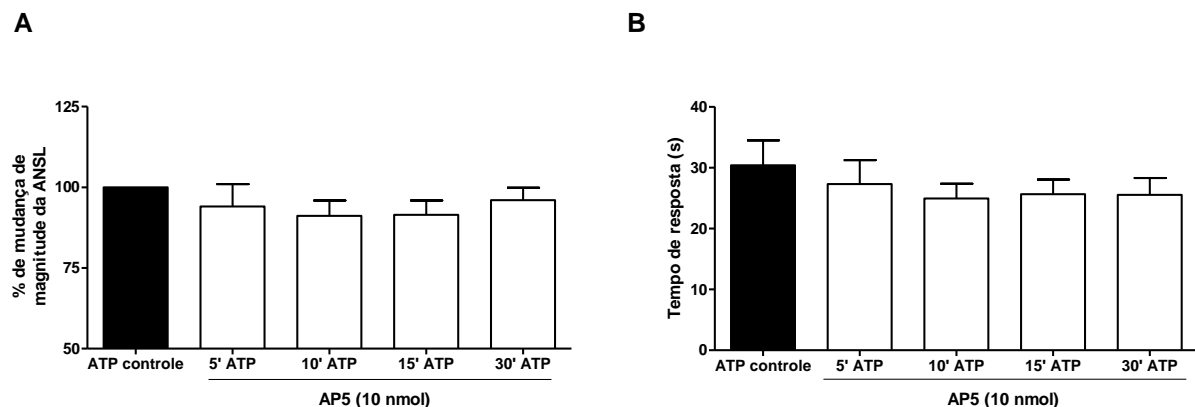


A, Traçados representativos de um animal mostrando o efeito da microinjeção de ATP (2,5 nmol, 100 nL) no PVN na atividade simpática lombar (ANSL) antes e após a administração do antagonista de receptores ionotrópicos glutamatérgicos, KYN (10 nmol, 100 nL) e do antagonista de receptores purinérgicos, PPADS (0,5 nmol, 100 nL). **(B)** Alteração percentual na magnitude da ANSL e **(C)** duração da simpatoexcitação (do início da resposta até o retorno a linha de base) decorrente da microinjeção de ATP no PVN antes e depois da aplicação de PPADS+KYN no mesmo sítio. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ comparado com o ATP controle; (n=6), ANOVA de uma via para medidas repetidas com o pós-teste de Bonferroni.

5.9 Efeito da microinjeção de ATP após o antagonismo de receptores NMDA ou não-NMDA de glutamato no PVN sobre a ANSL

Visto que o KYN injetado no PVN foi capaz de atenuar a resposta do ATP sobre a ANSL, buscamos verificar quais subtipos de receptores ionotrópicos glutamatérgicos no PVN estariam envolvidos nos efeitos induzidos pelo ATP. Inicialmente, os efeitos do ATP (2,5 nmol) foram testados antes e após o antagonismo de receptores ionotrópicos NMDA com a utilização de AP5 (10 nmol, 100 nL). A figura 13 demonstra que a resposta simpatoexcitatória induzida pela injeção de ATP no PVN não foi atenuada após a aplicação de AP5 no mesmo sítio tanto para a amplitude da resposta (Fig 13A) bem como para a duração da mesma (Fig 13B). É importante salientar que a microinjeção de AP5 no PVN não promoveu qualquer alteração significativa na ANSL basal (dados não mostrados).

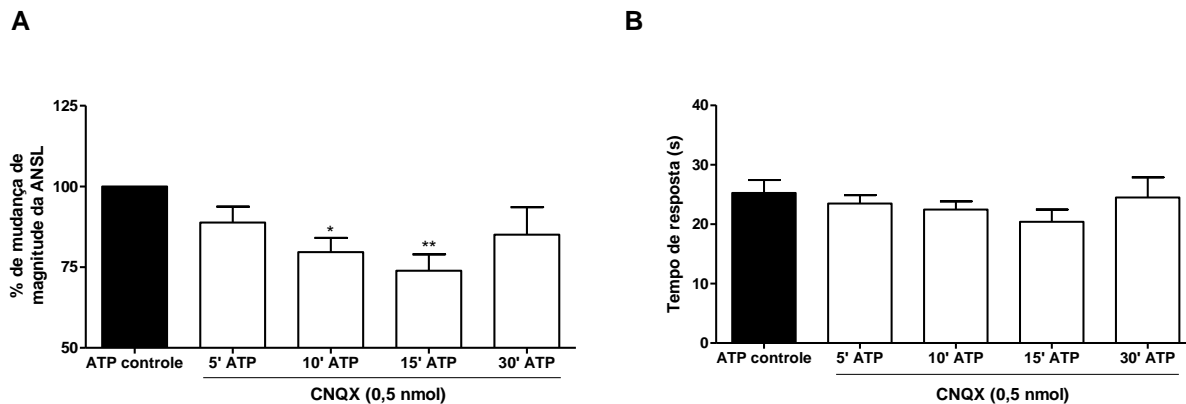
Figura 13 – Receptores NMDA do PVN não contribuem para a simpatoexcitação induzida pela microinjeção de ATP



A, Alteração percentual na magnitude da ANSL e **(B)** duração da simpatoexcitação (do início da resposta até o retorno a linha de base) decorrente da microinjeção de ATP (2,5 nmol, 100 nL) no PVN antes e depois do antagonismo de receptores NMDA com AP5 (10 nmol, 100 nL) no mesmo sítio; (n=9), ANOVA de uma via para medidas repetidas com o pós-teste de Bonferroni.

Uma vez que o antagonismo dos receptores NMDA não alterou a resposta do ATP sobre a ANSL, buscamos verificar se os receptores do subtipo não-NMDA estariam envolvidos nestes efeitos. Para tal, foram avaliados os efeitos de simpatoexcitação decorrentes da microinjeção de ATP no PVN antes e após o antagonismo dos receptores não-NMDA do glutamato com CNQX (0,5 nmol, 100 nL). A figura 14A demonstra que o aumento na ANSL decorrente da injeção de ATP no PVN (ATP controle: 100%, n=7) foi significativamente atenuada aos 10 min (80±4%) e 15 min (74±5%) após a injeção de CNQX no mesmo sítio, com retorno aos valores próximos ao basal 30 min mais tarde (85±9%). Na figura 14B podemos notar que a duração da simpatoexcitação induzida pelo ATP no PVN não foi alterada com o prévio antagonismo dos receptores não-NMDA. Da mesma forma como observado para os outros antagonistas, a microinjeção de CNQX não induziu alterações significativas na ANSL basal (dados não mostrados).

Figura 14 – O aumento da atividade simpática lombar promovido pela microinjeção de ATP no PVN é dependente da ativação de receptores não-NMDA

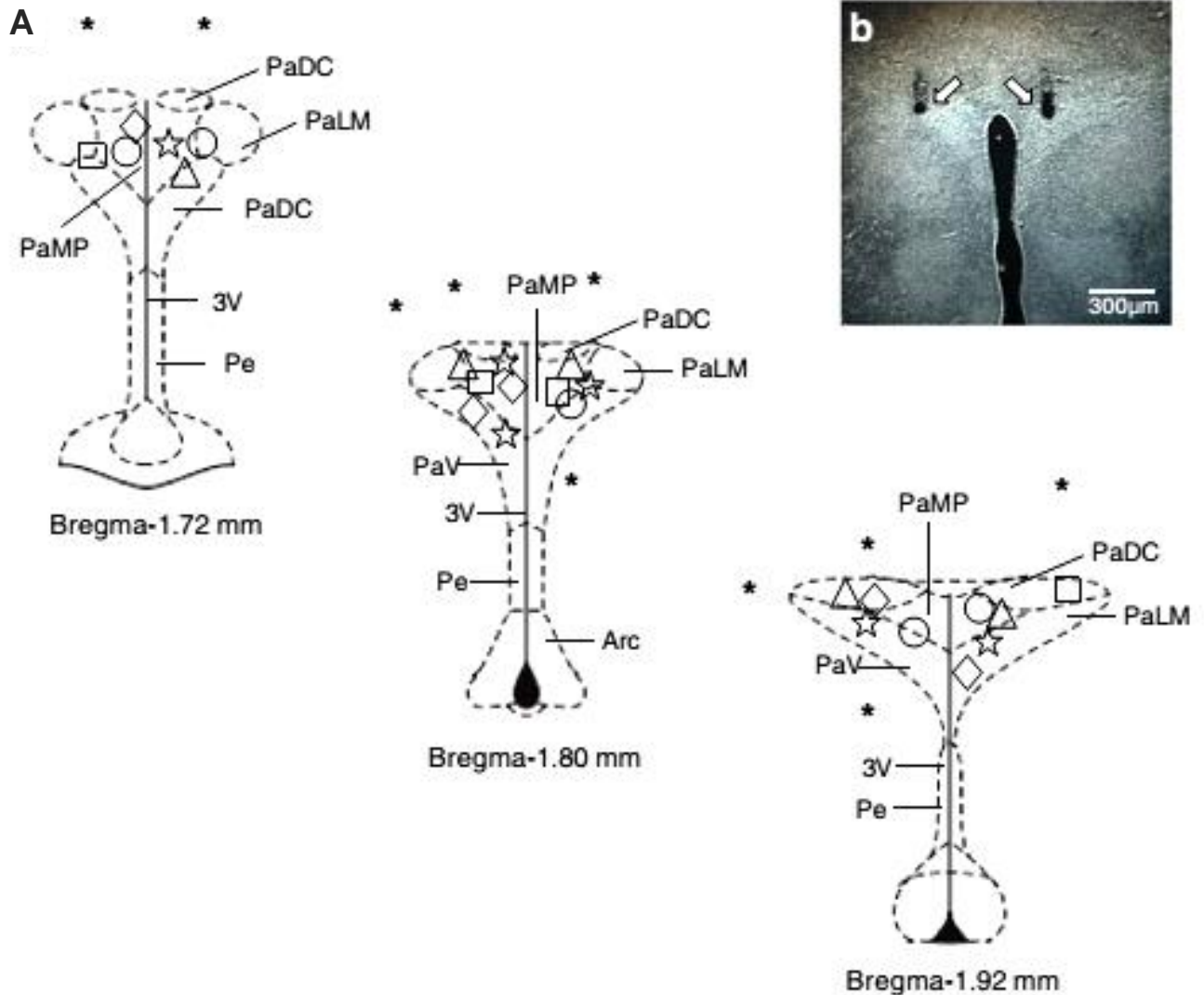


A, Alteração percentual na magnitude da ANSL e **(B)** duração da simpatoexcitação (do início da resposta até o retorno a linha de base) decorrente da microinjeção de ATP (2,5 nmol, 100 nL) no PVN antes e depois do antagonismo de receptores não-NMDA com CNQX (0,5 nmol, 100 nL) no mesmo sítio. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ comparado com o ATP controle; (n=7), ANOVA de uma via para medidas repetidas com o pós-teste de Bonferroni.

5.10 Sítios das microinjeções no PVN

Como demonstrado no diagrama esquemático da figura 15A e na fotomicrografia do sítio de injeção da figura 15b, todas as microinjeções dos experimentos reportados aqui estiveram confinadas dentro dos limites do PVN definido pelo atlas de cérebro de ratos de Paxinos e Watson, com discreto espalhamento para outras regiões hipotalâmicas adjacentes ao PVN. As microinjeções feitas fora dos limites do PVN não induziram alterações significativas na ANSL, demonstrando que os efeitos dos agonistas e/ou antagonistas purinérgicos e glutamatérgicos são especificamente dependentes do PVN. Além disso, na preparação de rato decorticado, não anestesiado e artificialmente perfundido, foi possível utilizar ambos os lados do PVN para executar diferentes protocolos experimentais sem alterações na ANSL que pudessem afetar os efeitos dos diversos agonistas e antagonistas utilizados neste estudo.

Figura 15 – Microinjeções no PVN



A, Corte coronal do hipotálamo no nível do PVN modificado do atlas de encéfalo de rato de Paxinos e Watson (2004), mostrando o centro da maioria das microinjeções de ATP (estrela não preenchida) e de α, β -meATP (losango não preenchido), L-glu ou ATP vs. PPADS (círculo não preenchido), ATP vs. KYN ou PPADS + KYN (quadrado não preenchido), ATP vs. AP5 ou CNQX (triângulo não preenchido). Os asteriscos representam as microinjeções fora do PVN em todos os protocolos. **B**, Fotomicrografia representativa de uma microinjeção bilateral no PVN (microscopia de campo escuro). As setas mostram o trajeto e a posição da ponta da micropipeta. PaDC, porção dorsal do núcleo paraventricular do hipotálamo; PaLM, subdivisão magnocelular lateral do núcleo paraventricular do hipotálamo; PaV, porção ventral do núcleo paraventricular do hipotálamo; Pe, núcleo hipotalâmico periventricular; Arc, núcleo arqueado; 3V, terceiro ventrículo

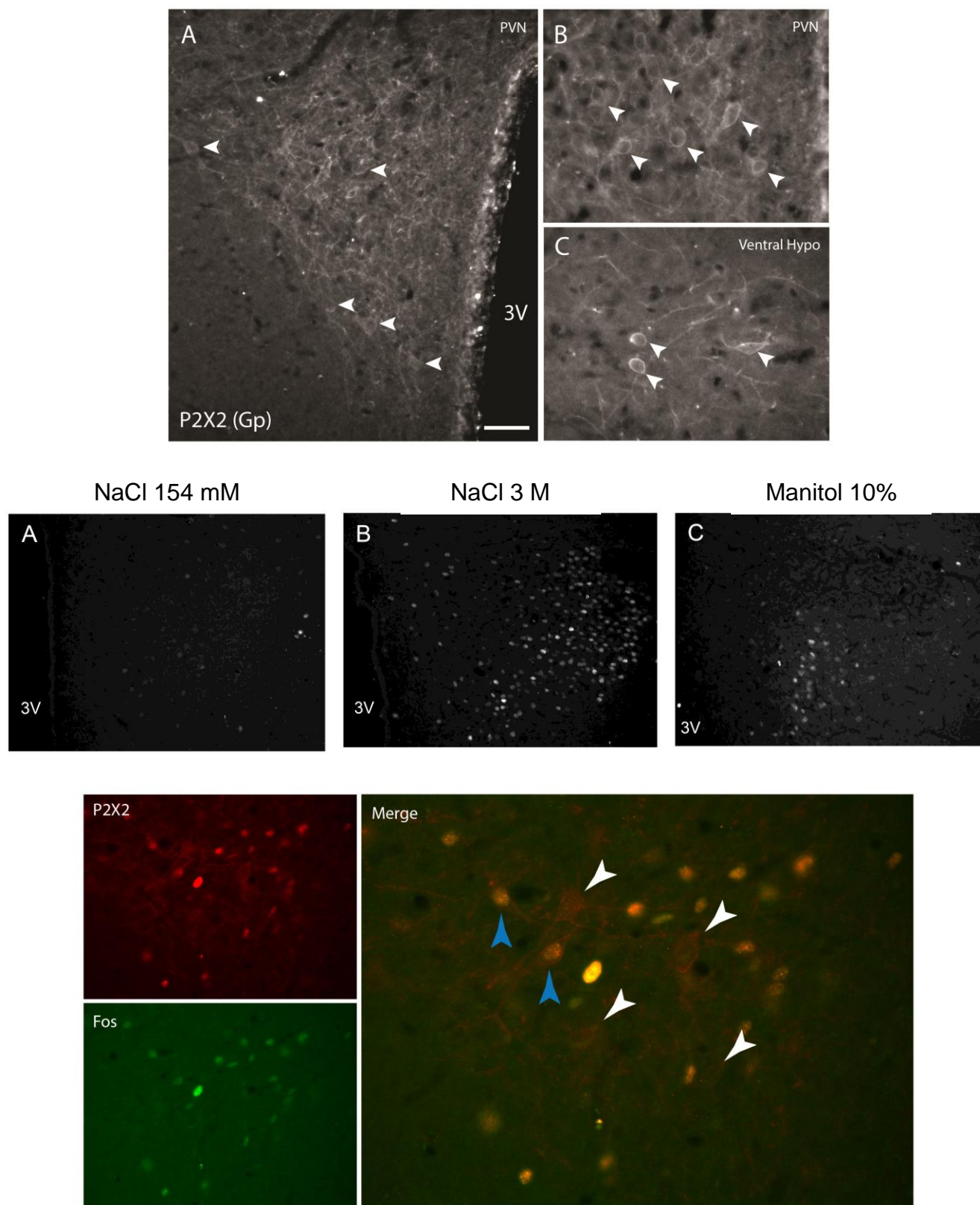
5.11 Aumento agudo da osmolaridade plasmática ativa neurônios do PVN que expressam receptores P2X₂

Na tentativa de verificar se os neurônios do PVN que expressam receptores P2X₂ estariam envolvidos em algum mecanismo fisiológico, realizamos experimentos para avaliar se os neurônios do PVN que expressam receptores P2X₂ seriam ativados após um estímulo osmótico agudo. Como pode ser observado na figura 16 (painel superior), a marcação de receptores P2X₂ em neurônios do PVN foi evidente em todas as divisões deste núcleo hipotalâmico. No entanto, a marcação mais abundante foi observada na subdivisão lateral parvocelular do PVN (Fig. 16A e B), enquanto que poucos neurônios marcados foram detectados na subdivisão magnocelular (Fig. 16A). A marcação foi predominantemente localizada nas membranas celulares e em processos axonais e dendríticos. Os padrões de marcações revelados pelo anticorpo anti-P2X₂ foram bastante consistentes, o que respalda a especificidade do anticorpo utilizado. Fatias de hipotálamo processadas na ausência do anticorpo primário não revelaram qualquer marcação discernível. Por fim, não houve diferenças significativas no número de neurônios no PVN entre os ratos tratados com salina isotônica (Figura 16B, 99±7 neurônios/fatia de PVN), com salina hipertônica (Figura 16B, 90±6 neurônios/fatia de PVN) e com manitol (Figura 16B, 87±3 neurônios/fatia de PVN).

No grupo salina isotônica (NaCl 154 mM, 500 µL, i.v.), poucos neurônios apresentaram marcação positiva para a proteína Fos no PVN (Fig. 16 painel intermediário e Fig. 17A, 47±2 neurônios/fatia de PVN). A administração de salina hipertônica (NaCl, 3 M, 500 µL, i.v.) aumentou significativamente o número de neurônios positivos para Fos em ambas regiões magnocelular e parvocelular (Fig. 16 painel intermediário e Fig. 17A, 393±29 neurônios/fatia de PVN). Além disso, a infusão de solução de manitol (10%, 500 µL, i.v.) também aumentou a quantidade de neurônios que expressaram Fos (Fig. 16 painel intermediário e Fig. 17A, 141±11 neurônios/fatia de PVN) quando comparados aos ratos tratados com salina isotônica. No entanto, o grupo manitol mostrou uma marcação mais discreta quando comparado ao grupo tratado com solução salina hipertônica (Fig. 16 painel intermediário). No intuito de avaliar se os neurônios do PVN que expressaram receptores P2X₂ seriam os mesmos ativados após os desafios hiperosmóticos, realizamos um ensaio de imunohistoquímica

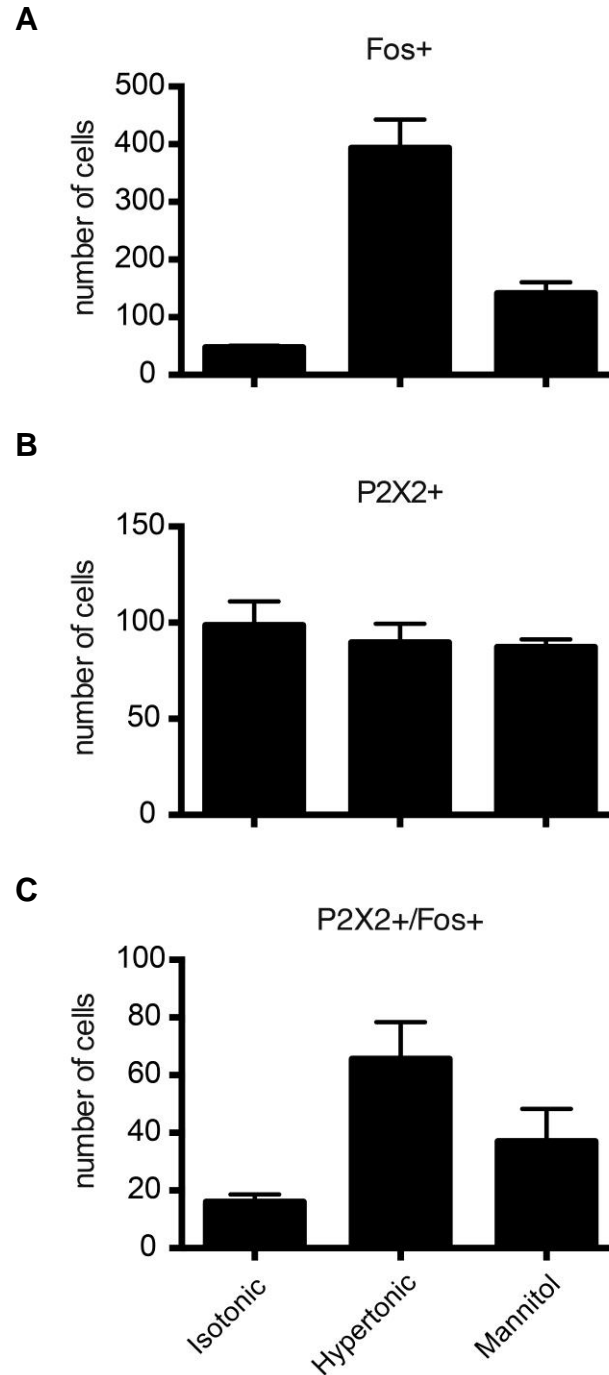
para avaliar a dupla marcação com Fos (P2X₂ + Fos). Como pode ser observado na figura 17C, um pequeno número de neurônios do PVN que expressam receptores P2X₂ foram ativados em ratos tratados com salina isotônica (Fig. 17C, 16±2 neurônios/fatia de PVN). Entretanto, os ratos tratados com solução hipertônica de NaCl 3 M ou manitol 10% apresentaram uma maior quantidade de neurônios do PVN duplamente marcados para P2X₂ e Fos (Fig. 17C, NaCl 3 M: 65±7 neurônios/fatia de PVN e manitol: 37±7 neurônios/fatia de PVN).

Figura 16 – Aumento agudo de osmolaridade plasmática ativa neurônios do PVN que expressam receptores P2X₂



Painel superior: Fotomicrografias representativas de marcação de imunofluorescência para receptores P2X₂ no PVN. **A**, Fotomicrografia mostrando marcações positivas para receptores P2X₂ em neurônios do PVN (setas). **B**, Detalhamento em maior magnitude do PVN mostrando neurônios marcados positivamente P2X₂. **C**, Hipotálamo ventromedial também apresenta neurônios que expressam receptores P2X₂. **Painel intermediário:** Fotomicrografias representativas de marcação de imunofluorescência para Fos em ratos tratados com **(A)** NaCl 154 mM, **(B)** NaCl 3 M e **(C)** Manitol 10%. Note o significativo aumento de marcação positiva para a proteína Fos nos ratos tratados com Manitol 10% e, mais ainda com NaCl 3 M. **Painel inferior:** Fotomicrografia representativa de corte coronal do PVN com neurônios marcados positivamente para receptores P2X₂ (canto superior esquerdo) e Fos (canto inferior esquerdo). A fotomicrografia à direita representa a sobreposição das imagens localizadas à esquerda onde podem ser observados neurônios duplamente marcados para receptores P2X₂ e Fos (setas azuis) e neurônios que expressam receptores P2X₂ que não foram positivamente marcados para Fos (setas brancas). 3V, Terceiro ventrículo.

Figura 17 – Quantificação dos neurônios imunopositivos para a proteína Fos, para receptores P2X₂ e duplamente marcados com Fos e P2X₂



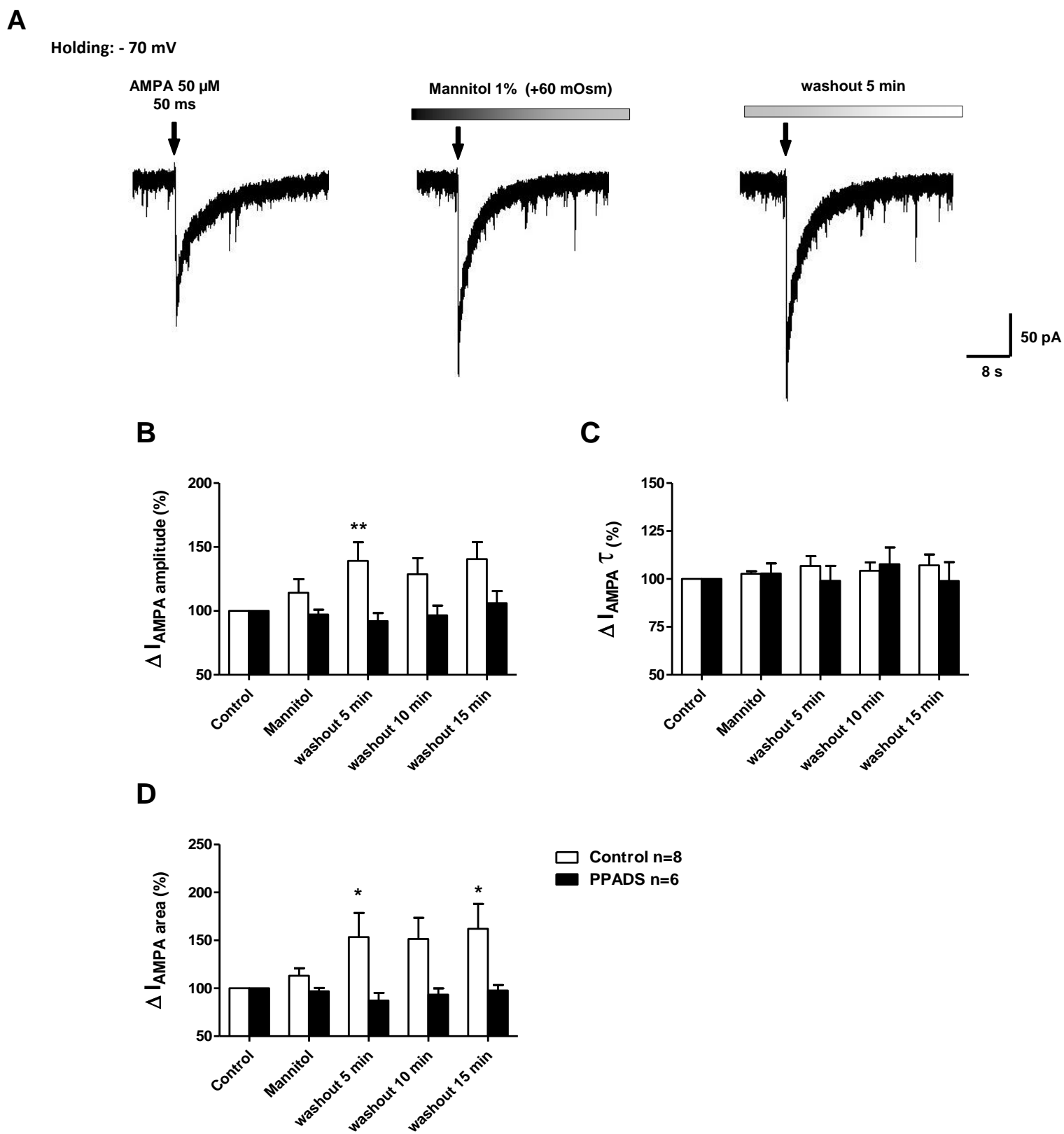
A, Número total de neurônios marcados positivamente para Fos no PVN de ratos tratados com salina isotônica, hipertônica e solução contendo manitol. **B**, Número total de neurônios marcados positivamente para receptores P2X₂ no PVN de ratos tratados com salina isotônica, hipertônica e solução contendo manitol. **C**, Número total de neurônios duplamente marcados positivamente para Fos e P2X₂ PVN de ratos tratados com salina isotônica, hipertônica e solução contendo manitol. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ comparado ao grupo salina isotônica. ### $p < 0,001$ comparado ao grupo salina hipertônica. ANOVA de uma via para medidas repetidas com o pós-teste de Bonferroni.

5.12 Estímulo hiperosmótico revela um acoplamento purino-glutamatérgico em neurônios pré-simpáticos do PVN

Estudos prévios tem demonstrado que a estimulação osmótica aguda com infusão intravenosa de salina hipertônica ou solução de manitol induz uma resposta simpatoexcitatória dependente do PVN (Antunes et al., 2006; Badoer et al., 2003; Chen, Toney, 2001; Son et al., 2013; Stocker, Toney, 2005). Desta forma, baseado nestes estudos anteriores, buscamos avaliar se um desafio osmótico agudo com solução de aCSF contendo manitol (1%, 1 min, +60 mOsmol/L) evidenciaria um sinergismo entre receptores P2 e AMPA em neurônios pré-simpáticos do PVN. Como mostrado na Figura 18, a magnitude da I_{AMPA} foi progressivamente aumentando após a estimulação hiperosmótica. Assim, a amplitude (Fig. 18B, lavagem 5 min: $39 \pm 14\%$, $p < 0,01$) e a área (Fig. 18D, lavagem 5 min: $53 \pm 25\%$ e lavagem 15 min: $62 \pm 26\%$, $p < 0,05$) de I_{AMPA} tiveram um incremento após o estímulo osmótico, enquanto que o tempo de decaimento não foi significativamente alterado. Novamente, não houve correlação positiva entre a porcentagem de mudança da amplitude e área de I_{AMPA} (5 min após o estímulo com manitol) e os valores basais absolutos da amplitude e área de I_{AMPA} (amplitude $R^2 = 0,22$, área $R^2 = 0,11$).

Para verificar se a potenciação de I_{AMPA} seria dependente da ativação de receptores P2, bloqueamos estes receptores 10 min antes do estímulo osmótico nas com o antagonista PPADS (10 μ M). Na presença de PPADS, o aumento de I_{AMPA} mediado por estímulo hiperosmótico foi completamente abolido (amplitude: Fig. 18B, lavagem 5 min: $-8 \pm 6\%$; área: Fig. 18C, lavagem 5 min: $-7 \pm 6\%$ e lavagem 15 min: $-2 \pm 5\%$). Em conjunto, estes dados sugerem que um estímulo hiperosmótico agudo poderia recrutar uma sinalização purinérgica dependente de receptores P2 que aumentaria a I_{AMPA} e, conseqüentemente, contribuiria para aumentar a excitabilidade de neurônios pré-simpáticos do PVN durante mudanças de osmolaridade.

Figura 18 – Estimulação hiperosmótica aumenta a I_{AMPA} em neurônios PVN-RVLM via ativação de receptores P2

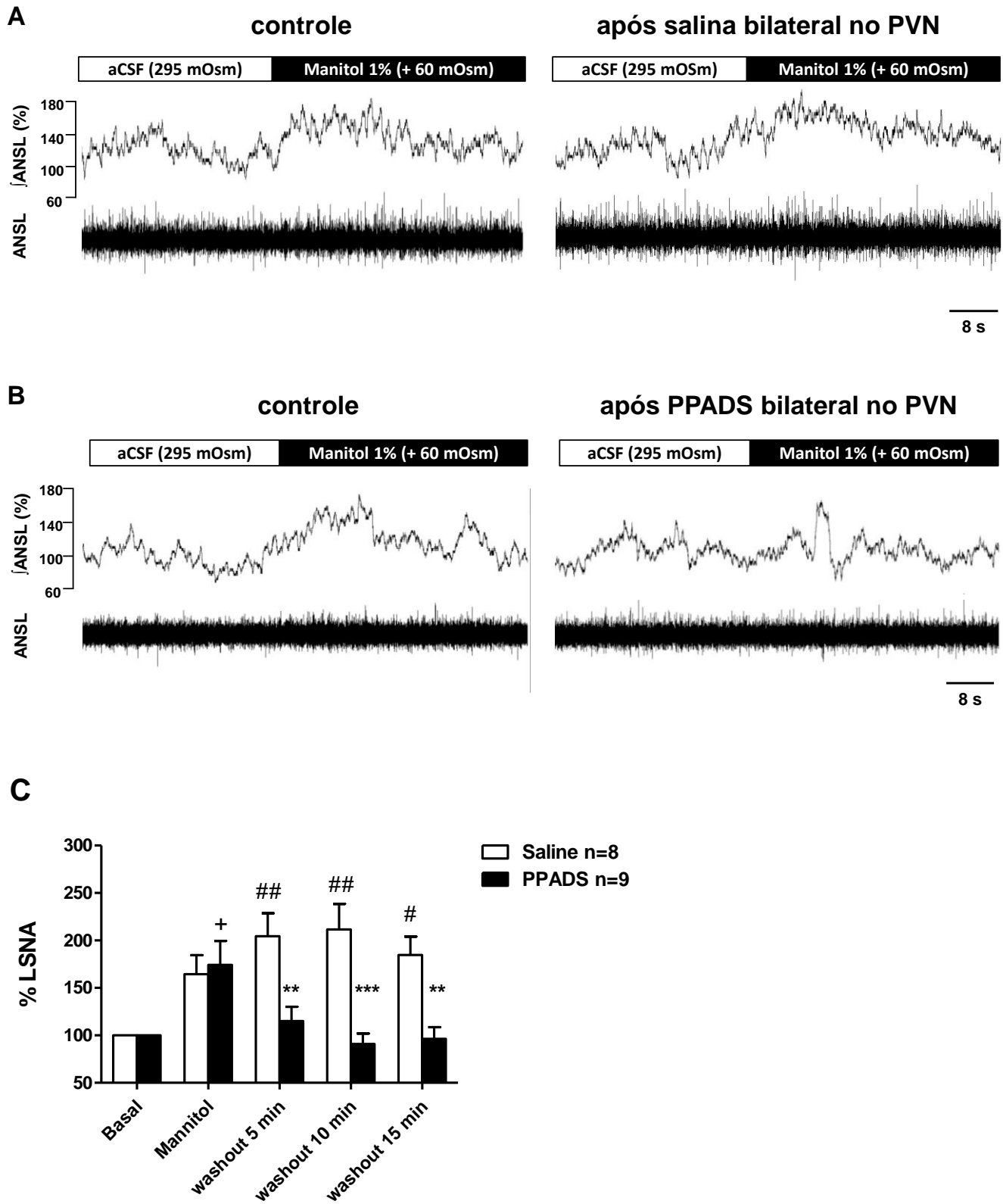


A, Traçados representativos em registros de *voltage-clamp whole-cell* (potencial de *holding*: -70 mV) de correntes induzida por uma aplicação focal de AMPA (50 μ M, 50 ms, 5-10 psi) antes, durante e após o estímulo hiperosmótico (Manitol 1%, +60 mOsmol). Alteração percentual (**B**) na amplitude, (**C**) o tempo de decaimento (τ) e (**D**) na área da I_{AMPA} antes, durante e após estímulo hiperosmótico em condições controle (barras brancas, n=8) e na presença de PPADS (barras pretas, n=6). * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ vs controle, ANOVA de duas vias para medidas repetidas com o pós-teste de Bonferroni.

5.13 A simpatoexcitação induzida por estímulo hiperosmótico é abolida após o antagonismo dos receptores P2 no PVN

Diante dos resultados previamente citados, decidimos avaliar se os receptores P2 do PVN participariam da simpatoexcitação dependente de hiperosmolaridade. Para tal, experimentos foram realizados no modelo animal DAP. Neste protocolo, a atividade do nervo simpático lombar (ANSL) foi monitorada e microinjeções bilaterais de PPADS (0,5 nmol/100 nL) ou salina (veículo, 100 nL) foi realizadas diretamente no PVN, antes e após o estímulo hiperosmótico (manitol 1%, 40 s). É importante salientar que as microinjeções foram feitas na mesma região do PVN responsiva ao ATP. A Figura 19 demonstra os traçados representativos da ANSL original e integrada em condição de isosmolaridade (aCSF 290 mOsmol/L) e durante o desafio hiperosmótico (aCSF + manitol 1%, +60 mOsmol/L) antes e após a microinjeção bilateral de salina no PVN. O desafio hiperosmótico induziu um aumento na ANSL ($64\pm 20\%$; $n=8$), o qual não foi alterado após a microinjeção bilateral de salina no PVN em todos os períodos avaliados (5 min: $104\pm 24\%$; 10 min: $111\pm 27\%$, 15 min: $84\pm 19\%$; $p<0,05$ comparado ao controle; Fig. 19C). No entanto, o antagonismo bilateral dos receptores P2 no PVN aboliu a simpatoexcitação mediada por estímulo hiperosmótico (Fig. 19B e C). O aumento na ANSL induzido pelo desafio osmótico ($74\pm 25\%$; $p<0,05$ comparado ao controle; $n=9$; Fig. 18C) foi bloqueado após a microinjeção bilateral de PPADS diretamente no PVN (5 min: $15\pm 15\%$; 10 min: $-9\pm 11\%$, 15 min: $-4\pm 12\%$; $p<0,05$ comparado ao grupo salina; Fig. 19C). Vale destacar que o estímulo osmótico agudo não promoveu qualquer alteração significativa na atividade do nervo frênico e que o antagonismo bilateral dos receptores P2 no PVN não afetou os níveis basais da ANSL e ANF. Conjuntamente, estes resultados demonstram que os receptores P2 do PVN tem uma participação importante na resposta simpatoexcitatória dependente de aumento agudo de osmolaridade.

Figura 19 – A ativação de receptores P2 no PVN contribui para a simpatoexcitação induzida por hiperosmolaridade



Traçados representativos demonstrando a atividade do nervo simpático lombar (ANSL) original e integrada (I) durante a estimulação hiperosmótica aguda antes e depois da microinjeção bilateral de salina (**A**) ou PPADS (**B**, 0,5 nmol/100 nL) no PVN. **C**, Alteração percentual da ANSL durante o estímulo hiperosmótico antes e depois da microinjeção bilateral de salina (barras brancas, n=8) ou PPADS (barras pretas, n=9) no PVN. Os resultados estão expressos com média \pm EPM. #p<0,05 e ##p<0,01 comparando o grupo salina vs Basal (100%), ANOVA de uma via para medidas repetidas com o pós teste de Bonferroni. *p<0,05 comparando o grupo PPADS vs Basal, ANOVA de uma via para medidas repetidas com o pós teste de Bonferroni. **p<0,01 e ***p<0,001 comparando o grupo salina vs grupo PPADS no mesmo período avaliado, ANOVA de duas vias para medidas repetidas com o pós-teste de Bonferroni

6 DISCUSSÃO

O presente estudo fornece as primeiras evidências funcionais de que a ativação de receptores P2 em neurônios pré-simpáticos do PVN é capaz de aumentar a excitabilidade destes neurônios e induzir simpatoexcitação. Além disso, evidenciamos a existência de uma interação purino-glutamatérgica em neurônios do PVN na modulação da atividade simpática dependente da participação de receptores glutamatérgicos do subtipo AMPA nesta resposta. Por fim, demonstramos que o aumento na atividade simpática induzido por estímulo hiperosmótico é dependente da ativação de receptores P2 no PVN, dentre eles o subtipo P2X₂. Em conjunto, estes resultados respaldam uma relevante interação entre receptores P2 e AMPA em neurônios PVN-RVLM, a qual contribui para os efeitos excitatórios mediados pelo ATP em neurônios pré-simpáticos PVN envolvidos no controle da atividade simpática. Ademais, estes dados indicam que o acoplamento entre receptores P2 e AMPA no PVN está envolvido nas respostas induzidas por alterações de osmolaridade, sendo mais um mecanismo contribuinte para aumentar a ativação neuronal no PVN e a simpatoexcitação desencadeada durante desafios osmóticos (Antunes et al., 2006; Stocker et al., 2005).

6.1 A ativação de receptores P2 aumenta a excitabilidade de neurônios pré-simpáticos do PVN e a atividade simpática eferente

Nas últimas cinco décadas o ATP emergiu como um importante neurotransmissor em muitos núcleos encefálicos envolvidos em diferentes situações fisiopatológicas (Burnstock, 2007). Estudos de neuroanatômicos têm levantado importantes evidências sobre a expressão de receptores purinérgicos no PVN, com destaque para as isoformas do subtipo P2X que são expressos em neurônios pré-simpáticos do PVN (Cham et al., 2006; Guo et al., 2009; Shibuya et al., 1999; Yao et al., 2003). Além disso, muitas evidências tem demonstrado que a sinalização purinérgica no PVN pode influenciar respostas autonômicas e neuroendócrinas (Cruz et al., 2010; Kapoor, Sladek, 2000; Knott et al., 2008; Li et al., 2010; Mori et al., 1992; Song, Sladek, 2006).

Em nosso estudo demonstramos que a administração exógena de ATP aumenta a frequência de potenciais de ação de neurônios pré-simpáticos do PVN. Tal mudança no padrão de excitabilidade de neurônios PVN-RVLM reflete-se em alterações do sistema nervoso autônomo, uma vez que a microinjeção de agonistas purinérgicos (ATP e α,β meATP) no PVN promoveu aumento da atividade simpática de maneira concentração-dependente, tanto para a magnitude da resposta como para a duração da mesma. Além disso, estas respostas são restritas à ativação de neurônios do PVN, uma vez que a microinjeção do ATP ou do α,β meATP em regiões adjacentes ou fora dos limites do PVN não produziu alterações significativas na ANSL. Estudos farmacológicos mostraram que o α,β meATP tem diferente afinidade para vários subtipos de receptores ionotrópicos P2X. Já é conhecido que P2X₁, homomérico P2X₃ e heteroméricos P2X_{2/3} e P2X_{1/5} apresentam alta afinidade para α,β -meATP (Burnstock, 2007; North, 2002). Por outro lado, os receptores homoméricos P2X₂, P2X₄, P2X₅, P2X₆, P2X₇ e o heteromérico P2X_{4/6} tem um afinidade reduzida para o α,β meATP. Desta forma, os receptores P2X₁, P2X₃, P2X_{2/3} e P2X_{1/5} são os prováveis candidatos envolvidos na simpatoexcitação mediada pela microinjeção de ATP no PVN.

Estes resultados de aumento da excitabilidade neuronal decorrente da ação do ATP corroboram outros dados já descritos na literatura sobre a participação desta purina em diferentes núcleos encefálicos na modulação da atividade do sistema nervoso autônomo. Nesse sentido, de Paula et al. (2004) avaliou em ratos acordados que a microinjeção de ATP em diferentes concentrações no núcleo do trato solitário (NTS) comissural promoveu aumento da pressão arterial de maneira concentração-dependente. Estudos de Yao et al. (2005) também demonstraram que a aplicação de ATP ou α,β meATP no *locus coeruleus* de ratos anestesiados foi capaz de reduzir a pressão arterial e a frequência cardíaca de maneira concentração-dependente.

Com relação a estudos no modelo animal DAP, Antunes et al. (2005b) demonstraram que a administração de ATP no NTS intermediário induziu simpatoinibição do nervo torácico, porém a aplicação de ATP no NTS caudal não promoveu alterações significativas na atividade simpática. Apesar da extensa literatura destacando os efeitos da ativação purinérgica em diferentes núcleos que controlam a atividade autônoma simpática, conseqüentemente a pressão arterial e frequência

cardíaca, e até mesmo a atividade respiratória, não existiam trabalhos na literatura até o presente relatando as alterações sobre a atividade simpática decorrente da ativação de receptores purinérgicos do PVN com ATP ou agonistas estáveis.

O único trabalho com abordagem de microinjeção de ATP diretamente no PVN foi realizado por Kubo et al. (1997), os quais demonstraram que esta purina injetada no PVN de ratos anestesiados não foi capaz de promover qualquer alteração significativa na pressão arterial. Porém, neste estudo utilizaram-se animais anestesiados com transecção da medula espinal e, desta forma, a avaliação da atividade simpática mediante a ativação dos receptores purinérgicos do PVN pode não ter sido corretamente abordada.

Vale destacar que o efeito do decaimento da atividade simpática induzido pela injeção de ATP no PVN observado nos nossos experimentos, pode também ser resultado de efeito secundário mediado pela adenosina, que é um produto direto da metabolização do ATP pelas ectonucleotidasas (Zimmermann, 1992). Diversos experimentos em animais anestesiados ou em preparações *in vitro* indicam que os efeitos promovidos pelo ATP em tecidos neurais são mediados pela adenosina (Dale et al., 2002; Kato et al., 2001; Miles et al., 2002; St Lambert et al., 1997). Um recente trabalho demonstrou que a adenosina induz a redução da frequência de disparo de neurônios do PVN (Li et al., 2010) e isto também vai ao encontro de nossos resultados onde observamos que a simpatoexcitação induzida pelo α,β meATP é mais duradoura e mais robusta em amplitude, pois este agonista estável do ATP não é metabolizado em adenosina.

Os nossos resultados sugerem que o ATP aparentemente não seja liberado tonicamente no PVN, uma vez que a aplicação de PPADS, antagonista de receptores purinérgicos P2, não promoveu qualquer mudança na atividade simpática basal. O estudo da participação do antagonismo de receptores P2 do PVN em parâmetros cardiovasculares também foi realizado por Kubo et al. (1997), os quais observaram que a microinjeção de suramin, um antagonista não seletivo de receptores P2, não alterou os valores basais de pressão arterial, fato que pode ter sido consequência da abordagem técnica adotada pelos autores (anestesia + transecção da medula espinal).

Outro trabalho que investigou o papel das purinas no PVN de ratos acordados foi de Cruz et al. (2010), onde os autores demonstraram que a aplicação bilateral de PPADS (antagonista não seletivo de receptores P2) no PVN de ratos acordados produziu um pequeno aumento, porém significativo, na pressão arterial e na frequência cardíaca destes animais. As diferenças entre os resultados obtidos no presente estudo comparados aos de Cruz et al. (2010) podem estar relacionadas com fato de que as abordagens experimentais foram distintas, como por exemplo, o fato das microinjeções do antagonista no presente estudo terem sido feitas unilateralmente no PVN e não bilaterais como nos estudos de Cruz et al. (2010). Diante do exposto, é notório que os receptores purinérgicos do PVN participam da modulação da atividade simpática, porém os efeitos fisiológicos promovidos pela ativação destes receptores bem como os subtipos envolvidos necessitam de mais investigação.

Na tentativa de caracterizar a resposta simpatoexcitatória do ATP e verificar se seus efeitos seriam bloqueados ou atenuados com a prévia aplicação de um antagonista purinérgico, observamos no presente estudo que a injeção de PPADS (0,5 nmol) no PVN foi capaz de atenuar a resposta de aumento na ANSL induzida pelo ATP (2,5 nmol) quando injetado no mesmo sítio, tanto na amplitude como na duração da resposta. Estes resultados indicam que a simpatoexcitação induzida pelo ATP depende, pelo menos em parte, da ativação de receptores P2 do PVN.

As ações do ATP como neurotransmissor são mediadas por receptores P2X e P2Y (Burnstock, 2007). Os receptores P2Y são acoplados a proteína G, enquanto que os receptores P2X são canais iônicos dependentes de ligante, permeáveis ao Na⁺, K⁺ e Ca²⁺. Muitos estudos já destacaram a expressão de receptores P2X no PVN, como já citado anteriormente, no entanto, a expressão de receptores P2Y neste núcleo hipotalâmico tem sido discretamente investigada, com apenas um trabalho destacando a presença da isoforma P2Y₄ localizado preferencialmente na subdivisão magnocelular do PVN. Desta forma, nossos resultados sugerem que os receptores P2X são os prováveis mediadores dos efeitos do ATP em neurônios PVN-RVLM e na atividade simpática, porém, mais estudos precisam ser realizados para identificar as diferentes isoformas de receptores P2X envolvidas e/ou se receptores P2Y também contribuem para os efeitos induzidos pelo ATP no PVN na modulação da atividade simpática.

6.2 Interação entre ATP e glutamato no PVN contribui para a simpatoexcitação

O glutamato é o neurotransmissor excitatório mais abundante e importante do sistema nervoso central, incluindo o hipotálamo (van den Pol, Trombley, 1993) e estudos respaldam a contribuição do glutamato em regular a atividade de neurônios pré-simpáticos do PVN (Li et al., 2006) bem como a atividade simpática (Li et al., 2001; Chen et al., 2003). Além disso, a co-transmissão entre os sistemas purinérgico e glutamatérgico já foi descrita em alguns núcleos encefálicos, evidenciando que estes sistemas podem interagir e mediar respostas fisiológicas (Braga et al., 2007; Pankratov et al., 1998, 2002a, 2006; Passamani et al., 2011; Scislo, O'Leary, 2000). No presente trabalho foi demonstrado que a simpatoexcitação induzida pelo L-glu injetado no PVN não foi atenuada em magnitude ou na duração da resposta após o antagonismo de receptores P2 com PPADS. Isto sugere que os efeitos na atividade simpática mediados pelo L-glu neste núcleo não dependem da ativação de receptores P2.

No entanto, nosso maior interesse foi avaliar se os efeitos mediados pela ativação purinérgica no PVN na ANSL teria a participação da coliberação de L-glu e da ativação de receptores glutamatérgicos. Para avaliar se as alterações na excitabilidade dos neurônios pré-simpáticos do PVN e o aumento na atividade simpática induzido pelo ATP seriam dependentes de mudanças na transmissão sináptica glutamatérgica, procuramos isolar e avaliar as correntes pós-sinápticas glutamatérgicas espontâneas (sEPSCs). Vale destacar que a frequência das correntes espontâneas e em miniatura foi similar em neurônios PVN-RVLM (Han et al., 2010), sugerindo que a maior parte da atividade sináptica basal é independente de potencial de ação. Além disso, evidenciamos que a ativação de receptores P2 pelo ATP em neurônios PVN-RVLM não induziu alterações significativas na frequência, na magnitude, na cinética e no decurso temporal das sEPSCs, sugerindo que o ATP não afeta o nível de liberação de glutamato (nenhuma alteração significativa na frequência de sEPSCs) ou a magnitude e/ou cinética de receptores pós-sinápticos (nenhuma alteração significativa na amplitude e cinética de sEPSCs) em neurônios pré-simpáticos do PVN. Estes resultados vão de encontro a relatos prévios que mostram que o ATP aumenta a frequência e amplitude da EPSCs glutamatérgicas em neurônios magnocelulares

neurosecretórios do PVN e SON (Gordon et al., 2005; Vavra et al., 2011), sugerindo que as ações do ATP no hipotálamo possam ser dependentes do tipo de neurônio avaliado, visto que no nosso estudo abordamos os neurônios pré-simpáticos parvocelulares do PVN. Nesse sentido, observamos que o antagonismo inespecífico de receptores ionotrópicos glutamatérgicos do PVN atenuou a simpatoexcitação induzida pelo ATP em amplitude e duração. Além do mais, o duplo antagonismo exercido pelo PPADS e KYN foi mais potente em atenuar as respostas de simpatoexcitação promovidas pelo ATP. Estes resultados sugerem de maneira relevante que existe uma forte interação entre os sistemas purinérgico e glutamatérgico de neurônios do PVN em modular a atividade simpática.

Esta nossa conclusão acima está de acordo com estudos prévios descritos literatura científica, os quais evidenciaram de fato uma interação entre ATP e L-glu em circuitos neurais de núcleos, tais como o *locus coeruleus*, hipocampo e também no PVN. Pankratov et al. (1998, 2002a) demonstraram que a aplicação de antagonistas de receptores ionotrópicos glutamatérgicos reduziu as correntes pós-sinápticas excitatórias em neurônios corticais e do hipocampo, porém, a aplicação de antagonistas de receptores purinérgicos promoveu um efeito aditivo na redução destas correntes quando comparado com o bloqueio glutamatérgico isolado, sugerindo uma participação tônica além de uma possível co-transmissão nestas regiões. No que se refere à co-transmissão purino-glutamatérgica no *locus coeruleus*, Yao et al. (2005) demonstraram que a microinjeção de L-glu promoveu hipotensão e discretas alterações na frequência cardíaca, porém a ativação de receptores de glutamato, após o antagonismo de receptores purinérgicos, estas respostas foram revertidas, ou seja, observou-se uma resposta pressora bifásica e bradicardia. No que se refere aos estudos ao nível do PVN, Cruz et al. (2010) observaram, como citado anteriormente, que a aplicação de PPADS diretamente no PVN induziu aumento na pressão arterial e taquicardia, de maneira discreta, porém significativa. No entanto, estes pesquisadores observaram que o duplo antagonismo bilateral com PPADS e KYN não promoveu alterações adicionais nestes mesmos parâmetros cardiovasculares. Estes relatos reforçam de forma bastante consistente a existência de uma interação importante entre os sistemas purinérgico e glutamatérgico na modulação da atividade neuronal em diferentes núcleos encefálicos.

6.3 A simpatoexcitação induzida pelo ATP depende da ativação de receptores AMPA em neurônios PVN-RVLM via alterações de Ca^{2+} intracelular

O glutamato exerce suas ações como neurotransmissor por meio de interações com receptores ionotrópicos e metabotrópicos (Mayer, Armstrong, 2004). Há três tipos principais de receptores ionotrópicos glutamatérgicos os quais foram classificados após a identificação por agonistas específicos: NMDA, AMPA e kainato, sendo estes dois últimos muitas vezes classificados como não-NMDA. Os receptores NMDA apresentam cinética lenta, são altamente permeáveis ao Na^+ e Ca^{2+} e estão bloqueados pelo íon Mg^{2+} de maneira voltagem-dependente. Por outro lado, os receptores AMPA são de rápida cinética, porém menos permeáveis ao Na^+ e Ca^{2+} . Já os receptores do tipo kainato são permeáveis ao Na^+ e K^+ . Estudos de imunomarcção e farmacológicos já demonstraram que o hipotálamo contém níveis elevados de glutamato e de receptores ionotrópicos glutamatérgicos (Busnardo et al., 2009; Li et al., 2006; Meeker et al., 1994; Singewald, Philippu, 1996). Nesse sentido, a simpatoexcitação induzida pelo ATP diretamente no PVN poderia ter uma participação diferencial destes receptores ionotrópicos glutamatérgicos.

Relatos anteriores demonstram que os efeitos do ATP em sinapses excitatórias, onde o glutamato é um dos neurotransmissores, ocorre pela modulação de receptores AMPA (D'Amico et al., 2010; Gordon et al., 2005; Khakh et al., 2003; Khakh, 2009). Nesse sentido, buscamos avaliar se o ATP poderia potencializar as correntes mediadas por receptores AMPA (I_{AMPA}) por meio da aplicação focal de AMPA. Nossos resultados demonstraram que em neurônios pré-simpáticos do PVN a magnitude da I_{AMPA} aumentou na presença e após a lavagem da solução contendo ATP, revelando que o efeito da ativação de receptores P2 pode ser duradouro nesse tipo celular. Este efeito desencadeado pelo ATP foi bloqueado com o prévio antagonismo dos receptores P2 com PPADS e pela quelação de Ca^{2+} intracelular. Estes resultados respaldam o conceito de que a ativação de receptores P2 em neurônios PVN-RVLM resulta em aumento da concentração intracelular de Ca^{2+} promovendo a potenciação da I_{AMPA} . Um dos mecanismos pelo qual o ATP poderia aumentar a concentração intracelular de Ca^{2+} seria via ativação dos receptores ionotrópicos P2X (Bhattacharya et al., 2013; Homma

et al., 2008; Ohta et al., 2005; Song et al., 2007) ou alternativamente via receptores metabotrópicos P2Y promovendo a liberação de Ca^{2+} de estoques intracelulares (Calvert et al., 2004; Fischer et al., 2009; Rubini et al., 2006; Saitow et al., 2005).

O fato do ATP afetar as correntes mediadas por receptores AMPA quando da aplicação exógena do agonista desses receptores (uma abordagem que ativa receptores sinápticos e não sinápticos), mas não afetar as sEPSCs (principalmente mediada pela ativação de receptores AMPA sinápticos) pode indicar que o ATP influencia seletivamente receptores AMPA não sinápticos. A expressão de receptores AMPA localizados extrasinapticamente é comumente observada em diversas regiões do encéfalo, e ultimamente eles têm sido considerados com características funcionais importantes. Os receptores AMPA extrasinápticos contribuem, por exemplo, para a sinalização glutamatérgica durante o extravasamento de glutamato da fenda sináptica (Allan, Rothwell, 2001) e desempenham um importante papel na potenciação de longo prazo dependente de atividade (Granger et al., 2013, Makino, Malinow, 2009) e durante a neurogênese pós-natal (Schmidt-Salzman et al., 2014). Os receptores AMPA extrasinápticos podem ser modulados de uma maneira segregada e compartimentalizada quando comparados aos receptores localizados nas sinapses. Eles apresentam uma alta capacidade de movimentação, podendo ser transportados rapidamente entre a membrana plasmática e compartimentos intracelulares via endocitose e exocitose, e entre locais sinápticos e extrasinápticos via difusão lateral (Adesnik et al., 2005; Borgdorff, Choquet, 2002; Choquet, Triller, 2003; Cognet et al., 2006). Recentes estudos tem mostrado que os receptores AMPA extrasinápticos podem ser supra regulados de uma maneira dependente de atividade durante diferentes condições fisiológicas e também patológicas, incluindo estimulação visual, plasticidade sináptica e dor (Eckert et al., 2013; Kopach et al., 2011, 2012; Soares et al., 2013). Por fim, sabe-se que os tráfego de receptores AMPA e sua inserção na membrana podem ser regulados por alterações na atividade de cinases e fosfatases dependente de mudanças na concentração de Ca^{2+} intracelular (Esteban et al. 2003, Gordon et al., 2005; Lin et al., 2009; Mao et al., 2013). Desta forma, pode-se especular que um mecanismo similar esteja envolvido na potenciação das correntes mediadas por

receptores AMPA induzida por ativação de receptores P2 em neurônios pré-simpáticos do PVN.

Corroborando os experimentos de *patch-clamp*, nossos resultados no modelo animal DAP demonstraram que o antagonismo dos receptores NMDA com AP5 no PVN não alterou o aumento e a duração na resposta de simpatoexcitação induzida pelo ATP no mesmo sítio. Porém, o CNQX, antagonista dos receptores não-NMDA, atenuou de maneira significativa a magnitude da simpatoexcitação induzida pelo ATP, mas não alterou o tempo de resposta, sugerindo que os receptores AMPA/kainato poderiam mediar parte dos efeitos induzidos pela sinalização purinérgica no PVN. Estes resultados podem estar relacionados com o fato de que os receptores NMDA estão constantemente bloqueados pelo íon Mg^{2+} e talvez as alterações induzidas pelo ATP no PVN para a liberação de L-glu não sejam suficientes para suprimir este bloqueio voltagem-dependente.

6.4 Receptores P2 participam da resposta simpatoexcitatória induzida por estímulo osmótico agudo

Os resultados descritos e discutidos até o presente momento evidenciam um acoplamento entre receptores P2 e AMPA na regulação da excitabilidade de neurônios PVN-RVLM bem como na modulação da atividade simpática. No entanto, todos os experimentos foram baseados na administração exógena de ATP, uma abordagem muito mais farmacológica do que fisiológica. Sendo assim, objetivamos investigar se esta interação P2-AMPA estaria envolvida em ajustes fisiológicos decorrentes, por exemplo, de um desafio osmótico agudo. Na literatura científica existem várias evidências de que um estímulo hiperosmótico resulta em ativação de neurônios magnocelulares e parvocelulares do PVN pela expressão aumentada da proteína c-Fos (Chu et al., 2005; Sharp et al., 1991). Além disso, um desafio hiperosmótico resulta em aumento da excitabilidade neuronal do PVN, levando a uma resposta simpatoexcitatória e, conseqüentemente, aumento da pressão arterial (Antunes et al., 2006; Chen, Toney, 2001; Chu et al., 2010; Son et al. 2013). No entanto, ainda não havia sido explorado se a potenciação das correntes mediadas por AMPA mediada pelo ATP em neurônios

PVN-RVLM ocorreria em resposta a um estímulo osmótico, contribuindo para o aumento da excitabilidade neuronal e da atividade simpática durante esta condição.

Nossos resultados demonstraram que um estímulo osmótico agudo periférico (com infusão i.v. de NaCl 3 M ou solução de manitol 10%) foi capaz de ativar neurônios do PVN com intensa marcação de c-Fos e que expressaram receptores P2X₂. Esta população neuronal está localizada principalmente na subdivisão parvocelular lateral do PVN, o que sugere que a estimulação osmótica periférica induziria a ativação destes neurônios e, conseqüentemente, o aumento da atividade simpática. Cabe ressaltar que a ativação de neurônios do PVN foi muito mais robusta com a infusão de NaCl 3 M quando comparado com a solução de manitol 10%. Resultados preliminares do nosso laboratório tem evidenciado que ambos os estímulos hiperosmóticos promovem alterações similares na osmolaridade plasmática, o que nos leva a sugerindo que o estímulo osmótico solução de NaCl 3 M se tornaria mais robusto por promover a ativação de neurônios do PVN não só por causar alterações na osmolaridade plasmática mas também por promover um aumento da concentração plasmática de Na⁺.

Em concordância com os experimentos de imunohistoquímica, observamos que um estímulo hiperosmótico transiente de +60 mOsmol/L acima da osmolaridade basal (uma alteração de osmolaridade tipicamente utilizada em preparações de fatias hipotalâmicas para estudos de respostas neuronais mediadas osmoticamente - Richard, Bourque, 1995; Zhang et al., 2007) aumentou a magnitude da I_{AMPA} , um efeito que foi completamente bloqueado na presença de PPADS. Estes resultados sugerem que o ATP possa ser liberado no microambiente neuronal do PVN durante desafios osmóticos, contribuindo para a resposta simpatoexcitatória mediada por receptores AMPA. Além disso, especulamos que o ATP poderia ser liberado por astrócitos, uma vez que estas células são uma importante fonte desta purina no PVN e SON, e este processo poderia ser desencadeado por sinais fisiológicos, incluindo noradrenalina e liberação dendrítica de vasopressina (Gordon et al., 2005; Haam et al., 2014). Por fim, na tentativa de avaliar se a liberação endógena de ATP no PVN estaria envolvido na resposta simpatoexcitatória induzida por um estímulo hiperosmótico agudo, realizamos um desafio osmótico de 40s (manitol 1%, +60 mOsmol/L) no modelo animal

DAP registrando simultaneamente a atividade simpática lombar. Nossos dados demonstraram que um estímulo hiperosmótico agudo utilizando manitol como agente osmótico produziu um significativo aumento na atividade simpática lombar, o qual foi bloqueado pelo prévio antagonismo de receptores P2 no PVN. Em conjunto, estes resultados respaldam um importante papel fisiológico do ATP como neurotransmissor mediando a resposta simpatoexcitatória dependente do PVN.

7 CONCLUSÃO

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

REFERÊNCIAS*

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Dale N, Gourine AV, Llaudet E, Bulmer D, Thomas T, Spyer KM. Rapid adenosine release in the nucleus tractus solitarii during defence response in rats: real-time measurement in vivo. *J Physiol.* 2002;544: 149–160.

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

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

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

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

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

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

Fischer W, Nörenberg W, Franke H, Schaefer M, Illes P (2009). Increase of intracellular Ca²⁺ by P2Y but not P2X receptors in cultured cortical multipolar neurons of the rat. *J Comp Neurol.* 2009;516(5):343–59.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Homma K, Niino Y, Hotta K, Oka K. Ca²⁺ influx through P2X receptors induces actin cytoskeleton reorganization by the formation of cofilin rods in neurites. *Mol Cell Neurosci*. 2008;37(2):261–70.

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

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

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

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

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

Kato F, Shigetomi E. Distinct modulation of evoked and spontaneous EPSCs by purinoceptors in the nucleus tractus solitarii of the rat. *J Physiol*. 2001;530: 469–486.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Passamani LM, Pedrosa DF, Mauad H, Schenberg LC, Paton JF, Sampaio KN. Involvement of the purinergic system in central cardiovascular modulation at the level of the nucleus ambiguus of anaesthetized rats. *Exp Physiol*. 2011;96:262–274.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Share L, Claybaugh JR. Regulation of body fluids. *Annu Rev Physiol.* 1972;34, 235–260.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

APÊNDICE A – Artigo(s) publicado(s) relacionados à tese

FERREIRA-NETO HC, YAO ST, ANTUNES VR. Purinergic and glutamatergic interactions in the hypothalamic paraventricular nucleus modulate sympathetic outflow. **Purinergic Signal**. 2013 Sep;9(3):337-49. doi: 10.1007/s11302-013-9352-9.

APÊNDICE B – Artigos em elaboração e/ou revisão relacionados à tese

FERREIRA-NETO HC, ANTUNES VR, STERN JE. hyperosmotic stimulation elicits a purinergic-glutamatergic coupling in rat hypothalamic presympathetic neurons. Em revisão no The **Journal of Physiology**.

FERREIRA-NETO HC, RIBEIRO IMR, MOREIRA TS, YAO ST, ANTUNES VR. Increases in plasma osmolality activate P2X₂ receptor expressing neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus in Wistar rats. Em elaboração.

APÊNDICE C – Artigos publicados não relacionados à tese

TOTOLA LT, ALVES TB, TAKAKURA AC, FERREIRA-NETO HC, ANTUNES VR, MENANI JV, COLOMBARI E, MOREIRA TS. Commissural nucleus of the solitary tract regulates the antihypertensive effects elicited by moxonidine. **Neuroscience**. 2013 Oct 10;250:80-91. doi: 10.1016/j.neuroscience.2013.06.065.

APÊNDICE D – Artigos em elaboração e/ou em revisão e não relacionados à tese

RIBEIRO IMR, FERREIRA-NETO HC, ANTUNES VR. Subdiaphragmatic vagus nerve activity and hepatic venous glucose are differentially regulated by the central actions of insulin in Wistar and SHR. Em revisão no **Journal of Neuroendocrinology**.

FERREIRA-NETO HC, MORAES DJ, RIBEIRO N, MECAWI AS, DA SILVA, MP, ANTUNES-RODRIGUES J, MACHADO BH, ANTUNES VR. PVN neuronal hyperexcitability drives changes on sympathetic-respiratory coupling in chronic salt loaded rats. Em elaboração.

RIBEIRO N, PANIZZA HN, SANTOS KM, FERREIRA-NETO HC, ANTUNES VR. Salt-sensitive hypertension and sympathoexcitation depends on V1a receptors activation in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. Em elaboração.