

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “Júlio de Mesquita Filho”
PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

MICHELE THAÍS FÁVERO

RESPOSTAS CARDIORRESPIRATÓRIAS PROMOVIDAS PELA
ATIVÇÃO DE RECEPTORES GLUTAMATÉRGICOS E
PURINÉRGICOS NO NÚCLEO DO TRATO SOLITÁRIO

ARARAQUARA

2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “Júlio de Mesquita Filho”
PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

MICHELE THAÍS FÁVERO

RESPOSTAS CARDIORRESPIRATÓRIAS PROMOVIDAS PELA
ATIVÇÃO DE RECEPTORES GLUTAMATÉRGICOS E
PURINÉRGICOS NO NÚCLEO DO TRATO SOLITÁRIO

Dissertação apresentada ao Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de São Carlos/Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientador: Patrícia Maria De Paula

ARARAQUARA

2012

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

F273rc

Fávero, Michele Thaís.

Respostas cardiorrespiratórias promovidas pela ativação de receptores glutamatérgicos e purinérgicos no núcleo do trato solitário / Michele Thaís Fávero. -- São Carlos : UFSCar, 2012.
78 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2012.

1. Fisiologia. 2. Núcleo do trato solitário. 3. Glutamato. 4. Receptores purinérgicos. I. Título.

CDD: 612 (20^a)

Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências
Fisiológicas
Associação Ampla UFSCar/UNESP

Folha de Aprovação

Dissertação de Mestrado de Michele Thaís Fávero

Dia 02/03/2012

Profª. Drª. Patrícia Maria de Paula.....

Patrícia M. de Paula

Profª. Drª. Ana Carolina Thomaz Takakura.....

Ana Carolina Thomaz Takakura

Profª. Drª. Débora Simões de Almeida Colombari.....

Débora S. Colombari

DADOS CURRICULARES

MICHELE THAÍS FÁVERO

NASCIMENTO	17.09.1984 – Guariba/SP
FILIAÇÃO	Hugo Vanderley Fávero Cleunice Elizabete dos Reis
2004/2007	Curso de Graduação em Fisioterapia Universidade Paulista de Araraquara- Unip
2010/2012	Curso de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, nível de Mestrado, na Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP (Programa Interinstitucional de Pós-Graduação UFSCar/UNESP).

**A MINHA MÃE,
CLEUNICE
AO MEU MARIDO,
MIGUEL
E AOS MEUS AVÓS
JACIRA E JOSÉ**

**Obrigada por sempre estarem ao meu lado, me dando muito amor e
carinho.**

Agradecimentos

Agradeço especialmente a Prof^a. Dr^a. Patrícia Maria De Paula, pela orientação, apoio e dedicação a este trabalho.

Agradeço especialmente também ao meu co-orientador Prof. Dr. José Vanderlei Menani por todo apoio, pela confiança depositada em mim, e pela oportunidade de ingresso neste laboratório.

Ao meu marido Miguel, a você agradeço por todo o amor, carinho e momentos bons que passamos juntos.

A minha mãe, só tenho a dizer que és a mulher mais bela que já conheci em toda minha vida, é uma honra ser filha desta GUERREIRA chamada, Cleunice, minha mais doce e adorada, MÃE.

Agradeço aos meus irmãos Yury e Jacqueline, que estão sempre ao meu lado, obrigada pelo amor e carinho.

Agradeço a minha tia Grácia, que sempre cuidou de mim e esteve ao meu lado em momentos bons e ruins, obrigada por todo amor e carinho.

Agradeço ao meu padrasto Santana, obrigada pelo carinho.

Agradeço aos meus avós Jacira e José Reis, por terem me criado de maneira digna e humilde, e obrigada por todo amor e dedicação, sem vocês eu jamais estaria aqui.

Agradeço aos professores do Departamento de Fisiologia e Patologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara, UNESP e do Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, pelos ensinamentos transmitidos e pela confiança no meu trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Fisiologia e Patologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara, UNESP pelo auxílio na execução deste trabalho.

Aos membros da Banca Examinadora Prof^ª. Dr^ª. Ana Carolina Takakura e Prof^ª. Dr^ª. Débora S. A. Colombari, pelas excelentes sugestões que contribuíram muito para a versão final deste trabalho.

Aos órgãos de fomento FAPESP, CAPES e CNPq por tornarem possível a realização deste trabalho. Especialmente agradeço à CAPES pela concessão da bolsa.

A todos, expresso minha mais profunda gratidão.

RESUMO

Fávero, MT. Respostas cardiorrespiratórias promovidas pela ativação de receptores glutamatérgicos e purinérgicos no núcleo do trato solitário. [Dissertação de Mestrado] Araraquara: Faculdade de Odontologia da Araraquara, UNESP; 2012

O sistema nervoso central (SNC) possui um papel fundamental na manutenção da composição e do volume dos líquidos corporais, para a adequada perfusão tecidual. Uma importante área do SNC que recebe aferências cardiorrespiratórias é o núcleo do trato solitário (NTS) que possui vários tipos de neurotransmissores, dentre eles o L-glutamato e adenosina-5'-trifosfato (ATP). Mudanças neuroendócrinas que ocorrem durante a depleção de sódio poderiam alterar as neurotransmissões glutamatérgica e purinérgica no NTS. Assim, neste estudo, tivemos 3 objetivos: 1) investigar os efeitos da depleção de sódio nas respostas cardiorrespiratórias antes e após a injeção de L-glutamato e α,β -metileno adenosina 5' trifosfato (α,β -metil ATP, agonista seletivo de receptor purinérgico P2X) no NTS de ratos não anestesiados; 2) investigar as respostas cardiorrespiratórias à injeção de α,β -metil ATP no NTS antes e após o bloqueio dos receptores purinérgicos P2 com o suramin (antagonista não-seletivo de receptores P2) no NTS de ratos não anestesiados e normovolêmicos e 3) caracterizar os componentes autonômicos envolvidos nas respostas cardiovasculares após a injeção de α,β -metil ATP no NTS. Foram utilizados ratos Holtzman com cânulas implantadas no NTS e com cateter inserido na artéria e veia femoral. As medidas de ventilação (VE) foram obtidas pelo método de pletismografia de corpo inteiro. Com relação ao objetivo 1, os parâmetros cardiorrespiratórios foram medidos em ratos normovolêmicos (antes da depleção de sódio), depletados (24 h após a depleção de sódio) e ratos repletos (2 h após o livre acesso a NaCl 0,3 M e água). A depleção de sódio foi induzida pelo tratamento com o diurético furosemida (20 mg/Kg do peso corporal) injetado subcutaneamente (s.c.) acompanhado de uma dieta deficiente em sódio por 24 h. A depleção de sódio não modificou a PAM basal (104 ± 4 mmHg, vs. normovolêmicos: 105 ± 4 mmHg) nem a FC (334 ± 20 bpm, vs. normovolêmico: 379 ± 13 bpm) mas aumentou a VE (708 ± 107 ml/min/kg, vs. normovolêmico: 478 ± 60 ml/min/kg). Este efeito ocorreu devido a um aumento do volume corrente (VC, $7 \pm 0,6$ ml/kg, vs. normovolêmico: $5 \pm 0,4$ ml/kg) sem alterar a frequência respiratória (fR, 99 ± 8 cpm, vs.

normovolêmicos: 85 ± 6 cpm). Em ratos repletos, a VE não retornou ao nível normal (640 ± 33 ml/min/kg vs. normovolêmico: 478 ± 60 ml/min/kg). Injeções unilaterais de L-glutamato (1 e 5 nmol/100 nl) no NTS produziu resposta pressora (17 ± 3 e 36 ± 3 mmHg, respectivamente, vs. salina: 3 ± 1 mmHg), bradicardia (-130 ± 15 e -169 ± 10 bpm, respectivamente, vs. salina: -13 ± 6 bpm) e hiperventilação (233 ± 44 e 495 ± 114 ml/min/kg, respectivamente, vs. salina: 32 ± 26 ml/min/kg). A depleção de sódio reduziu a resposta pressora (4 ± 3 mmHg e 13 ± 4 mmHg, respectivamente) e hiperventilação (-112 ± 112 e 7 ± 115 ml/min/kg, respectivamente) e não alterou a bradicardia (-116 ± 30 e -156 ± 18 bpm, respectivamente). Injeção unilateral de α,β -metil ATP (2 nmol/100 nl) no NTS também produziu resposta pressora (36 ± 5 mmHg, vs. salina: 3 ± 1 mmHg), bradicardia (-194 ± 18 bpm, vs. salina: -13 ± 6 bpm) e não modificou a VE (54 ± 96 ml/min/kg, vs. salina: 32 ± 26 ml/min/kg). A depleção de sódio reduziu a resposta pressora (24 ± 5 mmHg), a VE (-147 ± 184 ml/min/kg) e não alterou a bradicardia (-168 ± 22 bpm). Com relação ao objetivo 2, os resultados mostraram que a injeção de α,β -metil ATP (2 nmol/100 nl) no NTS promoveu resposta pressora e bradicárdica (24 ± 4 mmHg e -187 ± 39 bpm, respectivamente) e estas respostas foram reduzidas aos 15 minutos após a injeção de suramin no NTS ipsilateral (13 ± 2 mmHg e -80 ± 18 bpm). A injeção de α,β -metil ATP no NTS não promoveu alterações significativas na VE. Com relação ao objetivo 3, os resultados mostraram que as injeções de α,β -metil ATP (2 nmol/100 nl) no NTS promoveu resposta pressora e bradicardia ($+32 \pm 5$ mmHg e -183 ± 21 bpm). O pré-tratamento com o antagonista de receptor alfa-1 adrenérgico, prazosin (1 mg/kg de peso corporal, i.v.), atenuou o aumento da PAM ($+10 \pm 3$ mmHg) sem alterar a bradicardia (-192 ± 21 bpm) provocada pela injeção de α,β -metil-ATP no NTS e o pré-tratamento com o antagonista colinérgico muscarínico, metil-atropina (1 mg/kg de peso corporal, i.v.) não alterou a resposta pressora ($+31 \pm 6$ mmHg) e aboliu a bradicardia ($+21 \pm 6$ bpm) induzida pela injeção de α,β -metil ATP no NTS. Os resultados sugerem que alterações neuroendócrinas produzidas pela depleção de sódio (aumento dos níveis de ANG II e aldosterona circulantes e a desativação de receptores de volume e dos barorreceptores) podem alterar as neurotransmissões glutamatérgica e purinérgica no NTS. Além disso, a ativação dos receptores purinérgicos P2X no NTS ativa simultaneamente o sistema nervoso simpático e

parassimpático para produzir respostas pressora e bradicárdica, respectivamente, sem alterar a ventilação pulmonar.

Palavras-chave: L-glutamato, α,β -metil ATP, depleção de sódio, suramin, receptores purinérgicos P2.

ABSTRACT

Fávero, MT. Cardiorespiratory responses produced by activation of the glutamatergic and purinergic receptors of nucleus of the solitary tract [Dissertação de Mestrado] Araraquara: Faculdade de Odontologia da Araraquara, UNESP; 2012.

The central nervous system (CNS) has an important role in maintaining the composition and volume of body fluids for the appropriate tissue perfusion. An important area of the CNS that receives cardiorespiratory afferents is the nucleus of the solitary tract (NTS) that has several types of neurotransmitters, including L-glutamate and adenosine 5'-triphosphate (ATP). Neuroendocrine changes that occur during sodium depletion could change glutamatergic and purinergic neurotransmissions into the NTS. Thus, in this study, we investigated: 1) the effects of sodium depletion on cardiorespiratory responses before and after injections of L-glutamate and α,β -methyleneadenosine 5'-triphosphate (α,β -methyl ATP, a selective P2X purinergic receptor agonist) into the NTS of unanesthetized and sodium depleted rats; 2) the cardiorespiratory responses of the injection of α,β -methyl ATP before and after the blockade of P2 receptor purinergic antagonist with suramin (non-selective P2 purinergic receptor antagonist) into NTS of unanesthetized and normovolemic rats and 3) to describe the autonomic components involved with the cardiovascular responses after injection of α,β -methyl ATP into the NTS. Male Holtzman rats with a cannula implanted into the NTS and catheters inserted into the femoral artery and vein were used. Ventilation (VE) was measured by whole body plethysmograph method. In relation to objective 1, the cardiorespiratory parameters were measured in normovolemic (before sodium depletion), depleted (24 h after sodium depletion) and repleted rats (two hours after free access to 0.3 M NaCl and water). Sodium depletion was induced by the treatment with the diuretic furosemide (20 mg/kg of body weight) injected subcutaneously (s.c.) followed by 24 h of sodium-deficient diet. Sodium depletion did not modify baseline MAP (104 ± 4 mmHg, vs. normovolemic: 105 ± 4 mmHg) or HR (334 ± 20 bpm, vs. normovolemic: 379 ± 13 bpm) but increased the VE (708 ± 107 ml/min/kg, vs. normovolemic: 478 ± 60 ml/min/kg). This effect was due to increase on tidal volume (VT, 7 ± 0.6 ml/kg, vs. normovolemic: 5 ± 0.4 ml/kg) without effect on the respiratory frequency (fR, 99 ± 8 cpm,

vs. normovolemic: 85 ± 6 cpm). In repleted rats, VE did not return to normal level (640 ± 33 ml/min/kg, vs. normovolemic: 478 ± 60 ml/min/kg). Unilateral injections of L-glutamate (1 and 5 nmol/100 nl) into the NTS produced pressor response (17 ± 3 and 36 ± 3 mmHg, respectively, vs. saline: 3 ± 1 mmHg), bradycardia (-130 ± 15 and -169 ± 10 bpm, respectively, vs. saline: -13 ± 6 bpm) and the hyperventilation (233 ± 44 and 495 ± 114 ml/min/kg, respectively, vs. saline: 32 ± 26 ml/min/kg). Sodium depletion reduced pressor responses (4 ± 3 mmHg and 13 ± 4 mmHg, respectively) and hyperventilation (-112 ± 112 and 7 ± 115 ml/min/kg, respectively) and did not change bradycardia (-116 ± 30 and -156 ± 18 bpm, respectively). Unilateral injections of α,β -methyl ATP (2 nmol/100 nl) into the NTS also produced pressor response (36 ± 5 mmHg, vs. saline: 3 ± 1 mmHg), bradycardia (-194 ± 18 bpm, vs. saline: -13 ± 6 bpm) and did not change VE (54 ± 96 ml/min/kg, vs. saline: 32 ± 26 ml/min/kg). Sodium depletion reduced pressor response (24 ± 5 mmHg), VE (-147 ± 184 ml/min/kg) and did not change bradycardia (-168 ± 22 bpm). In relation to objective 2, the results showed that injection of α,β -methyl ATP (2 nmol/100 nl) into NTS produced pressor response (24 ± 4 mmHg e -187 ± 39 bpm, respectively) and these responses were reduced 15 min after injection of suramin into NTS ipsilateral (13 ± 2 mmHg e -80 ± 18 bpm). Injection of α,β -methyl ATP into NTS produced no significantly change in VE. In relation to objective 3, the results showed that injection of α,β -methyl ATP (2 nmol/100 nl) into NTS promote pressor and bradycardic response (32 ± 5 mmHg and -183 ± 21 bpm). The pre-treatment with the alpha1-adrenoceptor antagonist prazosin (1 mg/kg bw, i.v.) attenuated the increase in MAP ($+10 \pm 3$ mmHg) without changing the bradycardic response (-192 ± 21 bpm) evoked by injection of α,β -methyl ATP into NTS. The pre-treatment with the cholinergic muscarinic antagonist, methyl-atropine (1 mg/kg bw, i.v.) did not changed the pressor response ($+31 \pm 6$ mmHg) and abolished the bradycardic response ($+21 \pm 6$ bpm) induced by injection of α,β -methyl ATP into the NTS. The results suggest that neuroendocrine changes produced by sodium depletion (increased level of circulating ANG II, aldosterone and the desactivation of the volume receptors and baroreceptors) may change the glutamatergic and purinergic neurotransmissions into the NTS. Furthermore, activation of P2X receptors in the NTS activates both the sympathetic and parasympathetic nervous system to produce pressor and bradycardic responses, respectively, without changing ventilation.

Keywords: L-glutamate, α,β -metil ATP, sodium depletion, suramin, P2 purinergic receptors.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ANG II – angiotensina II;

AP – área postrema;

ATP – Adenosina- 5'- trifosfato

bpm – batimentos por minutos

BTPS – body temperature and pressure, saturated

CC – canal central

cpm – ciclos por minuto

EPM – erro padrão da média

FC – frequência cardíaca

fR – frequência respiratória

FURO – furosemida;

g – grama(s)

h – hora(s)

i.c.v. – intracerebroventricular;

i.p. – intraperitoneal

i.v. – intravenoso

Kg – quilograma

l – litro(s)

M – molar

mEq – miliequivalente

mg – miligrama(s)

min – minuto(s)

ml – mililitros

mm – milímetro(s)

mmHg – milímetros de mercúrio

n – número de ratos

NaCl – cloreto de sódio

nl – nanolitro(s)

nmol – nanomol(es)

NOR – norepinefrina

NTS – núcleo do trato solitário

O₂ – oxigênio

PAM – pressão arterial média

PAP – pressão arterial pulsátil

pH – potencial hidrogeniônico

PPADS – pyridoxalphosphate-6-azophenyl-2',4'-disulfonic acid;

s.c. – subcutânea

SNC – sistema nervoso central;

VC – volume corrente

VE – ventilação pulmonar

α,β -metil ATP – α,β -methyleneadenosine 5'-triphosphate

μg – micrograma(s)

μL – microlitro(s)

μm – micrometro(s)

α – alfa

β – beta

\pm – mais ou menos

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fotomicrografia de um corte coronal do encéfalo de um rato representativo dos grupos testados, mostrando o local da injeção, indicado pela seta, no núcleo do trato solitário (NTS). AP = área postrema e CC = canal central.

Figura 2: Representação esquemática de um corte coronal do tronco encefálico mostrando círculos fechados que representam os centros das injeções unilaterais no NTS de 9 ratos (Bregma -13,68 mm, de acordo com Paxinos e Watson, 2004) e círculos abertos que representam as injeções fora do NTS de 6 ratos. AP = área postrema, cc = canal central, 12N = núcleo hipoglossal, 10N = núcleo motor dorsal do vago.

Figura 3: Pressão arterial média (PAM, mmHg, painel A) e frequência cardíaca (FC, bpm, painel B) basais em ratos normovolêmicos, depletados e repletos de sódio. Resultados expressos como média \pm EPM. n = 9.

Figura 4: Volume corrente (VC, ml/Kg, painel A), frequência respiratória (fR, cpm, painel B) e ventilação (VE, ml/min/Kg, painel C) basais em ratos normovolêmicos, depletados e repletos de sódio. Resultados expressos como média \pm EPM. n = 9.* diferente do normovolêmico.

Figura 5: Variações da pressão arterial média (PAM, mmHg, painel A) e frequência cardíaca basal (FC, bpm, painel B) em resposta à injeção unilateral de salina, L-glutamato (1 e 5 nmol/100 nl) e α,β -metil ATP (2 nmol/100 nl) em ratos normovolêmicos, depletados e repletos de sódio. Resultados expressos como média \pm EPM. n = 9. * diferente de salina, # diferente do normovolêmico.

Figura 6- Variações do volume corrente (Δ VC, ml/Kg, painel A), frequência respiratória (Δ fR, cpm, painel B) e ventilação (VE, ml/min/Kg, painel C) em resposta à injeção unilateral de salina, L-glutamato (1 e 5 nmol/100 nl) e α,β -metil ATP (2 nmol/100 nl) em

ratos normovolêmicos, depletados e repletos de sódio. Resultados expressos como média \pm EPM. n = 9. * diferente de salina, # diferente do normovolêmico.

Figura 7: Variações da pressão arterial média (Δ PAM, mmHg, painel A) e frequência cardíaca (Δ FC, bpm, painel B) em resposta à injeção α,β -metil ATP (2 nmol/100 nl) antes (controle, barras pretas) e 15, 30, 45 e 60 min após (barras hachurradas) a injeção de suramin (2 nmol/100 nl) no NTS de ratos não anestesiados e normovolêmicos. Resultados expressos como média \pm EPM, n = 7. * diferente do α,β -metil ATP antes da injeção de suramin.

Figura 8: Variações do volume corrente (Δ VC, ml/Kg, painel A), frequência respiratória (Δ fR, cpm, painel B) e ventilação (Δ VE, ml/min/Kg, painel C) em resposta à injeção α,β -metil ATP (2 nmol/100 nl) antes (controle, barras pretas) e 15, 30, 45 e 60 min após (barras hachuradas) após a injeção de suramin (2 nmol/100 nl) no NTS de ratos não anestesiados e normovolêmicos. Resultados expressos como média \pm EPM, n = 7. * diferente do α,β -metil ATP antes da injeção de suramin.

Figura 9: Pressão arterial média (PAM, mmHg, painel A) e frequência cardíaca (FC, bpm, painel B) basais antes (controle) e aos 15, 30, 45 e 60 minutos após a injeção unilateral de suramin (2 nmol/100 nl) no NTS de ratos não anestesiados. Resultados expressos como média \pm EPM, n=7. * diferente do controle.

Figura 10: Volume corrente (VC, ml/kg, painel A), frequência respiratória (fR, cpm, painel B) e ventilação (VE, ml/min/kg, painel C) basais antes (controle) e aos 15, 30, 45 e 60 minutos após a injeção unilateral de suramin (2 nmol/100 nl) no NTS de ratos não anestesiados. Resultados expressos como média \pm EPM, n=7. * diferente do controle.

Figura 11: Traçado de um rato representativo do grupo mostrando as alterações de pressão arterial pulsátil (PAP, mmHg), pressão arterial média (PAM, mmHg) e frequência cardíaca (FC, bpm) promovidos pela injeção unilateral de α,β -metil ATP (2,0 nmol/100 nl) no NTS antes e aos 5 e 60 minutos após a injeção de prazosin (1mg/Kg de peso corporal, i.v).

Figura 12: Variações na pressão arterial média (Δ PAM, mmHg, painel A) e frequência cardíaca (Δ FC, bpm, painel B) promovidas pela injeção unilateral de α,β -metil ATP (2 nmol/100 nl) no NTS antes e aos 5 e 60 minutos após a injeção de prazosin (1mg/Kg de peso corporal, i.v). Resultados expressos como média \pm EPM. n = 8. * diferente de α,β -metil ATP controle.

Figura 13: Traçado de um rato representativo do grupo mostrando as alterações de pressão arterial pulsátil (PAP, mmHg), pressão arterial média (PAM, mmHg) e frequência cardíaca (FC, bpm) promovidos pela injeção unilateral de α,β -metil ATP (2 nmol/100 nl) no NTS antes e aos 5 e 60 minutos após a injeção de metil-atropina (i.v).

Figura 14: Variações na pressão arterial média (Δ PAM, mmHg) e frequência cardíaca (Δ FC, bpm) promovidas pela injeção unilateral de α,β -metil ATP (2 nmol/100 nl) no NTS antes e aos 5 e 60 minutos após a injeção de metil-atropina (1mg/Kg de peso corporal, i.v). Resultados expressos como média \pm EPM. n = 8. * diferente de α,β -metil ATP controle.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Ingestão cumulativa de água e NaCl 0,3 M por 2 h, para restabelecer o balanço de sódio após a depleção de sódio com furosemida.

Tabela 2. Concentração plasmática de sódio (P_{Na^+}), potássio (P_{K^+}), proteínas totais (Pt) e osmolaridade (P_{Osm}) de ratos normovolêmicos, depletados e repletos de sódio.

SUMÁRIO

RESUMO.....	7
ABSTRACT	10
LISTA DE FIGURAS.....	15
LISTA DE TABELAS	18
SUMÁRIO.....	19
1 Introdução.....	21
2 Objetivos.....	26
3 Material e Método	27
3.1 Animais.....	27
3.2 Cirurgia estereotáxica para implante de cânulas de aço inoxidável no núcleo do trato solitário (NTS)	27
3.3 Injeções no NTS	28
3.4 Drogas e soluções utilizadas.....	28
3.5 Canulação da artéria e veia femoral.....	29
3.6 Medida da pressão arterial e frequência cardíaca	30
3.7 Medidas da Ventilação Pulmonar (VE).....	30
3.8 Depleção de sódio de 24 h	31
3.9 Histologia.....	31
3.10 Apresentação dos resultados e análise estatística	32
4 Protocolos Experimentais	33
4.1 Efeitos da depleção de sódio sobre as respostas cardiorrespiratórias antes e após a ativação dos receptores glutamatérgicos e purinérgicos no NTS de ratos não anestesiados.....	33
4.2 Determinação das concentrações plasmáticas de sódio, potássio e proteínas totais e osmolaridade.....	34
4.3 Efeito da prévia injeção de suramin no NTS sobre as respostas cardiorespiratórias promovidas pela injeção de α,β-metil ATP no NTS de ratos normovolêmicos	35
4.4 Efeitos do bloqueio autonômico nas respostas cardiorrespiratórias produzidas pela injeção de α,β-metil ATP no NTS de ratos acordados.....	36

5 Resultados	37
5.1 Localização histológica da cânula no NTS	37
5.2 Efeito da depleção de sódio sobre as respostas cardiorrespiratórias	40
5.3 Efeitos da depleção de sódio sobre as respostas cardiorrespiratórias após a ativação dos receptores glutamatérgicos e purinérgicos no NTS de ratos não anestesiados.	43
5.4 Ingestão cumulativa de água e sódio após a depleção de sódio	46
5.5 Concentrações plasmáticas de sódio, potássio, proteínas totais e osmolaridade	48
5.6 Efeito da injeção unilateral de L-glutamato em áreas adjacentes ao NTS nas respostas cardiovasculares	50
5.7 Efeito da prévia injeção de suramin no NTS sobre as respostas cardiorespiratórias promovidas pela injeção de α,β-metil ATP no NTS de ratos normovolêmicos	51
5.8 Efeitos do bloqueio autonômico sobre as respostas cardiovasculares promovidas pela injeção de α,β-metil ATP no NTS de ratos não anestesiados	57
6 Discussão	62
7 Sumário	67
8 Conclusão	68
9 Referências	69

1 Introdução

A composição e o volume dos líquidos corporais devem ser regulados dentro de uma faixa estreita para a manutenção adequada da pressão sanguínea para os tecidos. Diariamente os animais perdem água e/ou eletrólitos (principalmente o sódio), através do suor, respiração e predominantemente pela urina. Portanto, é essencial que haja uma regulação dos mecanismos que controlam o balanço entre a ingestão e a excreção de água e eletrólitos, em especial o sódio que representa o principal fator osmótico do compartimento extracelular (Verbalis, 2003).

O sistema nervoso central (SNC) possui um papel fundamental na manutenção adequada da composição e volume dos líquidos corporais, uma vez que possui sensores que detectam alterações mínimas nestes parâmetros. Esses sensores são chamados de: a) osmorreceptores centrais e periféricos que detectam principalmente mudanças na osmolaridade e b) barorreceptores que são encontrados principalmente no arco da aorta e seio carotídeo e respondem primariamente a variações da pressão arterial (Edwards e Johnson, 1991). As informações geradas por estes sensores são conduzidas ao SNC através do X e IX pares de nervos cranianos (nervos vago e glossofaríngeo, respectivamente) (Ciriello e cols, 1994). No SNC, estas informações convergem para o núcleo do trato solitário (NTS), primeira estação sináptica destas aferências sensoriais Adachi, 1984; Ciriello e cols, 1994; Cottle, 1964 e Palkovits e Zaborsky, 1977).

Alterações de volemia podem ser causadas por diferentes situações fisiológicas como vômito, diarreia, aumento da ingestão de sódio, ou pelo uso de diuréticos. A depleção de sódio produzida pela injeção subcutânea (s.c.) do diurético furosemida acompanhada de uma dieta deficiente em sódio por 24 horas é um modelo amplamente utilizado em nosso laboratório para o estudo do apetite ao sódio (Sato e cols., 1996; Menani e cols., 1998; Nozaki e cols., 2002; de Oliveira e cols., 2003; de Oliveira e cols., 2007; Menezes e cols., 2011). A depleção de sódio promove alterações no balanço dos fluidos corporais que ativam respostas comportamentais, hormonais e autonômicas para corrigir tais mudanças e restaurar a homeostase de sódio (Zardetto-Smith e cols., 1993; De Luca e cols., 2000). No entanto, as alterações cardiorespiratórias que ocorrem durante este modelo de depleção de sódio ainda não foram estudadas.

Está bem estabelecido que durante a depleção de sódio com furosemida ocorrem alterações neuroendócrinas como um elevado nível de angiotensina II (ANG II) e aldosterona circulante (Haber, 1976; Speilman e Davis, 1974), redução na reatividade vascular (Armsworth e cols., 1986; Gerkens e cols., 1987), a desativação de receptores de volume e atenuação do barorreflexo (Rocchini e cols., 1977; Echtenkamp e Anderson, 1988).

Apesar de ANG II potencializar a atividade simpática (Zimmerman, 1973; Zimmerman e cols., 1984), foi sugerido que durante a depleção de sódio a atividade simpática estaria reduzida em cães (Brosnihan e cols., 1981; Szilagyi e cols., 1981). Estas mudanças neuroendócrinas que ocorrem após a depleção de sódio modificam as repostas cardiovasculares de alguns agentes vasoativos como a ANG II e norepinefrina (NOR), e também prejudica o aumento da pressão arterial durante a oclusão bilateral das carótidas (Salgado e cols., 1986). Adicionalmente, estudos do nosso laboratório mostraram que a depleção de sódio reduziu a resposta pressora à injeção periférica de ANG II e NOR, e injeção central de ANG II, NOR e carbacol, sugerindo que a depleção de sódio prejudica os mecanismos envolvidos na resposta pressora mediada pela ativação central e periférica mediada por ativação simpática e ANG II (Colombari e cols., 1992). No entanto, nenhum desses estudos verificou se as alterações neuroendócrinas que ocorrem durante a depleção de sódio poderiam alterar as respostas cardiorespiratórias produzidas por importantes neurotransmissores presentes no NTS, como o L-glutamato e a adenosina-5'-trifosfato (ATP).

O NTS é constituído por grupos heterogêneos de neurônios, dispostos dorsalmente no bulbo, que se estendem no sentido rostro-caudal, desde a extremidade caudal no núcleo do nervo facial até a parte caudal piramidal (Ciriello e cols., 1994; Ter Horst e Streefland, 1994). O NTS é considerado o principal centro integrador do controle cardiovascular e possui uma grande variedade de neurotransmissores/neuromoduladores (Van Giersbergen e cols., 1992; Dampney, 1994; Lawrence e Jarrott, 1996). Um importante neurotransmissor presente no NTS é o aminoácido excitatório L-glutamato que é liberado principalmente pelas aferências sensoriais baroreceptoras e quimiorreceptoras (Talman e cols., 1980; Talman, 1989; Vardhan e cols., 1993; Zhang e Mifflin, 1993; Haibara e cols., 1995).

A ativação de receptores glutamatérgicos do NTS de ratos não anestesiados produz hipertensão e bradicardia, e envolvem a ativação dos componentes autonômicos simpático e parassimpático de forma independente, pois o tratamento prévio com prazosin (antagonista alfa-1 adrenérgico) praticamente aboliu a resposta pressora, enquanto que a bradicardia permaneceu inalterada. Por outro lado, o pré-tratamento com metil-atropina (antagonista colinérgico muscarínico) aboliu somente a bradicardia (Colombari e cols., 1994).

Estudos também mostraram a participação dos receptores glutamatérgicos no controle respiratório (Mizusawa e cols, 1994, Braga e cols., 2006). No estudo utilizando a preparação *in situ* denominada preparação tronco encefálico-coração (Working Heart-Brainstem Preparation, WHBP) a ativação de receptores glutamatérgicos ionotrópicos do NTS produziu redução na frequência de disparos do nervo frênico, e a ativação de receptores glutamatérgicos metabotrópicos do NTS produziu aumento da frequência de disparos do nervo frênico, sugerindo o envolvimento dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos e metabotrópicos do NTS no controle neural respiratório (Braga e cols., 2006). Além disso, estudo de Mizusawa e cols. (1994) mostrou que ocorre um aumento da concentração extracelular de L-glutamato no NTS de ratos não anestesiados durante a exposição destes ratos a hipóxia (10% O₂), reforçando a hipótese de que os receptores glutamatérgicos do NTS participam do controle respiratório central.

Um outro importante neurotransmissor presente no NTS é o ATP e seus receptores chamados de purinérgicos (Ralevic e Burnstock, 1998, Yao e cols., 2000; Braga e cols., 2007). O conceito da neurotransmissão purinérgica, onde o ATP e a adenosina são as principais substâncias ativas, foi introduzido por Burnstock em 1972. O ATP bem como seu metabólito, a adenosina, são purinas extracelulares envolvidas em diversos efeitos biológicos atuando nos receptores purinérgicos (Ralevic e Burnstock, 1998, Fredholm, 1995; Burnstock, 1997, Kennedy, 2000, Fagura e cols., 2000). Os receptores purinérgicos foram primeiramente divididos bioquímica e farmacologicamente por Burnstock (1978) em 2 classes: P1 e P2. De acordo com esta classificação os receptores P1 são exclusivos para a adenosina e são subdivididos em 4 tipos: A1, A2a, A2b e A3, estando todos acoplados à proteína G e são dependentes de adenil-ciclase. Além disso, eles são antagonizados por metilxantinas e seus derivados. Os receptores P2 são exclusivos para o ATP e são subdivididos em 2 tipos: P2X e P2Y. Nos mamíferos, os receptores P2X são subdivididos

em 7 tipos: (P2X1 a P2X7) e são dependentes de canais iônicos (ionotrópicos). Os P2Y são subdivididos em 5 tipos: (P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6 e P2Y11) e são acoplados a proteína G e operam via inositol trifosfato (Ralevic e Burnstock, 1998). O ATP é o agonista natural para os receptores P2, porém a sua meia vida é muito curta, ou seja, o ATP é muito instável e é rapidamente degradado na fenda sináptica por ecto-nucleotidases, sendo a adenosina o seu principal metabólito. Os receptores purinérgicos P2X são ativados por análogos ou agonistas mais estáveis do que o ATP como o alfa- beta- metileno-ATP (α,β -metil ATP).

Recentemente vários estudos têm demonstrado que o ATP extracelular, atuando nos receptores P2, está envolvido em vários mecanismos centrais de regulação cardiovascular, respiratória e da temperatura corporal (Phillis e cols., 1997; Horiuchi e cols., 1999, Ralevic e cols., 1999; Ralevic, 2000; Gourine e cols., 2002; Paton e cols., 2002; Gourine e cols., 2004; De Paula e cols., 2004; Gourine e cols., 2005a). E estudos de imunohistoquímica (Yao e cols., 2000) evidenciam a densa marcação de receptores purinérgicos (especialmente receptores P2) em várias regiões envolvidas com o controle cardiorrespiratório, dentre elas o NTS.

Nos estudo de De Paula e cols. (2004) verificou-se que injeção de ATP no NTS de ratos não anestesiados promove resposta pressora e bradicárdica de maneira dose-dependentes, e estas respostas foram atenuadas pelo antagonismo dos receptores glutamatérgicos no NTS, sugerindo que o ATP e L-glutamato poderiam estar atuando conjuntamente no processamento de respostas cardiorrespiratórias dentro do NTS. Neste mesmo estudo, foram investigados os componentes autonômicos (simpático e parassimpático) da injeção de ATP no NTS. A injeção intravenosa (i.v.) de prazosin (antagonista alfa-1 adrenérgico) atenuou a resposta pressora e não alterou a bradicardia produzida pela injeção do ATP no NTS. Por outro lado, a injeção i.v. de metil-atropina (antagonista colinérgico muscarínico) aboliu a bradicardia e não alterou a pressão arterial induzida pela injeção do ATP no NTS, sugerindo que a ativação dos receptores purinérgicos com ATP ativa os dois componentes autonômicos simpático e parassimpático.

Desta forma, considerando as evidências de que durante a depleção de sódio ocorrem mudanças neuroendócrinas e essas mudanças poderiam interferir na neurotransmissão no NTS, o nosso primeiro objetivo foi avaliar as respostas cardiorrespiratórias basais e à ativação dos receptores glutamatérgicos e purinérgicos do

NTS após a depleção de sódio. Além disso, considerando que as respostas cardiorrespiratórias e os componentes autonômicos envolvidos na ativação dos receptores purinérgicos P2X no NTS (com α,β -metil ATP) não estão bem estabelecidos em ratos não anestesiados e normovolêmicos, nossos objetivos também foram: a) avaliar as respostas cardiorrespiratórias após a injeção de α,β -metil ATP associada à injeção de suramin (antagonista não-seletivo dos receptores purinérgicos P2) no NTS e b) avaliar os componentes autonômicos envolvidos nas respostas cardiovasculares após a injeção de α,β -metil ATP no NTS.

2 Objetivos

- 1) caracterizar as respostas cardiorrespiratórias basais após a depleção de sódio;
- 2) caracterizar as respostas cardiorrespiratórias após a ativação dos receptores glutamatérgicos e purinérgicos no NTS de ratos normovolêmicos, depletados e repletos de sódio. Para tanto, investigamos os efeitos de injeções unilaterais no NTS de L-glutamato (agonista glutamatérgico) e α,β -metil ATP (agonista purinérgico P2X);
- 3) avaliar o efeito do pré-tratamento com antagonista purinérgico P2 (suramin) sobre as respostas cardiorrespiratórias promovidas pela injeção unilateral de α,β -metil ATP no NTS de ratos não anestesiados e normovolêmicos;
- 4) estudar os componentes autonômicos envolvidos nas respostas cardiovasculares após a ativação dos receptores purinérgicos P2X no NTS com injeção de α,β -metil ATP no NTS antes e após o bloqueio do sistema nervoso autônomo com prazosin (antagonista alfa-1 adrenérgico) e metil-atropina (antagonista colinérgico muscarínico) injetados periféricamente.

3 Material e Método

3.1 Animais

Foram utilizados ratos Holtzman com peso entre 290-300 g, fornecidos pelo Biotério do Campus de Araraquara, UNESP. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais de aço inoxidável, com livre acesso a ração Bio Base (Águas Frias, SC, Brasil), água e NaCl 0,3 M (quando necessário) e permaneceram em salas climatizadas (temperatura de $23 \pm 2^\circ$ C e umidade de $50 \pm 10\%$), com ciclo claro-escuro de 12 h no Laboratório de Fisiologia do Departamento de Fisiologia e Patologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara (FOAr), UNESP. Os protocolos experimentais aos quais os animais foram submetidos foram aprovados e autorizados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal - CEEA (Proc. CEEA nº 33/2010) da FOAr, UNESP.

3.2 Cirurgia estereotáxica para implante de cânulas de aço inoxidável no núcleo do trato solitário (NTS)

Para o implante das cânulas cerebrais, os ratos foram anestesiados com cloridrato de cetamina (80 mg/kg de peso corporal, Cristália, Itapira, SP, Brasil) combinada com xilazina (7 mg/kg de peso corporal, Agener União, Embu-Guaçu, SP, Brasil) intraperitonealmente (i.p.) e adaptados a um aparelho estereotáxico (modelo Kopf 900). A seguir foi injetado s.c. o anestésico local lidocaína com vasoconstrictor na região do escalpo a ser aberta, reduzindo assim o sangramento. Após a anti-sepsia da pele com solução de álcool iodado, foi feita uma incisão longitudinal na pele e tecido subcutâneo, expondo-se a região da calota craniana, a qual foi posteriormente irrigada com solução fisiológica e água oxigenada. A torre do estereotáxico foi colocada na posição vertical (angulação zero) e a cabeça do animal foi ajustada até que os pontos bregma e lambda da calota craniana ficassem no mesmo nível horizontal e então foram feitas as leituras das coordenadas ântero-posterior, lateral e dorso-ventral a partir do bregma. O ponto de introdução da cânula guia foi determinado utilizando-se as coordenadas estereotáxicas do atlas de Paxinos e Watson (1998) em relação ao bregma. As coordenadas utilizadas para o implante das cânulas-guias em direção ao NTS foram: ântero-posterior = 14,5 mm caudal ao bregma; lateral = $\pm 0,5$

mm à linha média e dorso-ventral = 7,5 mm abaixo do osso. Neste ponto foi feita a trepanação da calota craniana com o auxílio de uma broca odontológica esférica acoplada a um motor de baixa rotação. Por esse orifício foram introduzidas as cânulas de 15 mm de comprimento, sendo que a extremidade inferior desta ficou 1 mm acima da superfície dorsal do tronco cerebral. As cânulas-guias foram fixadas ao crânio do animal através de resina acrílica e de pequenos parafusos de aço inoxidável, previamente colocados na calota craniana. Após a completa fixação das cânulas, a torre do estereotáxico foi removida e para evitar obstrução das cânulas-guias, foi introduzido nas mesmas um mandril (oclusor de 15 mm de comprimento) também de aço inoxidável, o qual foi mantido dentro das cânulas até a realização dos experimentos. O procedimento cirúrgico não excedeu 40 min. Após a cirurgia cerebral, os animais receberam uma injeção intramuscular (0,2 ml/rato) de pentabiótico veterinário – pequeno porte (benzilpenicilina 80.000 UIs e estreptomicina – 33 mg, Fort Dodge Saúde Animal Ltda) e uma injeção subcutânea de analgésico/anti-inflamatório (cetoprofeno 1% - 0,1 ml/rato). Os animais ficaram em observação e recuperação durante 7 dias, e neste período eram manipulados diariamente pela experimentadora.

3.3 Injeções no NTS

As drogas utilizadas foram manualmente injetadas unilateralmente no NTS em um volume de 100 nl no sítio desta região, utilizando-se uma seringa Hamilton (5 µl, Hamilton, Reno, NV, EUA) conectada com um tubo de polietileno PE-10 a uma agulha injetora que foi introduzida no NTS pela cânula guia previamente fixada nesta região. A cânula injetora foi 1,2 mm mais longa do que as cânulas-guias a fim de que as injeções atingissem diretamente o NTS.

3.4 Drogas e soluções utilizadas

- L-glutamato (1 e 5 nmol/100 nl, agonista glutamatérgico);
- Sal de lítio de α,β -metiladenosina 5' trifosfato (α,β -metil ATP, 2 nmol/100 nl, agonista purinérgico P2X);

- Sal hexasódio do ácido 8,8'- [Carbonylbis [imino-3,1-phenylenecarbonylimino (4-methyl-3,1-phenylene)carbonylimino]] bis-1,3,5-naphthalene trisulfonic (suramin, 2 nmol/100 nl, antagonista não-seletivo dos receptores purinérgicos P2).
- Prazosin (1 mg/Kg de peso corporal, antagonista alfa-1 adrenérgico). Administrado i.v.;
- Metil-atropina (1 mg/Kg de peso corporal, antagonista colinérgico muscarínico). Administrado i.v.;
- Furosemida (20 mg/Kg de peso corporal, diurético/saliurérico) foi dissolvida em salina isotônica com pH próximo a 9,0 ajustado com solução de hidróxido de sódio e administrada s.c.

Todas as drogas foram obtidas da Sigma Chemical, St. Louis, MO, EUA, e apenas o suramin foi obtido da Tocris Bioscience, Ellisville, MO, EUA. As drogas (com exceção da furosemida) foram dissolvidas em salina isotônica estéril. Salina isotônica estéril foi utilizada nos experimentos controle, e as doses utilizadas foram retiradas de dados da literatura (Colombari e cols., 1994; De Paula e cols., 2004) bem como de estudos pilotos realizados no laboratório.

3.5 Canulação da artéria e veia femoral

Um dia antes dos experimentos foi realizada a canulação da artéria e veia femorais. As cânulas utilizadas foram confeccionadas previamente com um tubo de polietileno PE-10 (Clay Adams, Parsipanny, NJ) de 3,5 cm, soldado a outro tubo de polietileno PE-50 de 15 cm. Antes de serem implantadas, as cânulas foram preenchidas com solução fisiológica e obstruídas na extremidade livre do PE-50 com pino de metal. Sob anestesia pela cetamina (80 mg/kg de peso corporal) combinada com xilazina (7 mg/kg de peso corporal), a cânula arterial foi introduzida na aorta abdominal, através da artéria femoral e uma outra cânula foi introduzida na veia femoral. Uma vez implantadas, as cânulas são dirigidas subcutaneamente, com auxílio de um trocáter, para a região escapular do rato, onde foram exteriorizadas e fixadas com linha de sutura. A cânula arterial foi utilizada para registro direto da pressão arterial pulsátil (PAP) e cálculo da pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC). A cânula venosa foi utilizada para administração sistêmica de drogas.

3.6 Medida da pressão arterial e frequência cardíaca

Os registros da PAP, PAM e FC foram realizados em ratos não anestesiados e com livre movimentação no dia seguinte ao da canulação da artéria e veia femorais. A cânula arterial, previamente heparinizada (250 UI/ml), foi conectada a um transdutor de pressão (Stathan P 23 Db, Dover, NH, EUA) acoplado a um sistema computadorizado de registro (modelo Powerlab 16/30SP, ADInstruments, Castle Hill, NSW, Australia).

3.7 Medidas da Ventilação Pulmonar (VE)

As medidas de VE foram obtidas por pletismografia de corpo inteiro (Bartlett e Tenney, 1970). Este método é baseado no princípio de que um animal, dentro de uma câmara vedada, terá seu volume de ar corrente inspirado aquecido, da temperatura da câmara à temperatura corporal e saturado com vapor de água; enquanto na expiração, seu volume de ar corrente será esfriado até a temperatura da câmara, havendo perda de vapor de água. Estas situações de aquecer e umidecer o ar inspirado e de esfriar e desidratar o ar expirado são acompanhadas por pequenas mudanças de pressão, que podem ser detectadas por um transdutor diferencial de pressão. A câmara de acrílico, onde o animal é colocado e pode se mover livremente tem conexão com um transdutor diferencial de pressão e com outra câmara de referência, a qual evita artefatos de medida provocados pela variação de pressão dentro do laboratório, como a abertura de portas. Além disto, a câmara é equipada com um termômetro e uma seringa para calibração.

Durante as medidas de ventilação, o fluxo é interrompido e a câmara selada por curtos períodos de tempo (~ 2 min) e as oscilações na temperatura do ar causadas pela respiração podem ser medidas como oscilações na pressão. Os sinais detectados pelo transdutor diferencial de pressão são coletados por um registrador o qual está conectado a um conversor analógico-digital. Isto permite a digitalização dos sinais em um microcomputador, utilizando um programa de aquisição de dados. Os dados são analisados através de um programa de cálculos, permitindo a obtenção da frequência respiratória (fR) e da amplitude do sinal (PT). O volume corrente (VC) é calculado através da fórmula abaixo (Bartlett e Tenney, 1970). A calibração do volume é feita antes e durante cada experimento por injeção na câmara de uma quantidade conhecida de ar (1 ml) usando uma seringa graduada. A VE é calculada multiplicando o VC pela fR. Segundo Bartlett e

Tenney (1970) medidas diretas de VE por pneumotacografia resultam em valores bastante próximos daqueles obtidos por pletismografia.

$$VC = \frac{PT}{PK} \times VK \times \frac{TC}{TR} \times \frac{(PB - PC)}{(PB - PC) - \frac{TC}{Tb} \times (PB - PR)}$$

Definição dos símbolos da equação:

VC: Volume de ar corrente.

VK: Volume de ar injetado na câmara do animal para calibração.

PT: Deflexão de pressão associada com cada volume de ar corrente.

PK: Deflexão de pressão associada ao volume injetado para calibração.

Tb: Temperatura corporal (em Kelvin)

TC: Temperatura do ar dentro da câmara do animal.

PB: Pressão barométrica.

PR: pressão de vapor de água a temperatura corporal.

PC: pressão de vapor de água na camara do animal.

TR: temperatura ambiente.

3.8 Depleção de sódio de 24 h

A depleção de sódio foi feita pelo tratamento com uma única dose de 1 ml/rato do diurético furosemida (20 mg/kg de peso corporal, s.c.), seguido da manutenção dos ratos por 24 h com alimento deficiente em sódio (fubá) e água *ad libitum* antes de se iniciar o protocolo experimental. Os ratos que foram utilizados para o estudo da depleção de sódio, além de água, tiveram à disposição NaCl 0,3 M, desde 6 dias antes do início dos experimentos.

3.9 Histologia

Ao final dos experimentos, os ratos receberam injeção de 100 nl de solução de azul de Evans 2% unilateralmente no NTS para confirmar o local de injeção. Em seguida, os ratos foram profundamente anestesiados com tiopental sódico (70 mg/kg de peso corporal) e submetidos a uma perfusão cerebral por meio de injeção no coração (ventrículo esquerdo) de solução de formalina 10% (40 ml). A seguir, os encéfalos foram retirados e fixados em

formalina 10% por 2-4 dias. Cortes transversais (50 μm de espessura) foram feitos no ponto de injeção do NTS com auxílio de um micrótomo de congelamento (Leica). Os cortes histológicos, montados em lâminas, foram corados pelo método Giemsa. A análise microscópica da localização do sítio de microinjeção foi feita em microscópio óptico. Somente os ratos nos quais o local da injeção estava situado corretamente no NTS intermediário e caudal foram utilizados para a análise estatística dos dados.

3.10 Apresentação dos resultados e análise estatística

Os resultados de cada animal submetido aos protocolos experimentais foram tabelados. A média e o erro padrão da média (EPM) foram representados em gráficos ou tabelas. A análise de variância (ANOVA) de uma via e o pós-teste de Newman Keuls foram utilizados para as comparações entre os diferentes tratamentos. Diferenças foram consideradas significantes para $p < 0,05$.

4 Protocolos Experimentais

4.1 Efeitos da depleção de sódio sobre as respostas cardiorrespiratórias antes e após a ativação dos receptores glutamatérgicos e purinérgicos no NTS de ratos não anestesiados.

Neste protocolo experimental avaliamos os efeitos da depleção de sódio sobre as respostas cardiorrespiratórias antes e após a ativação dos receptores glutamatérgicos e purinérgicos no NTS de ratos normovolêmicos, depletados e repletos de sódio. Desta forma, este protocolo foi realizado em três condições diferentes, no mesmo grupo de ratos: estado normovolêmico (livre acesso a ração, água e NaCl 0,3 M), estado de depleção de sódio [o rato recebeu uma injeção de furosemida (s.c.) e permaneceu por 24 h com dieta deficiente em sódio (fubá, 0,001% sódio e 0,33% potássio) e água *ad libitum*] e estado repleto de sódio (o rato teve acesso por duas horas a NaCl 0,3 M e água para ingestão). Os experimentos foram realizados em 2 dias consecutivos.

As cânulas guias para injeções no NTS foram implantadas 7 dias antes da realização deste protocolo. No dia anterior ao experimento, os ratos foram submetidos à cirurgia para canulação da artéria femoral. No dia seguinte, cada rato foi colocado individualmente na câmara de pletismografia com livre movimentação. A câmara foi ventilada com ar atmosférico (21% O₂) e o rato permaneceu em um período exploratório que variou entre 30 a 60 min, até que o rato ficasse calmo e os parâmetros cardiorrespiratórios se estabilizassem. Após este período, as medidas basais de PAM, FC e VE foram efetuadas. Em seguida, foram realizadas as injeções unilaterais de L-glutamato (1 e 5 nmol/100 nl), α,β -metil ATP (2 nmol/100 nl) e salina no NTS dos ratos normovolêmicos. Então estes ratos, receberam uma injeção subcutânea de 1 ml de furosemida (20 mg/kg do peso corporal), e foram colocados em caixas individuais seguido da manutenção destes animais por 24 h com dieta deficiente em sódio (fubá) e água *ad libitum*. No dia seguinte, os ratos depletados de sódio foram colocados individualmente na câmara de pletismografia, passaram pelo período exploratório, foram realizadas as medidas basais de PAM, FC, VE e as injeções unilaterais de L-glutamato (1 e 5 nmol/100 nl), α,β -metil ATP (2 nmol/100 nl) e

salina no NTS. Após este experimento, com o objetivo de restaurar o balanço de sódio e volume após a depleção de sódio, os ratos foram colocados em gaiolas individuais e tiveram livre acesso a água e NaCl 0,3 M em buretas graduadas (divisão de 0,1 ml). A ingestão cumulativa de água e NaCl 0,3 M foi medida durante 2 h aos 30, 60, 90 e 120 min. Após as 2 h de ingestão, os ratos repletos de sódio foram novamente colocados individualmente na câmara de pletismografia, passaram pelo período exploratório, foram realizadas as medidas basais de PAM, FC, VE e as injeções unilaterais de L-glutamato (1 e 5 nmol/100 nl), α,β -metil ATP (2 nmol/100 nl) e salina no NTS. As injeções no NTS foram realizadas em seqüência aleatória e o intervalo mínimo entre elas foi de 15 min.

4.2 Determinação das concentrações plasmáticas de sódio, potássio e proteínas totais e osmolaridade

Em um outro grupo de ratos, as amostras de sangue foram coletadas dos ratos no estado normovolêmico, estado de depleção e repleção de sódio. No dia anterior à coleta de sangue, os ratos foram submetidos à cirurgia para canulação da artéria femoral. No dia seguinte, as amostras de sangue (1,5 ml) foram coletadas da artéria femoral para determinação da concentração plasmática de sódio, potássio, proteínas totais e a osmolaridade de ratos normovolêmicos. Após esta coleta de sangue, os ratos receberam injeção de furosemida (s.c.) e foi feita a manutenção destes ratos por 24 h com dieta deficiente em sódio (fubá, 0,001% sódio e 0,33% potássio) e água *ad libitum*. No dia seguinte, novas amostras de sangue foram coletadas da artéria femoral para determinação da concentração plasmática de sódio, potássio, proteínas totais e a osmolaridade de ratos depletados. Foi realizada uma reposição de volume (1,5 ml) nestes animais com salina isotônica. Após esta segunda coleta de sangue, com o objetivo de restaurar o balanço de sódio e volume após a depleção de sódio, os ratos foram colocados em gaiolas individuais e tiveram livre acesso a água e NaCl 0,3 M em buretas graduadas (divisão de 0,1 ml). A ingestão cumulativa de água e NaCl 0,3 M foi medida durante 2 h aos 30, 60, 90 e 120 min. Após as 2 h de ingestão, uma nova coleta de sangue foi realizada nos ratos repletos de sódio.

As amostras foram coletadas em tubos de vidro contendo o anticoagulante EDTA sódico (2 mg/ml de sangue) para obtenção do plasma. Todas as amostras foram centrifugadas por 15 minutos. A concentração plasmática de sódio e potássio foram medidas através de um analisador de eletrólitos, com eletrodo de sódio e potássio específico (Nova). A concentração plasmática de proteínas totais foi determinada por refratometria (determinação do índice de refração), utilizando-se refratômetro ATAGO. A determinação da osmolaridade foi obtida através da diminuição do ponto de congelamento, em um osmômetro Modelo 3250 (Advanced Instruments, Norwood, MA, EUA).

4.3 Efeito da prévia injeção de suramin no NTS sobre as respostas cardiorespiratórias promovidas pela injeção de α,β -metil ATP no NTS de ratos normovolêmicos

Neste protocolo experimental avaliamos o efeito da injeção de suramin (2 nmol/100 nl, antagonista não-seletivo dos receptores purinérgicos P2) no NTS sobre as respostas cardiorespiratórias promovidas pela injeção unilateral de α,β -metil ATP no NTS de ratos não anestesiados normovolêmicos.

As cânulas guias para injeções no NTS foram implantadas 7 dias antes da realização deste protocolo. No dia anterior ao experimento, os ratos foram submetidos à cirurgia para canulação da artéria femoral. No dia seguinte, cada rato foi colocado individualmente na câmara de pletismografia com livre movimentação. A câmara foi ventilada com ar atmosférico (21% O₂) e o animal permaneceu em um período exploratório que variou entre 30 a 60 min, até que o animal ficasse calmo e os parâmetros cardiorespiratórios se estabilizassem. Após este período, as medidas basais de PAM, FC e VE foram efetuadas. Em seguida, foi feita a injeção unilateral de L-glutamato (5 nmol/100 nl) no NTS como critério funcional de localização do sítio de injeção a ser estudado. Este critério foi adotado uma vez que o padrão de respostas cardiovasculares à injeção de L-glutamato no NTS (hipertensão e bradicardia) já está bem caracterizado por estudos anteriores (Machado e Bonagamba, 1992 e Colombari e cols., 1994). Uma vez localizado o sítio sensível à injeção de L-glutamato e após o retorno da PAM e FC aos seus valores basais, foi dado um intervalo mínimo de 30 minutos, para então realizarmos a injeção unilateral de α,β -metil

ATP (2 nmol/100 nl) no NTS, com intervalo de 20 min entre as mesmas. Após este período, foi feita a injeção unilateral de suramin (2 nmol/100 nl) no NTS e aos 15, 30, 45 e 60 min após esta injeção, o α,β -metil ATP (2 nmol/100 nl) foi injetado no NTS ipsilateral e as respostas comparadas com o controle (antes da injeção unilateral do suramin no NTS).

4.4 Efeitos do bloqueio autonômico nas respostas cardiorrespiratórias produzidas pela injeção de α,β -metil ATP no NTS de ratos acordados

Para que pudéssemos estudar os mecanismos autonômicos envolvidos na ativação dos receptores purinérgicos P2X do NTS, sete dias após a cirurgia estereotáxica, os ratos foram submetidos à cirurgia para canulação da artéria e veia femoral e colocados em caixas individuais. No dia dos experimentos, os ratos permaneceram em período exploratório em torno de 30 min e então foram realizados os registros basais de PAM e FC. Logo após, foram feitas as injeções de α,β -metil ATP (2 nmol/100 nl) no NTS antes, 5 e 60 min após a injeção i.v. de prazosin (antagonista alfa-1 adrenérgico) e os parâmetros cardiorrespiratórios foram registrados. No mesmo grupo de ratos, no período da tarde, repetimos os procedimentos experimentais descritos anteriormente, exceto que, ao invés da injeção de prazosin foi feita a injeção i.v. de metil-atropina (antagonista colinérgico muscarínico).

5 Resultados

5.1 Localização histológica da cânula no NTS

A figura 1 é uma fotomicrografia de uma secção coronal do tronco encefálico de um rato representativo dos grupos testados, mostrando o local da injeção unilateral no NTS. A figura 2 é uma representação esquemática de um corte coronal do tronco encefálico (adaptado de Paxinos e Watson, 2004) mostrando círculos fechados que representam os centros das injeções unilaterais no NTS de 9 ratos (Bregma -13,68 mm, de acordo com Paxinos e Watson, 2004) e círculos abertos que representam as injeções unilaterais fora do NTS de 6 ratos. O volume de 100 nl promoveu um espalhamento do corante azul de Evan de aproximadamente 1,0 mm de extensão rostro-caudal, o que sugere que a maioria de nossas injeções foram localizadas principalmente nas porções intermediário, subpostremal e caudal do NTS (vide Barraco e cols., 1991 para definições dos subnúcleos do NTS). As injeções unilaterais fora do NTS foram localizadas principalmente em porções laterais, ventrais ou dorsais ao NTS (figura 2).

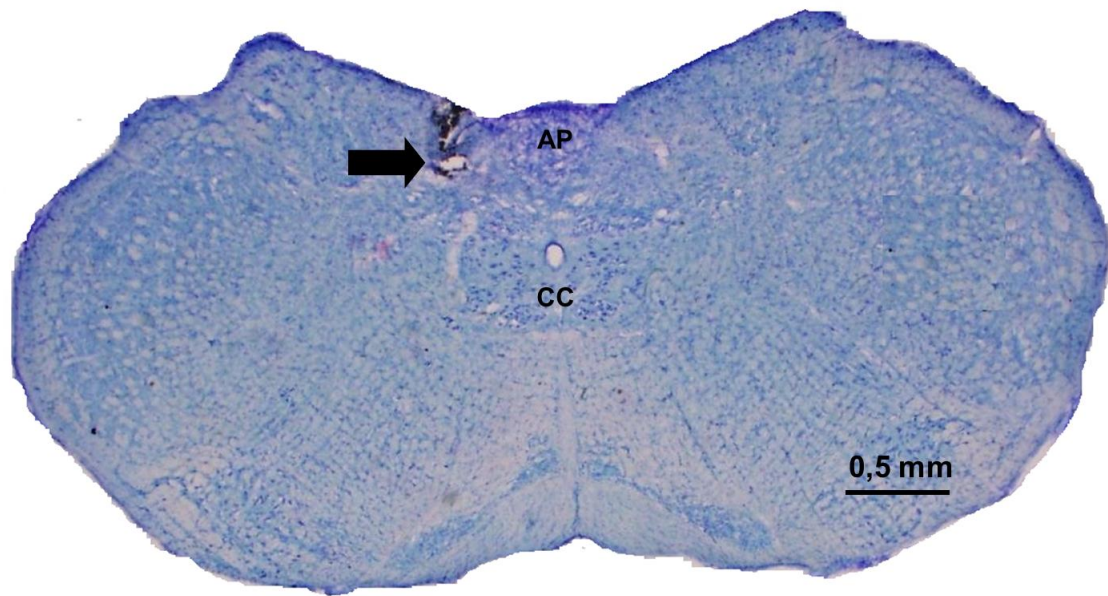


Figura 1: Fotomicrografia de um corte coronal do encéfalo de um rato representativo dos grupos testados, mostrando o local da injeção unilateral, indicado pela seta, no núcleo do trato solitário (NTS). AP = área postrema e CC = canal central.

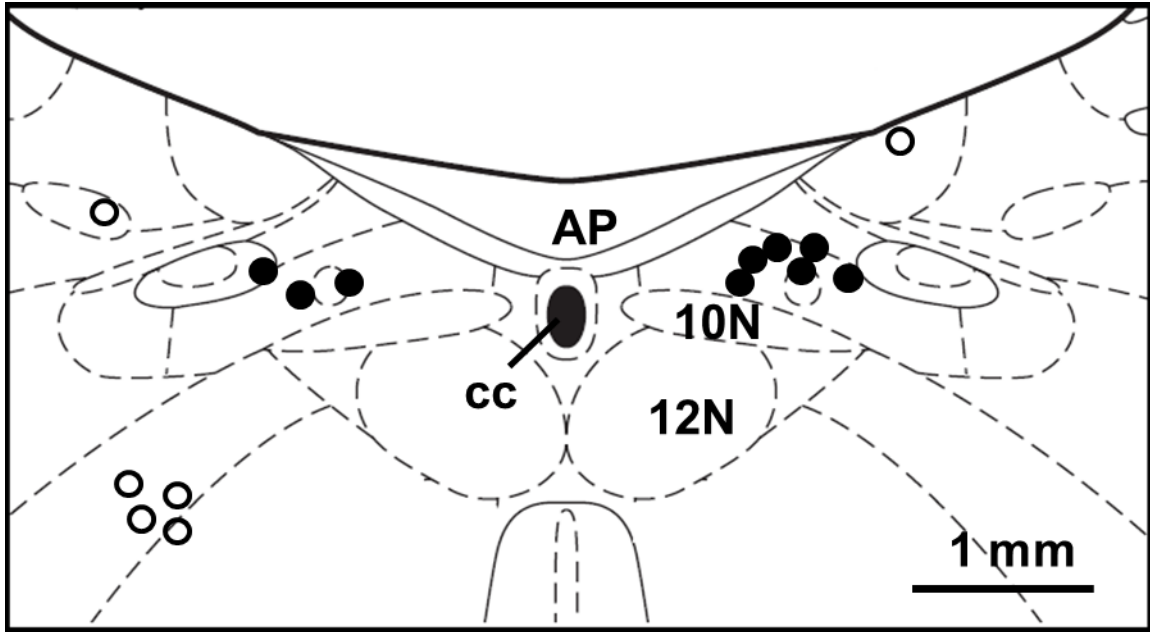


Figura 2: Representação esquemática de um corte coronal do tronco encefálico mostrando círculos fechados que representam os centros das injeções unilaterais no NTS de 9 ratos (Bregma -13,68 mm, de acordo com Paxinos e Watson, 2004) e círculos abertos que representam as injeções fora do NTS de 6 ratos . AP = área postrema, cc = canal central, 12N = núcleo hipoglosso, 10N = núcleo motor dorsal do vago.

5.2 Efeito da depleção de sódio sobre as respostas cardiorrespiratórias

A depleção de sódio não modificou a pressão arterial média (PAM, 104 ± 4 mmHg, vs. normovolêmico: 105 ± 4 mmHg, figura 3A) e a FC (334 ± 20 bpm, vs. normovolêmico: 379 ± 13 bpm, figura 3B) mas aumentou a VE (708 ± 107 ml/min/kg, vs. normovolêmico: 478 ± 60 ml/min/kg, figura 4C). Esta mudança ocorreu devido a um aumento no volume corrente (VC, $7 \pm 0,6$ ml/kg, vs. normovolêmico: $5 \pm 0,4$ ml/kg, figura 4A) sem alterar a frequência respiratória (fR, 99 ± 8 cpm, vs. normovolêmico: 85 ± 6 com, figura 4B). Após a ingestão de água e NaCl 0,3 M, os parâmetros cardiovasculares, dos ratos repletos, não foram modificados (PAM, 102 ± 2 mmHg, vs. normovolêmico: 105 ± 4 mmHg, figura 3A) e a FC (338 ± 15 bpm, vs. normovolêmico: 379 ± 13 bpm, figura 3B). A VE não retornou aos níveis normais (640 ± 33 ml/min/kg, vs. normovolêmico: 478 ± 60 ml/min/kg, figura 4C), pois o VC continuou elevado ($6,6 \pm 0,5$ ml/kg, vs. normovolêmico: $5 \pm 0,4$ ml/kg, figura 4A) sem alterar a fR (98 ± 8 cpm, vs. normovolêmico: 85 ± 6 com, figura 4B).

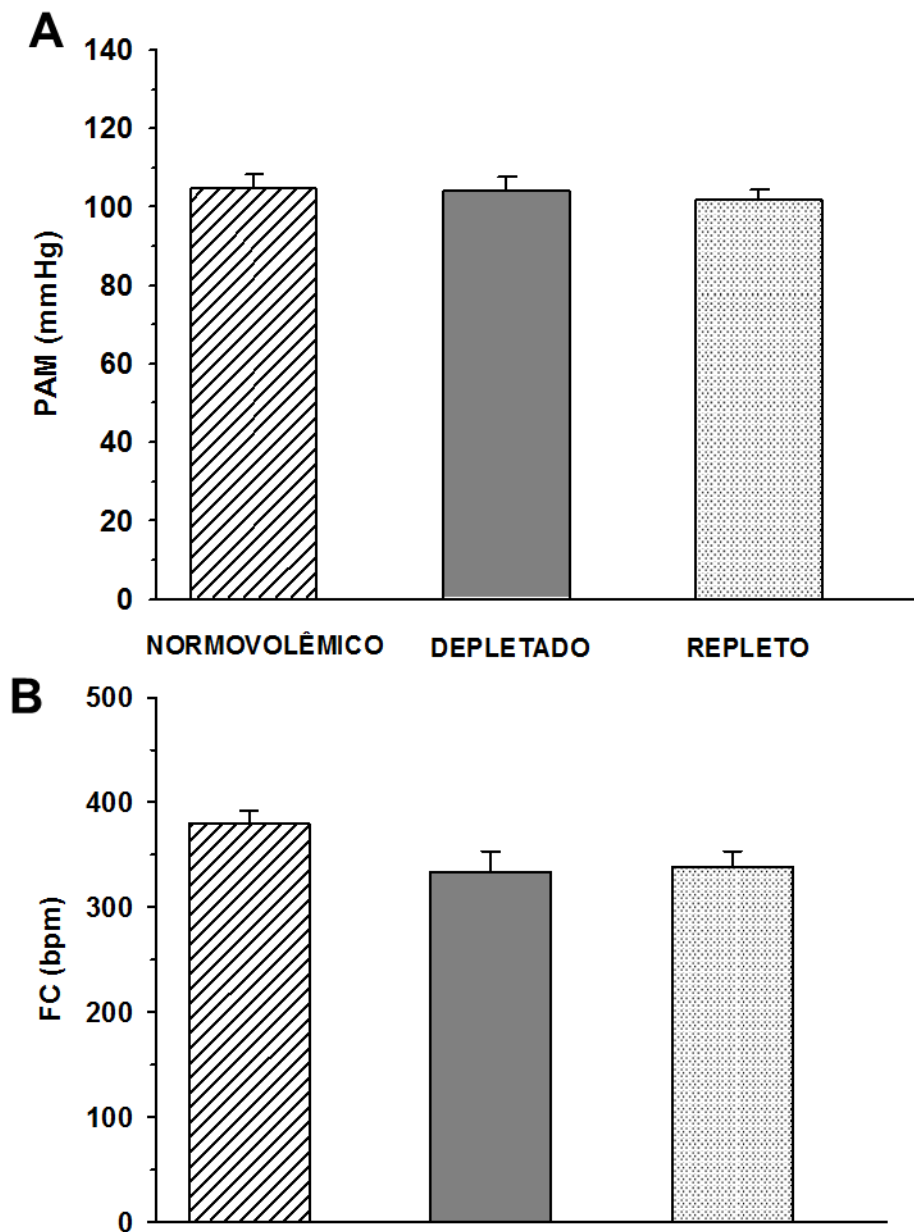


Figura 3: Pressão arterial média (PAM, mmHg, painel A) e frequência cardíaca (FC, bpm, painel B) basais em ratos normovolêmicos, depletados e repletos de sódio. Resultados expressos como média \pm EPM. n = 9.

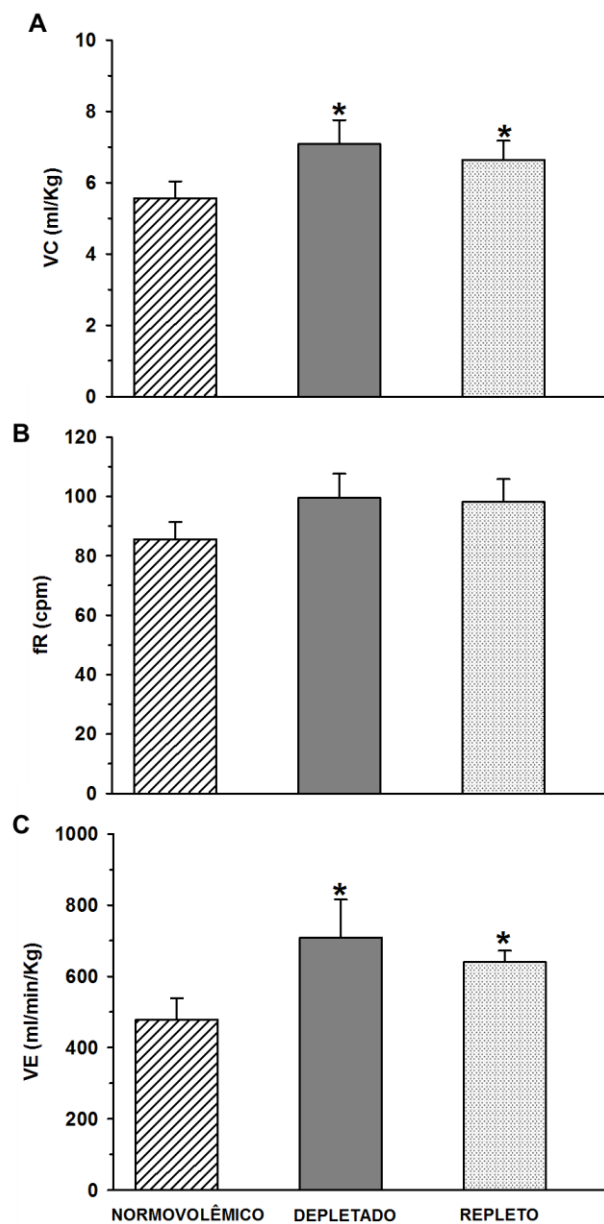


Figura 4: Volume corrente (VC, ml/Kg, painel A), frequência respiratória (fR, cpm, painel B) e ventilação (VE, ml/min/Kg, painel C) basais em ratos normovolêmicos, depletados e repletos de sódio. Resultados expressos como média \pm EPM. n = 9. * diferente do normovolêmico.

5.3 Efeitos da depleção de sódio sobre as respostas cardiorrespiratórias após a ativação dos receptores glutamatérgicos e purinérgicos no NTS de ratos não anestesiados.

Injeções unilaterais de L-glutamato (1 e 5 nmol/100 nl) no NTS produziram resposta pressora (17 ± 3 e 36 ± 3 mmHg, respectivamente, vs. salina: 3 ± 1 mmHg, figura 5A), bradicardia (-130 ± 15 e -169 ± 10 bpm, respectivamente, vs. salina: -13 ± 6 bpm, figura 5B) e hiperventilação (233 ± 44 e 495 ± 114 ml/min/kg, respectivamente, vs. salina: 32 ± 26 ml/min/kg, figura 6C). A depleção de sódio reduziu a resposta pressora de L-glutamato (1,0 e 5,0 nmol/100 nl) injetado no NTS (4 ± 3 e 13 ± 4 mmHg, respectivamente, figura 5A) e a hiperventilação (-112 ± 112 e 7 ± 115 ml/min/kg, respectivamente, figura 6C) e não modificou a bradicardia (-116 ± 30 e -156 ± 18 bpm, respectivamente, figura 5B). Em ratos repletos, a resposta pressora de L-glutamato (1 e 5 nmol/100 nl) injetado no NTS (8 ± 2 e 25 ± 4 mmHg, respectivamente, figura 5A) e a hiperventilação (73 ± 78 e 163 ± 75 ml/min/kg, respectivamente, figura 6C) permaneceram reduzidas, porém a bradicardia não foi alterada (-139 ± 16 e -163 ± 15 bpm, respectivamente, figura 5B).

Injeções unilaterais de α,β -metil ATP (2 nmol/100 nl) no NTS também produziram resposta pressora (36 ± 5 mmHg, vs. salina: 3 ± 1 mmHg, figura 5A), bradicardia (-194 ± 18 bpm, vs. salina: -13 ± 6 bpm, figura 5B) e não modificou a VE (54 ± 96 ml/min/kg, vs. salina: 32 ± 26 ml/min/kg, figura 6C). A depleção de sódio reduziu a resposta pressora (24 ± 5 mmHg, figura 5A) e não modificou a VE (-147 ± 184 ml/min/kg, figura 6C) e a bradicardia (-168 ± 22 bpm, figura 5B). Nos ratos repletos, a resposta pressora (21 ± 5 mmHg, figura 5A) permaneceu reduzida, a bradicardia não foi alterada (-171 ± 13 bpm, figura 5B) e ocorreu uma redução na VE (-105 ± 114 ml/min/kg, figura 6C).

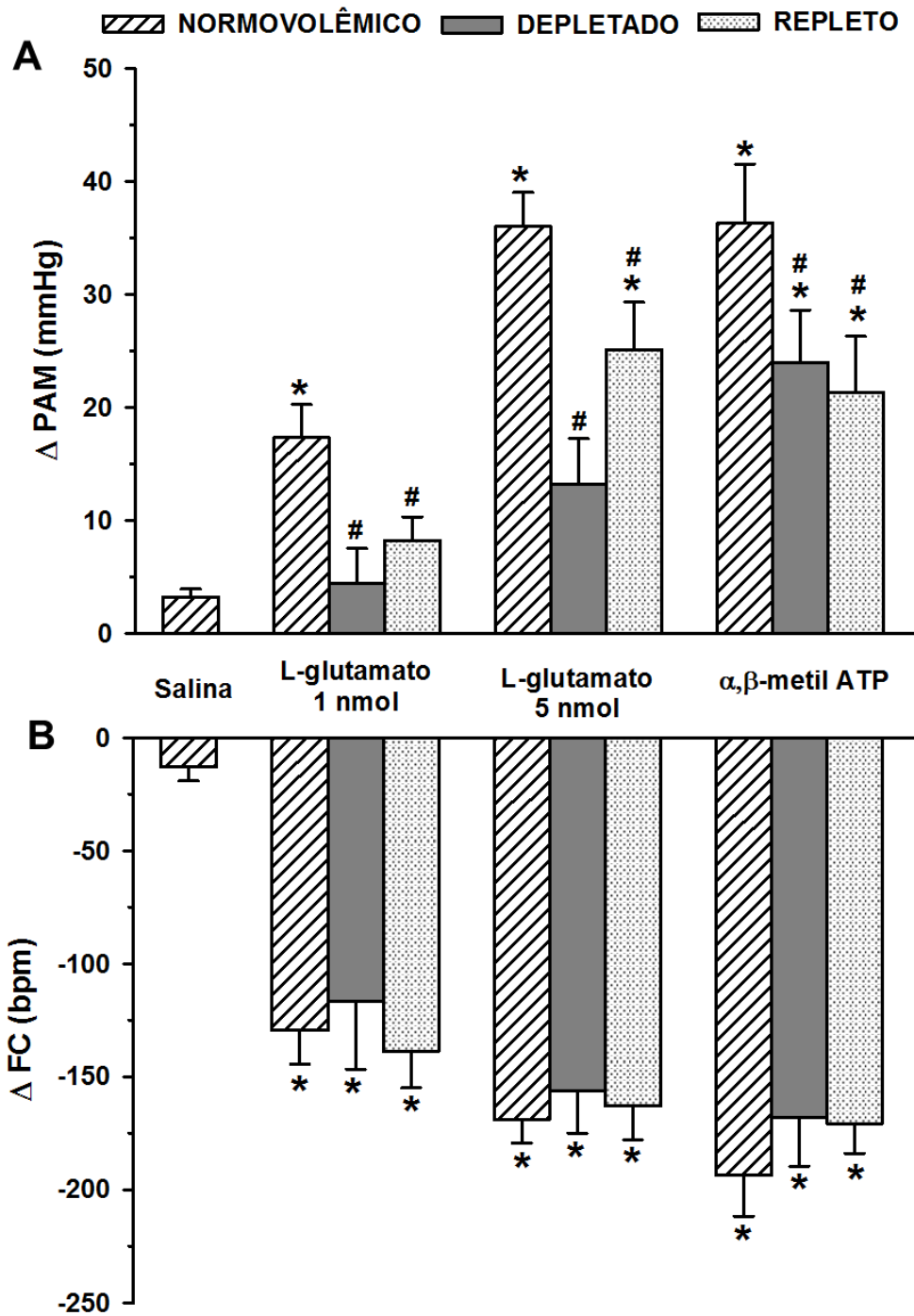


Figura 5: Variações da pressão arterial média (PAM, mmHg, painel A) e frequência cardíaca basal (FC, bpm, painel B) em resposta à injeção unilateral de salina, L-glutamato (1 e 5 nmol/100 nl) e α,β -metil ATP (2 nmol/100 nl) em ratos normovolêmicos, depletados e repletos de sódio. Resultados expressos como média \pm EPM. n = 9. * diferente de salina, # diferente do normovolêmico.

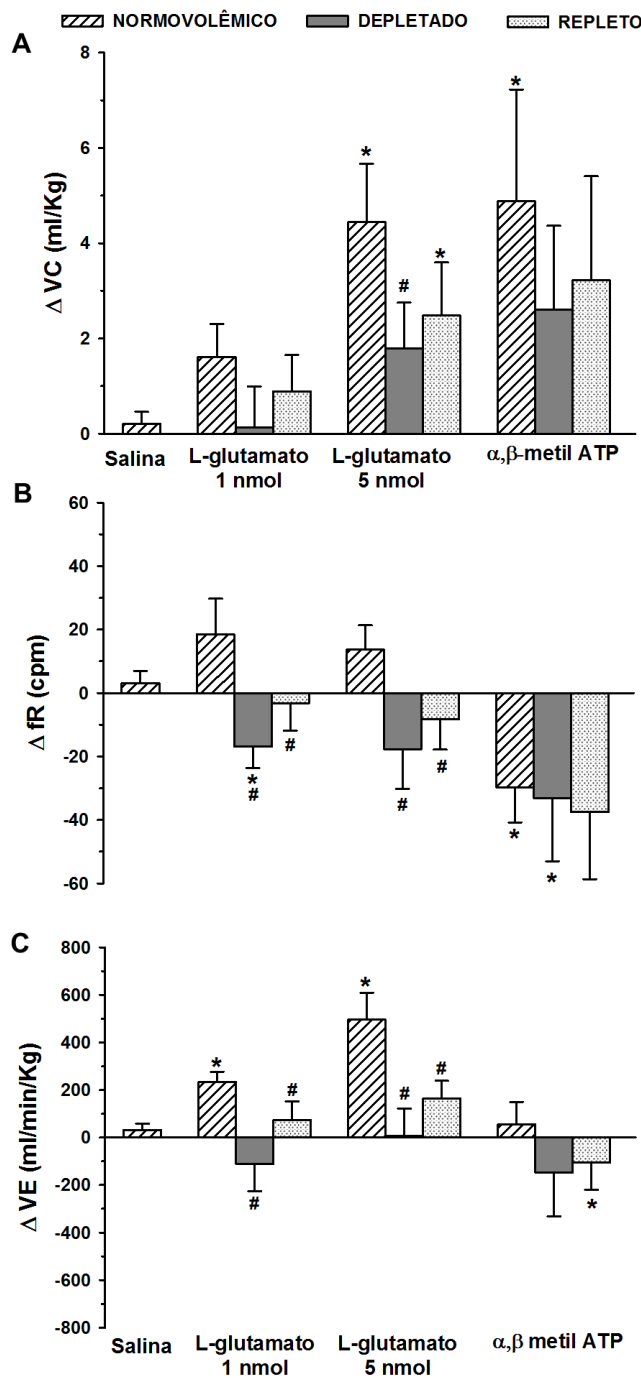


Figura 6: Variações do volume corrente (ΔVC , ml/Kg, painel A), frequência respiratória (ΔfR , cpm, painel B) e ventilação (VE, ml/min/Kg, painel C) em resposta à injeção unilateral de salina, L-glutamato (1 e 5 nmol/100 nl) e α,β -metil ATP (2 nmol/100 nl) em ratos normovolêmicos, depletados e repletos de sódio. Resultados expressos como média \pm EPM. n = 9. * diferente de salina, # diferente do normovolêmico.

5.4 Ingestão cumulativa de água e sódio após a depleção de sódio

A ingestão cumulativa de água e NaCl 0,3 M foi realizada para restabelecer o balanço de sódio após a depleção de sódio com furosemida (tabela 1).

Tabela 1. Ingestão cumulativa de água e NaCl 0,3 M por 2 h, para restabelecer o balanço de sódio após a depleção de sódio com furosemida.

	Tempo			
	30	60	90	120 (min)
NaCl 0,3 M	0,3 ± 0,3	4,0 ± 1,7	8,6 ± 2,2	15,2 ± 3,0 (ml)
Água	0,1 ± 0,08	0,9 ± 0,3	2,7 ± 0,9	5,8 ± 0,8 (ml)

Valores expressos pela média ± EPM. n = 09 ratos/grupo.

5.5 Concentrações plasmáticas de sódio, potássio, proteínas totais e osmolaridade

A depleção de sódio induziu uma diminuição da concentração plasmática de sódio e potássio comparada com o estado normovolêmico ($140 \pm 1,3$ e $3,4 \pm 0,1$ meq/l, vs. normovolêmico: $145 \pm 1,4$ e $4 \pm 0,3$ meq/l, respectivamente) e aumentou a concentração plasmática de proteínas totais ($7,1 \pm 0,1$ g/ml, vs. normovolêmico: $6,2 \pm 0,2$ g/ml). Os ratos repletos de sódio restabeleceram a concentração plasmática de sódio ($146 \pm 1,2$ meq/l) e proteínas totais ($5,8 \pm 0,1$ g/ml) mas não restaurou a concentração plasmática de potássio ($3,2 \pm 0,1$ meq/l). Em relação à osmolaridade, a depleção de sódio não promoveu alterações significativas comparado com o estado normovolêmico ($290 \pm 2,8$ mOsm/Kg, vs. normovolêmico: $291 \pm 4,2$ mOsm/Kg). A osmolaridade também não foi alterada nos ratos repletos de sódio ($300 \pm 3,4$ mOsm/Kg) (tabela 2).

Tabela 2. Concentração plasmática de sódio (P_{Na^+}), potássio (P_{K^+}), proteínas totais (Pt) e osmolaridade (P_{Osm}) de ratos normovolêmicos, depletados e repletos de sódio.

	Normovolêmicos	Depletados	Repletos
P_{Na^+}	145 ± 1,4	140 ± 1,3*	146 ± 1,2 (meq/l)
P_{K^+}	4,0 ± 0,3	3,4 ± 0,1*	3,2 ± 0,1* (meq/l)
Pt	6,2 ± 0,2	7,1 ± 0,1*	5,8 ± 0,1 (g/100 ml)
P_{Osm}	291 ± 4,2	290 ± 2,8	300 ± 3,4 (mOsm/Kg)

Valores expressos pela média ± EPM, n = 11 ratos/grupo. * diferente do normovolêmico;

5.6 Efeito da injeção unilateral de L-glutamato em áreas adjacentes ao NTS nas respostas cardiovasculares

A especificidade do NTS como local de ação do L-glutamato foi confirmada pelos resultados obtidos em ratos que receberam injeções de L-glutamato em áreas fora do NTS. A injeção unilateral de L-glutamato (1 e 5 nmol/100 nl) em áreas adjacentes (fora) ao NTS não produziu alterações na PAM ($3,5 \pm 1,4$ e $5,6 \pm 1,2$ mmHg, respectivamente, vs. salina $3,0 \pm 0,6$ mmHg, n=6) e FC ($-8,2 \pm 1,9$ e $-9,6 \pm 2,5$ mmHg, respectivamente, vs. salina $-7,7 \pm 1,3$ mmHg, n=6). As injeções unilaterais fora do NTS foram localizadas principalmente em porções laterais, ventrais ou dorsais ao NTS (figura 2).

5.7 Efeito da prévia injeção de suramin no NTS sobre as respostas cardiorespiratórias promovidas pela injeção de α,β -metil ATP no NTS de ratos normovolêmicos

A figura 7 mostra os resultados de variações de PAM e FC promovidos pela injeção de α,β -metil ATP (2 nmol/100 nl) antes (controle) e 15, 30, 45 e 60 min após a injeção de suramin (2 nmol/100 nl) no NTS de ratos não anestesiados e normovolêmicos. O painel A da figura 7 mostra que a injeção de α,β -metil ATP (2 nmol/100 nl) no NTS promove resposta pressora e esta resposta foi reduzida aos 15 minutos após a injeção de suramin (2 nmol/100 nl) no NTS ipsilateral (13 ± 2 mmHg, vs. α,β -metil ATP controle: 24 ± 4 mmHg). Aos 30, 45 e 60 min após a injeção de suramin as respostas pressoras estavam de volta ao valor α,β -metil ATP controle (19 ± 5 , 15 ± 3 , 18 ± 3 mmHg, respectivamente). O painel B da figura 7 mostra que a injeção de α,β -metil ATP (2 nmol/100 nl) no NTS promove resposta bradicárdica e esta resposta também foi reduzida aos 15 minutos após a injeção de suramin (2 nmol/100 nl) no NTS ipsilateral (-80 ± 18 bpm, vs. α,β -metil ATP controle: -187 ± 39 bpm). Aos 30, 45 e 60 min após a injeção de suramin as respostas bradicárdicas estavam de volta ao valor α,β -metil ATP controle (-150 ± 32 , -166 ± 38 , -144 ± 40 bpm, respectivamente).

A figura 8 mostra os resultados das variações de VC, fR e VE promovidos pela injeção de α,β -metil ATP (2 nmol/100 nl) antes (controle) e 15, 30, 45 e 60 min após a injeção de suramin (2 nmol/100 nl) no NTS de ratos não anestesiados e normovolêmicos. O painel A da figura 8 mostra que a injeção de α,β -metil ATP controle (2 nmol/100 nl) no NTS promove um pequeno aumento do VC (2 ± 1 ml/Kg) e esta resposta foi reduzida aos 15, 30, 45 e 60 min após a injeção de suramin no NTS (-2 ± 1 ; -3 ± 1 ; $-1, \pm 1$; -2 ± 1 ml/Kg, respectivamente). O painel B da figura 8 mostra que a injeção de α,β -metil ATP controle (2 nmol/100 nl) no NTS promove uma pequena queda na fR (-7 ± 1 cpm) e esta resposta foi potenciada aos 15, 30, 45 e 60 min após a injeção de suramin no NTS (43 ± 9 ; 33 ± 9 ; 23 ± 9 ; 9 ± 8 cpm, respectivamente). Como ocorreu diminuição do VC e aumento da fR, não observamos alterações significativas na VE após a injeção de α,β -metil ATP no NTS.

Em relação aos efeitos do suramin (2 nmol/100 nl), injetado unilateralmente no NTS, sobre os valores basais de PAM e FC, podemos observar na figura 9 painel A que o bloqueio dos receptores purinérgicos P2 não promoveu alterações nos valores de PAM basais aos 15, 30, 45 e 60 minutos (121 ± 5 , 116 ± 5 , 115 ± 5 e 117 ± 6 mmHg, respectivamente) quando comparadas com a PAM controle (113 ± 3 mmHg). A injeção unilateral de suramin também não alterou os valores de FC basais aos 15 e 30 min (346 ± 12 e 351 ± 13 bpm vs. controle: 381 ± 15), porém FC basais foram diminuídas nos tempos 45 e 60 minutos (327 ± 12 e 332 ± 13 bpm, respectivamente, figura 9, painel B). A figura 10 mostra os efeitos do suramin injetado unilateralmente no NTS, sobre os valores basais de VC, fR e VE. Podemos observar na figura 10 painel A que o bloqueio dos receptores purinérgicos P2 não promoveu alterações nos valores de VC basais aos 15, 30, 45 e 60 minutos ($4,9 \pm 0,6$; $4,6 \pm 1,2$; $6,1 \pm 0,8$; e $4,9 \pm 1,1$ ml/kg, respectivamente) quando comparadas com VC controle ($5,5 \pm 0,9$ ml/kg). Por outro lado, a injeção unilateral de suramin no NTS promoveu aumento da fR basal nos tempos 15 e 30 minutos (119 ± 7 e 108 ± 5 cpm, respectivamente) e aos 45 e 60 minutos após a injeção os valores voltaram aos níveis controle (99 ± 9 e 85 ± 8 com, respectivamente, vs. controle: 76 ± 4 cpm) (figura 10 painel B). Não foram observadas alterações significativas na VE aos 15, 30, 45 e 60 minutos após a injeção de suramin no NTS (602 ± 101 , 517 ± 157 , 600 ± 82 e 412 ± 86 ml/min/kg, respectivamente) quando comparadas com a VE controle (560 ± 79 ml/min/kg) (figura 10 painel C).

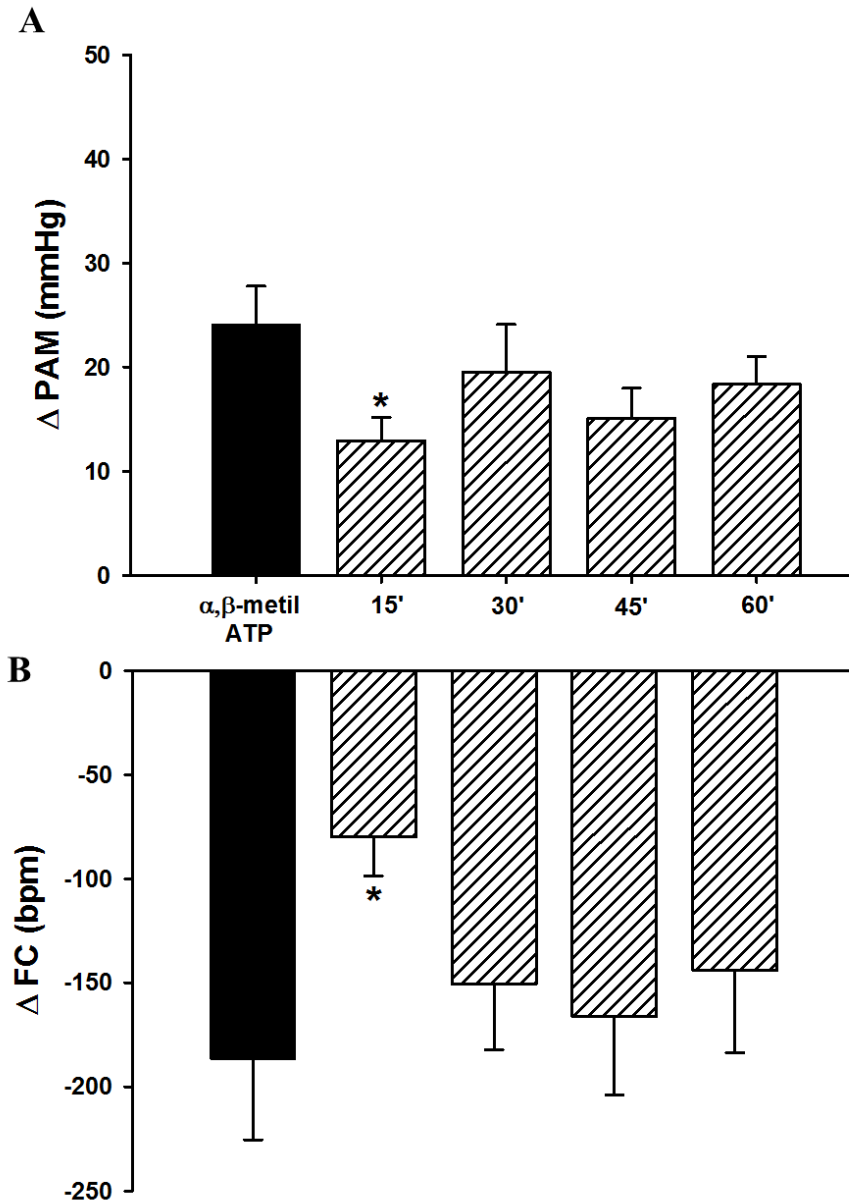


Figura 7: Variações da pressão arterial média (Δ PAM, mmHg, painel A) e frequência cardíaca (Δ FC, bpm, painel B) em resposta à injeção α,β -metil ATP (2 nmol/100 nl) antes (controle, barras pretas) e 15, 30, 45 e 60 min após (barras hachurradas) a injeção de suramin (2 nmol/100 nl) no NTS de ratos não anestesiados e normovolêmicos. Resultados expressos como média \pm EPM, n = 7. * diferente do α,β -metil ATP antes da injeção de suramin.

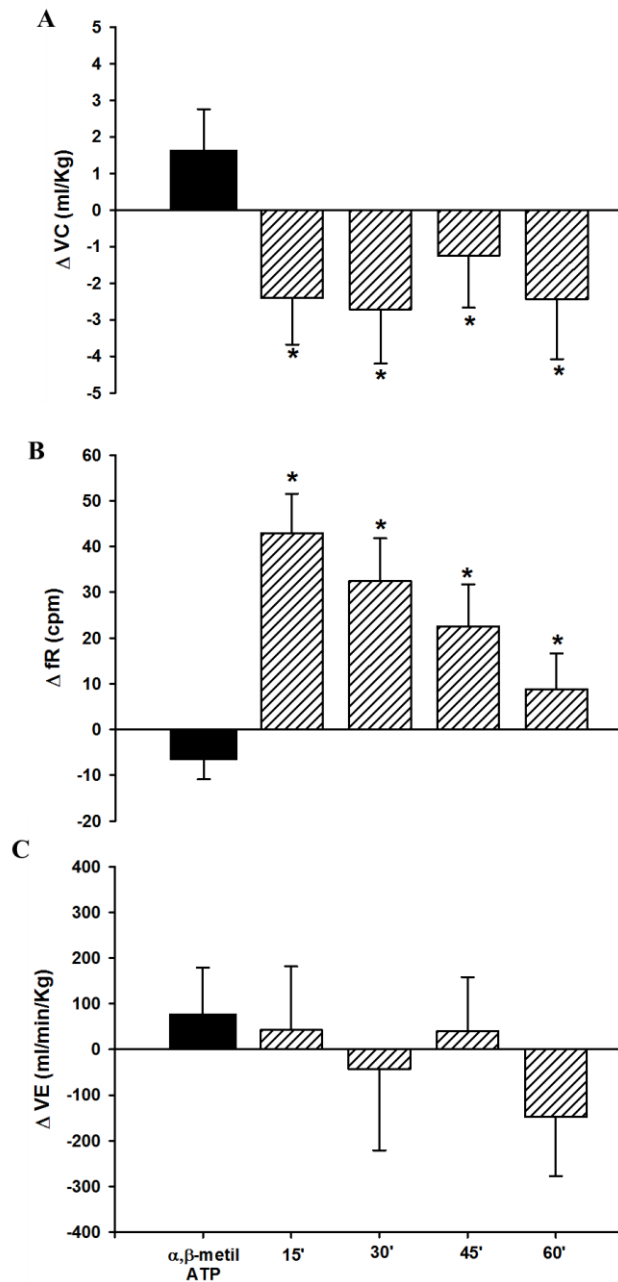


Figura 8: Variações do volume corrente (ΔVC , ml/Kg, painel A), frequência respiratória (ΔfR , cpm, painel B) e ventilação (ΔVE , ml/min/Kg, painel C) em resposta à injeção α,β -metil ATP (2 nmol/100 nl) antes (controle, barras pretas) e 15, 30, 45 e 60 min após (barras hachurradas) após a injeção de suramin (2 nmol/100 nl) no NTS de ratos não anestesiados e normovolêmicos. Resultados expressos como média \pm EPM, n = 7. * diferente do α,β -metil ATP antes da injeção de suramin.

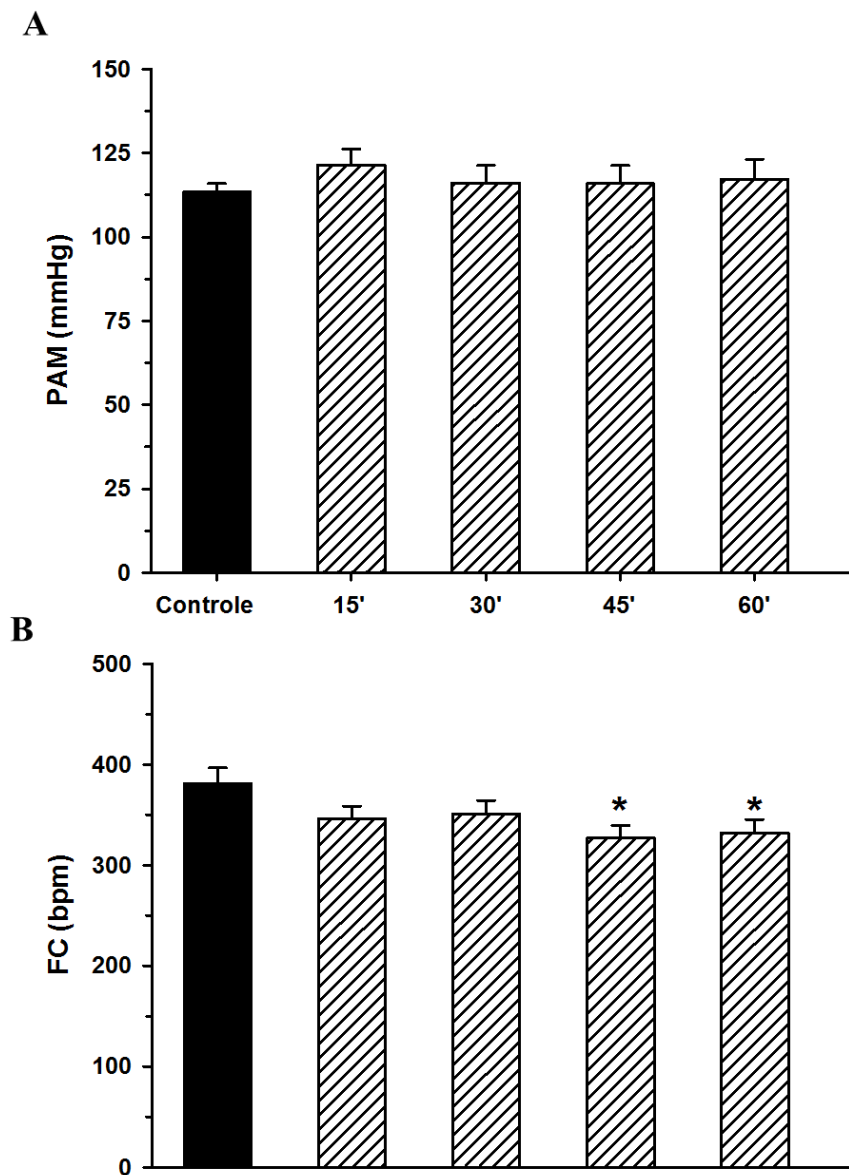


Figura 9: Pressão arterial média (PAM, mmHg, painel A) e frequência cardíaca (FC, bpm, painel B) basais antes (controle) e aos 15, 30, 45 e 60 minutos após a injeção unilateral de suramin (2 nmol/100 nl) no NTS de ratos não anestesiados. Resultados expressos como média \pm EPM, n=7. * diferente do controle.

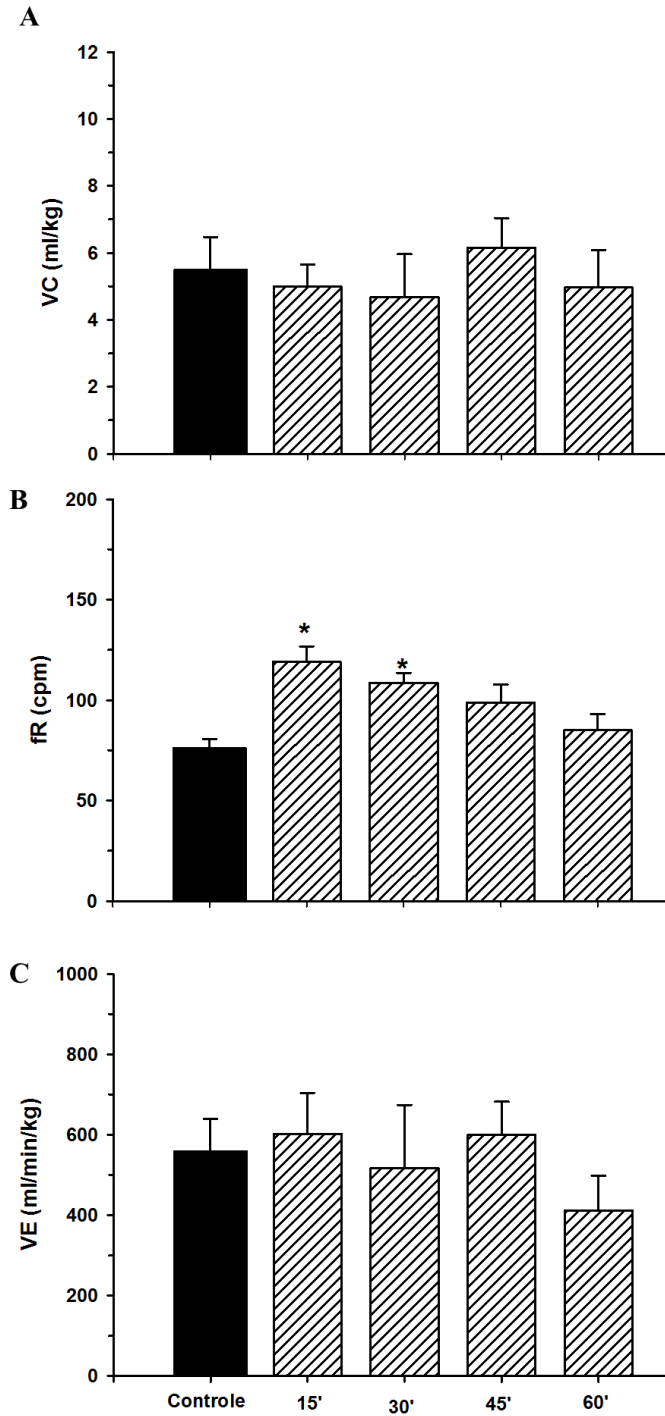


Figura 10: Volume corrente (VC, ml/kg, painel A), frequência respiratória (fR, cpm, painel B) e ventilação (VE, ml/min/kg, painel C) basais antes (controle) e aos 15, 30, 45 e 60 minutos após a injeção unilateral de suramin (2 nmol/100 nl) no NTS de ratos não anestesiados. Resultados expressos como média \pm EPM, n=7. * diferente do controle.

5.8 Efeitos do bloqueio autonômico sobre as respostas cardiovasculares promovidas pela injeção de α,β -metil ATP no NTS de ratos não anestesiados

A figura 11 apresenta traçados de um rato representativo do grupo, mostrando os efeitos cardiovasculares promovidos pela injeção unilateral de α,β -metil ATP (2 nmol/100 nl) no NTS antes (controle) e aos 5 e 60 minutos após a injeção i.v. de prazosin (1 mg/Kg de peso corporal). Na figura 12 estão apresentados os resultados de variações da PAM e FC promovidas pela injeção unilateral de α,β -metil ATP (2 nmol/100 nl) no NTS antes e aos 5 e 60 minutos após a injeção i.v. de prazosin (1 mg/Kg de peso corporal) em ratos não anestesiados. Injeção unilateral de α,β -metil ATP no NTS produziu uma resposta pressora ($+32 \pm 5$ mmHg, vs. salina $+2 \pm 1$ mmHg, figura 12, painel A), com um pico pressor 25 segundos após a injeção, e bradicardia (-183 ± 21 bpm, vs. salina $+2 \pm 1$ bpm, figura 12, painel B). O pré-tratamento com o antagonista adrenérgico, prazosin, atenua a resposta pressora aos 5 e 60 min ($+10 \pm 3$ e $+26 \pm 3$ mmHg, respectivamente, figura 12, painel A) sem alterar a bradicardia (-191 ± 21 e -197 ± 24 bpm, respectivamente, figura 12, painel B) produzidas pela injeção unilateral de α,β -metil ATP no NTS.

A figura 13 apresenta traçados de um rato representativo do grupo, mostrando os efeitos cardiovasculares promovidos pela injeção unilateral de α,β -metil ATP (2 nmol/100 nl) no NTS antes (controle) e aos 5 e 60 minutos após a injeção i.v. de metil-atropina (1mg/Kg de peso corporal). Na figura 14 estão apresentados os resultados de variações da PAM e FC promovidas pela injeção unilateral de α,β -metil ATP (2 nmol/100 nl) no NTS antes e aos 5 e 60 minutos após a injeção i.v. de metil-atropina (1 mg/Kg de peso corporal) em ratos não anestesiados. Injeção unilateral de α,β -metil ATP no NTS produziu uma resposta pressora ($+35 \pm 6$ mmHg, vs. salina $+2 \pm 1$ mmHg, figura 14, painel A), com um pico pressor 25 segundos após a injeção, e bradicardia (-197 ± 11 bpm, vs. salina -19 ± 14 bpm, figura 14, painel B). O pré-tratamento com o antagonista colinérgico muscarínico, metil-atropina, não alterou a resposta pressora aos 5 e 60 min ($+31 \pm 6$ e $+28 \pm 7$ mmHg, respectivamente, figura 14, painel A) e aboliu a bradicardia ($+21 \pm 6$ e $+11 \pm 5$ bpm, respectivamente, figura 14, painel B) produzidas pela injeção unilateral de α,β -metil ATP no NTS.

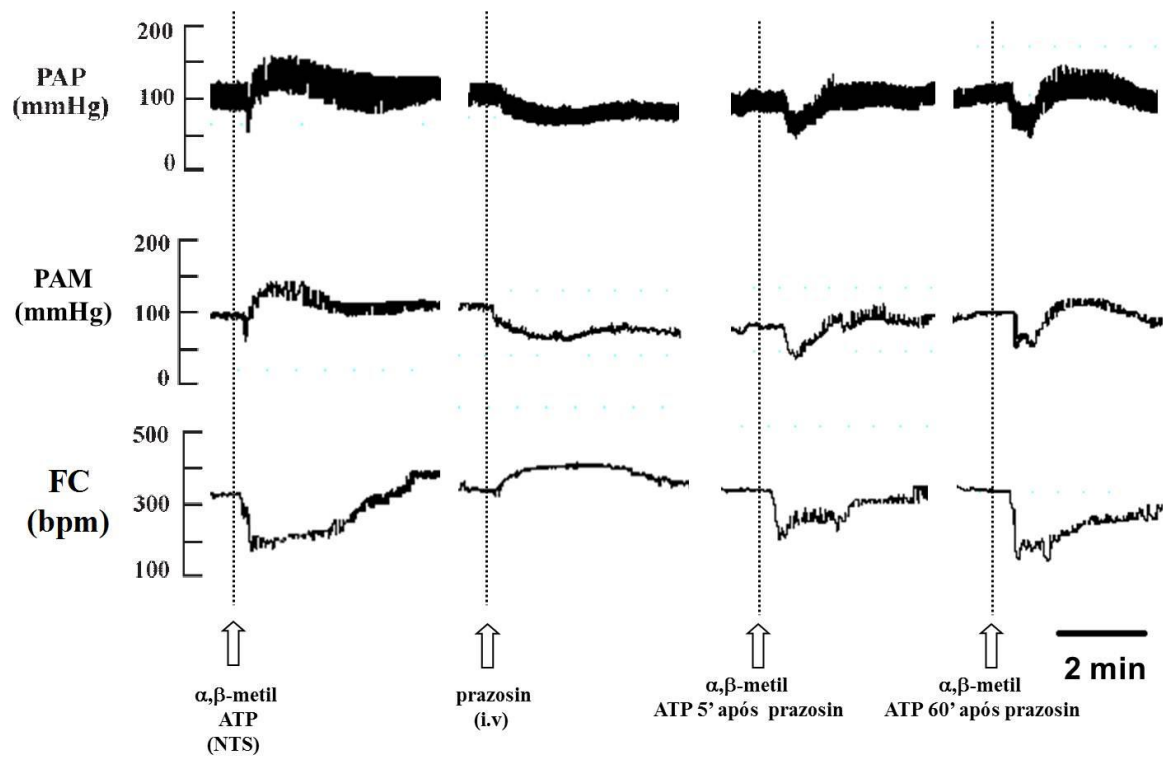


Figura 11: Traçado de um rato representativo do grupo mostrando as alterações de pressão arterial pulsátil (PAP, mmHg), pressão arterial média (PAM, mmHg) e frequência cardíaca (FC, bpm) promovidos pela injeção unilateral de α, β -metil ATP (2 nmol/100 nl) no NTS antes e aos 5 e 60 minutos após a injeção de prazosin (1mg/Kg de peso corporal, i.v).

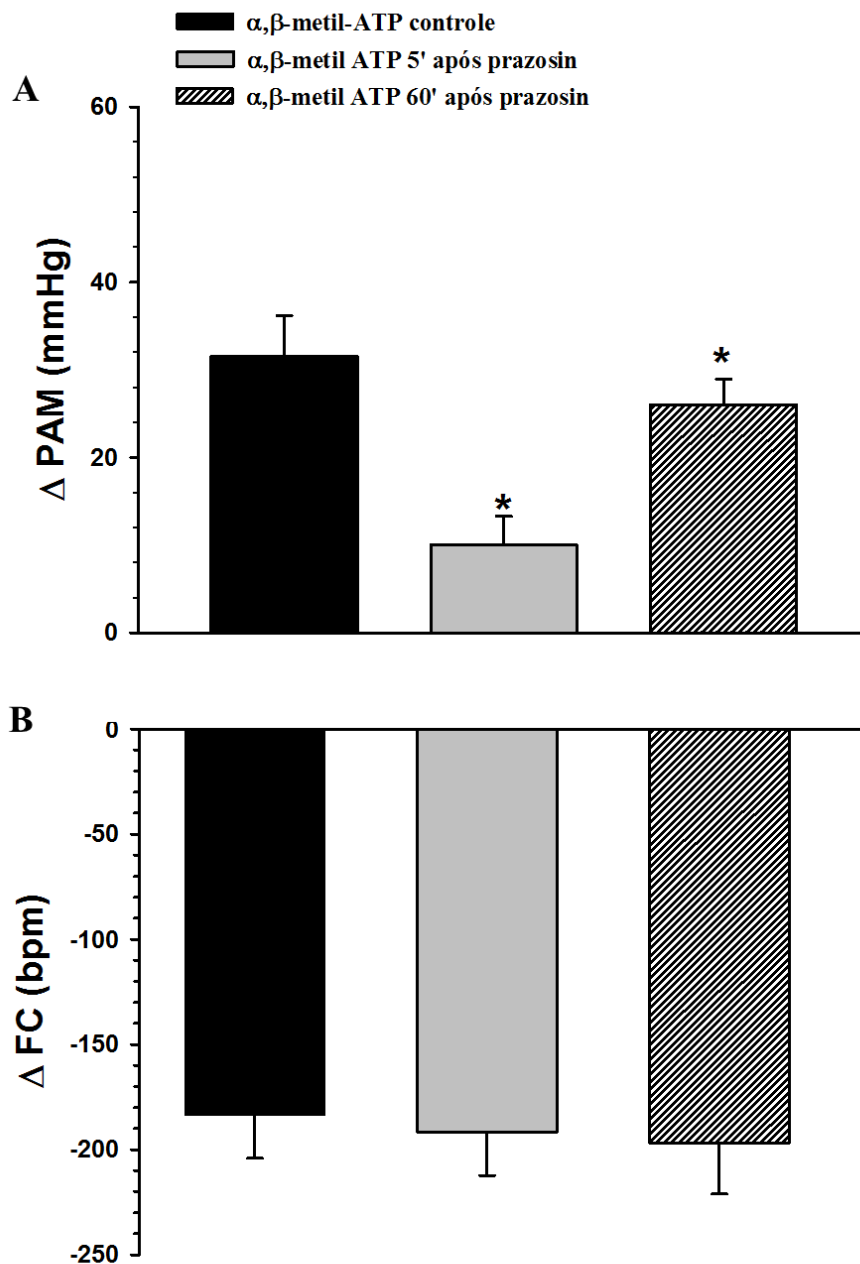


Figura 12: Variações na pressão arterial média (Δ PAM, mmHg, painel A) e frequência cardíaca (Δ FC, bpm, painel B) promovidas pela injeção unilateral de α,β -metil ATP (2 nmol/100 nl) no NTS antes e aos 5 e 60 minutos após a injeção de prazosin (1mg/Kg de peso corporal, i.v). Resultados expressos como média \pm EPM. n = 8. * diferente de α,β -metil ATP controle.

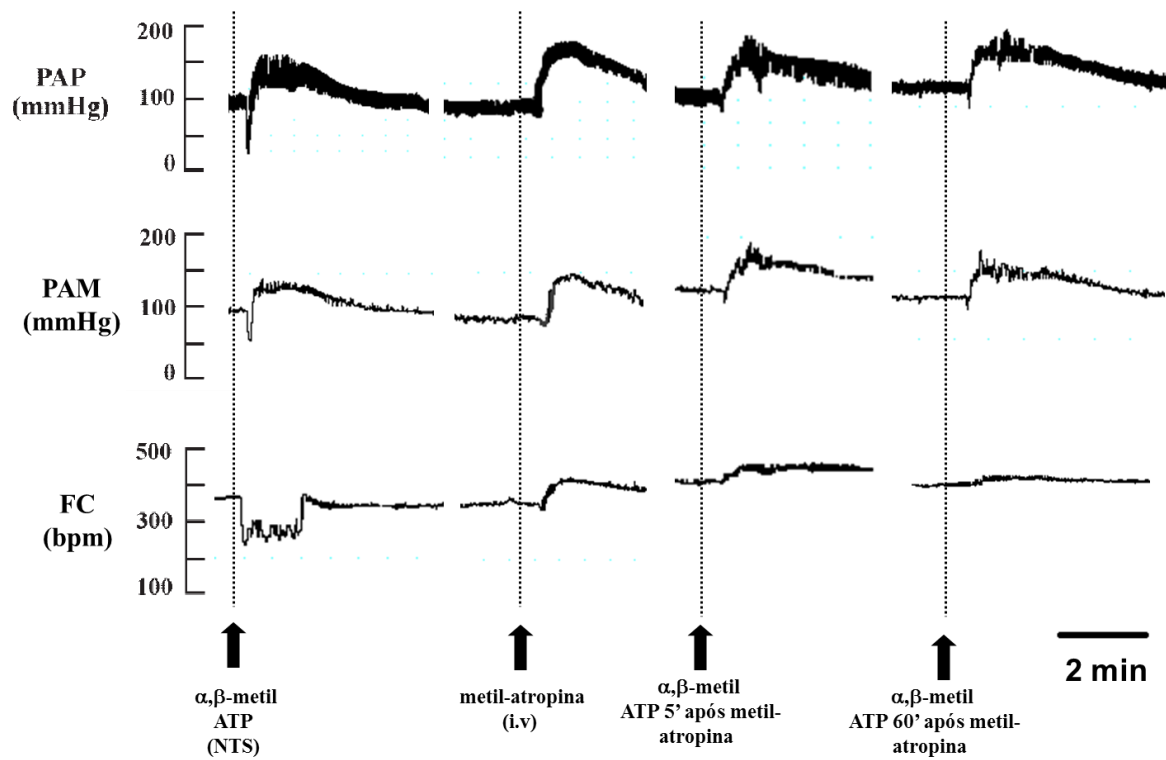


Figura 13: Traçado de um rato representativo do grupo mostrando as alterações de pressão arterial pulsátil (PAP, mmHg), pressão arterial média (PAM, mmHg) e frequência cardíaca (FC, bpm) promovidos pela injeção unilateral de α, β -metil ATP (2 nmol/100 nl) no NTS antes e aos 5 e 60 minutos após a injeção de metil-atropina (i.v).

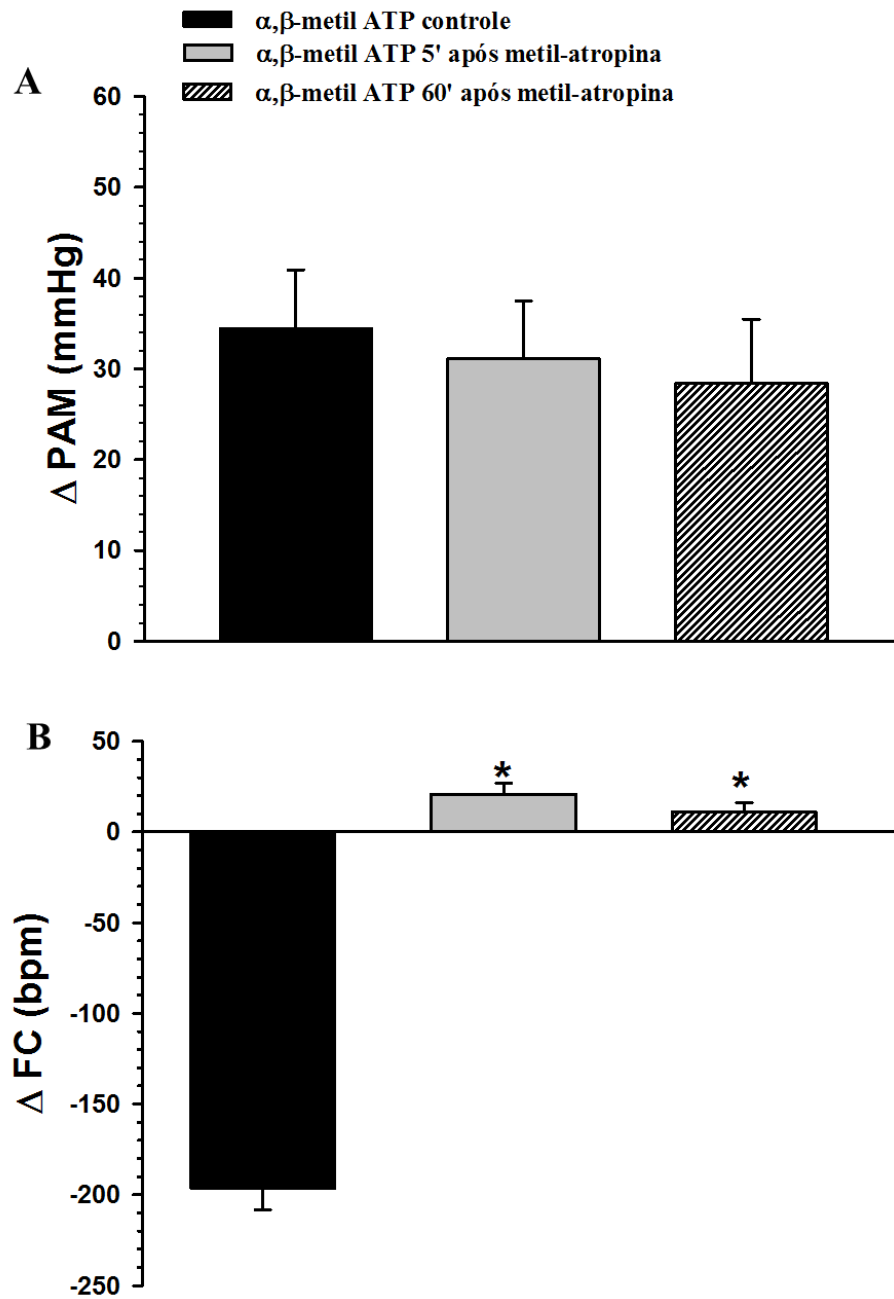


Figura 14: Variações na pressão arterial média (Δ PAM, mmHg) e frequência cardíaca (Δ FC, bpm) promovidas pela injeção unilateral de α,β -metil ATP (2 nmol/100 nl) no NTS antes e aos 5 e 60 minutos após a injeção de metil-atropina (1mg/Kg de peso corporal, i.v). Resultados expressos como média \pm EPM. n = 8. * diferente de α,β -metil ATP controle.

6 Discussão

Nosso estudo foi o primeiro a estudar as respostas cardiorrespiratórias basais promovidas pela depleção de sódio induzida por uma injeção s.c. do diurético/saliurético furosemida seguido por 24 h de dieta deficiente em sódio. Os resultados mostraram que a PAM e FC não foram alteradas durante este modelo de depleção de sódio em ratos não anestesiados. A PAM e FC também não foram alteradas nos ratos repletos de sódio (após duas horas de ingestão de sódio hipertônico e água). No entanto, este modelo de depleção de sódio promoveu um aumento na VE, e esta hiperventilação foi devida a um aumento no volume corrente sem alterar a frequência respiratória. Nos ratos repletos de sódio, a VE não retornou aos níveis normais, pois o VC continuou elevado, sem alterar a fR.

A furosemida é um diurético de alça e esta classificação de diuréticos é devido ao seu mecanismo de ação, onde atua bloqueando o co-transportador tri-iônico de íons Na^+ , K^+ , 2Cl^- no ramo grosso ascendente da alça de Henle do néfron, cessando então a reabsorção destes íons, que ficarão na luz tubular para serem excretados. Esta porção do néfron tem como característica principal ser impermeável à água, desta forma a água também ficará na luz tubular para ser excretada, levando a uma natriurese e diurese devido ao aumento do volume urinário excretado (Weiner, 1990). O excesso ou a falta de água e sódio no organismo modifica a atividade de vários hormônios (por exemplo, angiotensina-aldosterona, peptídeo natriurético atrial, vasopressina) e sistemas neurais (por exemplo a atividade simpática), que atuam promovendo o restabelecimento do balanço hidro-eletrolítico (Menani e cols., 2004). Estudos da literatura (Lynn e cols., 1980; Salgado e cols., 1985) mostraram que a depleção de sódio com furosemida promove diminuição da PAM, devido a uma diminuição do débito cardíaco, alterações nas funções cardíacas [diminuição da capacidade de ejeção pelo ventrículo esquerdo (Lynn e cols., 1980) e débito cardíaco reduzido em 35% (Salgado e cols, 1985)], aumento na resistência periférica total e não modifica a FC. No entanto, nestes estudos o modelo para depleção de sódio consistiu em 2 ou 3 injeções intraperitoneais (i.p.) de furosemida (10 mg/kg) seguido de uma dieta baixa em sódio por 6 dias. Os parâmetros respiratórios não foram mensurados nestes estudos.

Além destes efeitos, a depleção de sódio produzida pelo uso de diuréticos (furosemida) pode também ocasionar uma alcalose metabólica devido a uma retenção de

bicarbonato. Esta alcalose metabólica resultaria em uma compensação respiratória, ocasionando uma hipoventilação nos ratos, de acordo com Weiner (1990). Porém, nossos resultados mostraram uma hiperventilação após a depleção de sódio. Algumas possíveis explicações para esta resposta são: 1) a hiperventilação poderia ser reflexa a hipoventilação ocorrida devido a alcalose metabólica; 2) nossos ratos podem estar em acidose e não em alcalose metabólica como descrito na literatura em outros modelos de depleção de sódio; 3) nossos ratos, após a depleção de sódio, podem estar com uma pressão parcial de oxigênio sanguíneo (PO_2) baixa, o que levaria a uma ativação de quimiorreceptores periféricos e conseqüentemente a uma hiperventilação. Desta forma, mais experimentos serão necessários para esclarecer este achado.

Nossos resultados também mostraram que a depleção de sódio reduziu as respostas pressoras produzidas pelas injeções de L-glutamato e α,β -metil ATP no NTS de ratos não anestesiados. A depleção de sódio também reduziu a hiperventilação produzida pela injeção de L-glutamato no NTS, sugerindo que as mudanças neuroendócrinas após a depleção de sódio modificam as respostas cardiorrespiratórias produzidas pela ativação dos receptores glutamatérgicos e purinérgicos do NTS. Vários estudos têm demonstrado que a depleção de sódio reduz a reatividade vascular periférica a ANG II e a NOR (Thurston e Laragh, 1975; Salgado e cols., 1986, Armsworth e cols., 1986, Gerkens e cols., 1987), pois a concentração de ANG II circulante está aumentada neste modelo. Adicionalmente, Colombari e cols. (1992) mostraram que a depleção de sódio prejudica a resposta pressora da ANG II e NOR injetadas periféricamente, mas a resposta pressora à injeção periférica de vasopressina não foi alterada. Este trabalho (Colombari e cols., 1992) também mostrou que a depleção de sódio diminuiu a resposta pressora à injeção central de ANG II, NOR e carbacol, sugerindo que a depleção de sódio diminuiu não somente as respostas pressoras induzidas por injeções periféricas de agentes vasoativos, como também diminuiu as respostas pressoras induzidas por injeções centrais, sendo estas respostas mediadas por ativação simpática e/ou ANG II. Nossos resultados corroboram com este estudo, mostrando que as respostas pressoras produzidas pela injeção de L-glutamato e α,β -metil ATP no NTS estão diminuídas em ratos depletados de sódio. Esses resultados sugerem que as alterações neuroendócrinas (elevado nível de ANG II e aldosterona circulantes e a desativação de

receptores de volume e barorreceptores) durante a depleção de sódio alteram as neurotransmissões glutamatérgicas e purinérgicas no NTS.

Uma outra possibilidade para explicar nossos achados está baseada em estudos de nosso laboratório (Vieira e cols., 2004; Vieira e cols., 2006, Vieira e cols., 2007; Vieira e cols., 2010) que sugeriram que sinais descendentes de diferentes áreas encefálicas, especialmente do prosencéfalo (órgão vascular da lâmina terminal, região pré-óptica, hipotálamo, núcleo pré-óptico mediano), poderiam influenciar a atividade de áreas bulbares [como NTS e área bulbar ventrolateral rostral (RVL)] e as descargas autonômicas para a regulação do sistema cardiovascular. Assim, as alterações neuroendócrinas que ocorrem durante a depleção de sódio, como o aumento da ANG II circulante, ativariam estas áreas prosencefálicas que são ricas em receptores de ANG II e os sinais gerados nestas áreas (provavelmente sinais inibitórios) seriam enviados ao bulbo e poderiam influenciar as respostas pressoras do L-glutamato e α,β -metil ATP no NTS.

Na análise dos parâmetros sanguíneos, os resultados mostraram que as concentrações plasmáticas dos íons sódio e potássio foram diminuídas em ratos depletados de sódio quando comparados com os ratos normovolêmicos. Estes resultados eram esperados, pois o diurético furosemida causa um bloqueio da reabsorção destes íons no ramo grosso ascendente da alça de Henle (Weiner, 1990), fazendo com que estes íons permaneçam na luz tubular, sendo posteriormente excretados (diurese e natriurese). Desta forma, haverá uma menor concentração dos íons sódio e potássio no plasma. Após a ingestão de NaCl 0,3 M e água, ou seja, os ratos repletos de sódio a concentração plasmática de sódio retorna ao valor do estado de normovolemia. A concentração plasmática de potássio não retorna aos níveis de normovolemia, pois não foi oferecido nenhum meio de obtenção de potássio.

Os resultados também mostraram um aumento na concentração plasmática das proteínas totais nos ratos depletados de sódio quando comparados com os ratos normovolêmicos, demonstrando que estes animais depletados possuem um menor volume circulante (hipovolêmicos) sem alteração da osmolaridade. Estes resultados estão de acordo com dados de Jalowiec (1974) onde 2 e 24 h após a injeção de furosemida foi possível verificar uma diminuição dos níveis plasmáticos de sódio e aumento das proteínas totais o que caracteriza o estado de hipovolemia, sem alterações significativas na osmolaridade em

ratos depletados de sódio. Nos ratos repletos de sódio a concentração plasmática de proteínas totais voltam aos valores controle (rato normovolêmico), demonstrando que as 2 h de ingestão de NaCl 0,3 M e água restabelecem a hipovolemia.

Nossos resultados também mostraram que a injeção unilateral de α,β -metil ATP no NTS de ratos não anestesiados e normovolêmicos produz resposta pressora e bradicardia, sem alterar a ventilação, e estas respostas cardiovasculares foram reduzidas após a injeção prévia de suramin (antagonista não-seletivo dos receptores purinérgicos P2), e após 30 min as respostas cardiovasculares retornaram aos valores controle, mostrando a reversibilidade do efeito do antagonista não-seletivo. Estudos de De Paula e cols. (2004) mostraram que o suramin no NTS não foi capaz de bloquear as respostas cardiovasculares após a injeção de ATP no NTS, enquanto o PPADS (antagonista seletivo dos receptores P2X) e o ácido quinurênico (antagonista glutamatérgico ionotrópico inespecífico) injetados no NTS foram capazes de reduzir apenas a resposta bradicárdica após a injeção do ATP no NTS, sugerindo que a resposta bradicárdica após a injeção de ATP no NTS é mediada por receptores purinérgicos e glutamatérgicos. Porém, a resposta pressora ao ATP no NTS é mais complexa e pode envolver a ativação de outros receptores, diferentes dos receptores purinérgicos P2 (bloqueados pelo suramin ou PPADS) e diferentes dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos (bloqueados pelo ácido quinurênico). Como o ATP é rapidamente degradado na fenda sináptica por ecto-nucleotidases a adenosina, talvez a resposta pressora pudesse ser mediada por receptores de adenosina (P1). Por outro lado, o agonista purinérgico P2X, o α,β -metil ATP, utilizado em nossos estudos, é o análogo mais estável do ATP (não é degradado por ecto-nucleotidases) e esta pode ser a razão pela qual o suramin foi capaz de atenuar as respostas cardiovasculares (resposta pressora e bradicardia) promovidas pela ativação dos receptores P2X (com α,β -metil ATP) e não foi capaz de afetar as respostas cardiovasculares após ativação dos receptores P2X e Y (com ATP) e P1 (após a degradação do ATP em adenosina).

Nosso trabalho também caracterizou os componentes autonômicos envolvidos nas respostas cardiovasculares após a injeção de α,β -metil ATP no NTS de ratos não anestesiados. Nossos resultados mostraram que as respostas pressora e bradicárdica após a injeção de α,β -metil ATP no NTS de ratos não anestesiados ocorre devido a uma ativação simpática e parassimpática de forma independente, pois o tratamento prévio com prazosin

(antagonista alfa-1 adrenérgico) reduziu a resposta pressora, enquanto que a bradicardia permaneceu inalterada, por outro lado, o pré-tratamento com metil-atropina (antagonista colinérgico muscarínico) aboliu a bradicardia sem alterar a pressão arterial.

Estudo de Kitchen e cols. (2001) mostraram em ratos anestesiados que a injeção de α,β -metil ATP no NTS promove hipotensão e bradicardia. Neste estudo os autores mostraram que a hipotensão era devida a uma simpatoinibição, quando a ativação de receptores P2X era realizada com baixas doses do agonista α,β -metil ATP no NTS, porém, com altas doses deste agonista, a hipotensão era devido a uma simpatoinibição e uma queda do débito cardíaco. Estudo de Kitchen e cols. (2006) mostraram em ratos anestesiados que a bradicardia após a injeção de baixas doses do agonista α,β -metil ATP no NTS foi reduzida com a injeção i.v. do antagonista beta-1 adrenérgico, sugerindo que esta bradicardia em animais anestesiados é mediada por uma inibição simpática cardíaca. Porém, após a injeção de altas doses do agonista α,β -metil ATP no NTS, a bradicardia foi atenuada apenas após o duplo bloqueio colinérgico muscarínico (com metil-atropina) e beta-1 adrenérgico, sugerindo que ocorre uma contribuição parassimpática e simpática dependente da extensão de ativação de receptores P2X no NTS.

Está bem estabelecido na literatura (Machado e Bonagamba, 1992, Colombari e cols., 1994) que a anestesia desempenha um papel crítico em termos de padrão de respostas cardiovasculares após as injeções de L-glutamato no NTS. Machado e Bonagamba (1992) mostraram que a injeção de L-glutamato no NTS de ratos não anestesiados promoveu aumento na PAM, enquanto que os mesmos ratos anestesiados, a mesma dose de L-glutamato no NTS promoveu diminuição da PAM. Estes dados estão de acordo com nossos resultados, onde mostramos que a injeção de α,β -metil ATP no NTS em ratos não anestesiados promoveu resposta pressora. Porém, em ratos anestesiados (Kitchen e cols., 2001 e 2006) a injeção de α,β -metil ATP no NTS promoveu resposta hipotensora.

7 Sumário

Nossos resultados mostraram:

1) em ratos não anestesiados e depletados de sódio:

- Aumento da VE basal devido a um aumento do volume corrente e não modificou a PAM e FC basais;
- Redução da resposta pressora e respiratória produzida pela ativação glutamatérgica no NTS;
- Redução da resposta pressora produzida pela ativação purinérgica no NTS;
- Redução das concentrações plasmáticas de sódio e potássio;
- Aumento da concentração plasmática de proteínas totais (hipovolemia), sem alterar a osmolaridade.

2) em ratos não anestesiados e normovolêmicos:

- O pré-tratamento com antagonista purinérgico P2, suramin, atenua as respostas cardiovasculares após a injeção de α,β -metil ATP no NTS;
- A ativação de receptores P2X com a injeção de α,β -metil ATP no NTS ativa simultaneamente sistema nervoso simpático e parassimpático para produzir as respostas pressora e bradicárdica, respectivamente.

8 Conclusão

Os resultados sugerem que alterações na composição e no volume dos líquidos corporais afetam o controle da ventilação basal, bem como as respostas cardiorrespiratórias após a ativação de receptores glutamatérgicos e purinérgicos do NTS. Além disso, a ativação dos receptores purinérgicos P2X no NTS ativa simultaneamente o sistema nervoso simpático e parassimpático para produzir respostas pressora e bradicárdica, respectivamente, sem alterar a ventilação pulmonar.

9 Referências

1. Adachi, A. Projection of the hepatic vagal nerve in the medulla oblongata. *J. Auton. Nerv. Syst.* 1984; 10: 287-293.
2. 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* 2005a; 32:467-472.
3. Armsworth SJ, Gerkens JF, Smith AJ. Furosemide inhibition of sympathetic vasoconstriction in the rat in situ blood perfused mesentery. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 1986; 13:495-503.
4. Barraco R, El-Ridi M, Ergene E, Parizon M, Bradley D. An atlas of the rat subpostremal nucleus tractus solitarius. *Brain Res. Bull* 1991; 29:703–765.
5. Bartlett, D. Jr. e S.M. Tenney. Control of breathing in experimental anemia. *Respir. Physiol.* 1970; 10(3): 384-395.
6. Braga VA, Antunes VR, Machado BH. Autonomic and respiratory responses to microinjection of L-glutamate into the commissural subnucleus of the NTS in the working heart-brainstem preparation of the rat. *Brain Res.* 2006; 1093:150-160.
7. 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 solitarii of awake rats and in the working heart brainstem preparation. *J Physiol.* 2007; 581:1129–1145.
8. Brosnihan KB, Szilagyi JE, Ferrario CM. Effect of chronic sodium depletion on cerebrospinal fluid and plasma catecholamines. *Hypertension.* 1981; 3:233-239.

9. Burnstock G. Do some sympathetic neurones synthesize and release both noradrenaline and acetylcholine? *Prog. Neurobiol.* 1978; 11 (3-4): 205-222.
10. Burnstock G. Purinergic nerves. *Pharmacological Reviews.* 1972; 24 (3): 509-581.
11. Burnstock G. The past, present and future of purine nucleotides as signalling molecules. *Neuropharmacology.* 1997; 36 (9): 1127-1139.
12. Ciriello J, Hochstenbach SL, Roder S. Central projections of baroreceptor and chemoreceptor afferents fibers in the rat, in IRA Barraco ed., *Nucleus of the Solitary Tract: Boca Raton, Florida, CRC Press, 1994;p. 35-50.*
13. Colombari DSA, Colombari C, Saad WA, Camargo LAA, Renzi A, De Luca Jr LA, Menani JV. Effect of furosemida treatment on the central and peripheral pressor responses to cholinergic and adrenergic agonists, angiotensin II, hypertonic solution and vasopressina. *Neuroscience letters.* 1992; 143:255-258.
14. Colombari E, Bonagamba LG, Machado BH. Mechanisms of pressor and bradycardic responses to L-glutamate microinjected into the NTS of conscious rats. *Am J Physiol.* 1994; 266:R730-8.
15. Cottle MA. Degeneration studies of the primary afferents of IXth and Xth cranial nerves in the cat: *J.Comp.Neurol.* 1964; 122: 329-345.
16. Dampney RA. Functional organization of central pathways regulating the cardiovascular system. *Physiol Rev.* 1994; 74:323–364.
17. De Luca LA Jr, Sugawara AM, Menani JV. Brain versus peripheral angiotensin II receptors in hypovolaemia: behavioural and cardiovascular implications. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2000; 27:437-42.

18. de Oliveira LB, Callera JC, De Luca LA Jr, Colombari DS, Menani JV. GABAergic mechanisms of the lateral parabrachial nucleus on sodium appetite. *Brain Res Bull.* 2007; 73:238-47.
19. de Oliveira LB, De Luca LA Jr, Menani JV. Moxonidine and central alpha2 adrenergic receptors in sodium intake. *Brain Research.* 2003; 993:177-82.
20. De Paula PM, Antunes VR, Bonagamba LG, and 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: R1164–R1171.
21. Echtenkamp SF, Anderson AC. Baroreflex modulation by cardiopulmonary receptors during chronic sodium depletion. *Am J Physiol.* 1988; 254:H905-11.
22. Edwards GL, Johnson AK. Enhanced drinking after excitotoxic lesions of the parabrachial nucleus in the rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 1991; 261: 1039-44.
23. Fagura MS, Jarvis GE, Dougall IG, LEFF P. Adventures in the pharmacological analysis of P2 receptors. *J. Auton. Nerv. System* 81: 178-186, 2000.
24. Fredholm BB. Adenosine receptors in the Central Nervous System. *NIPS.* 1995; 10: 122-8.
25. Gerkens JF, Armsworth SJ, Smith AJ. Inhibition of sympathetic constriction of the ex vivo tail artery perfused with blood from rats given furosemide. *Clin Exp Hypertens A.* 1987; 9:51-79.
26. Gourine AV, Dale N, Gourine VN, Spyer KM. Fever in systemic inflammation: roles of purines. *Front Biosci.* 2004; 9: 1011-22.

27. Gourine AV, Melenchuk EV, Poputnikov DM, Gourine VN, Spyer KM. Involvement of purinergic signalling in central mechanisms of body temperature regulation in rats. *Br. J. Pharmacol.* 2002; 135: 2047-55.
28. Gourine AV, Poputnikov DM, Zhernosek N, Melenchuk EV, Gerstberger R, Spyer KM, et al. P2 receptor blockade attenuates fever and cytokine responses induced by lipopolysaccharide in rats. *Br. J. Pharmacol.* 2005; 1-7.
29. Haber E. The role of renin in normal and pathological cardiovascular homeostasis. *Circulation.* 1976; 54:849-961.
30. Haibara AS, Colombari E, Chianca Jr DA, Bonagamba LGH, Machado BH. NMDA receptors in NTS are involved in bradycardic but not in pressor response of chemoreflex. *Am J Physiol.* 1995; 269:H1421–H1427.
31. Horiuchi J, Potts PD, Tagawa T, Dampney RA. Effects of activation and blockade of P2x receptors in the ventrolateral medulla on arterial pressure and sympathetic activity. *J Auton Nerv Syst.* 1999; 76: 118-26.
32. Jalowiec JE. Sodium appetite elicited by furosemide: effects of differential dietary maintenance. *Behavioral Biology.* 1974; 10:313-327.
33. Kennedy C. The discovery and development of P2 receptor subtypes. *J Auton Nerv System.* 2000; 81: 158-63.
34. Kitchen AM, Collins HL, Dicarlo SE, Scislo TJ, O’Leary DS. Mechanisms mediating NTS P2x receptor-evoked hypotension: cardiac output vs. total peripheral resistance. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2001; 281:2198-2203.

35. Kitchen AM, O'Leary DS, Scislo TJ. Sympathetic and parasympathetic component of bradycardia triggered by stimulation of NTS P2X receptors. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006; 290:807-812.
36. Lawrence AJ, Jarrott B. Neurochemical modulation of cardiovascular control in the nucleus tractus solitarius. *Prog Neurobiol.* 1996; 48:21–53.
37. Lynn MP, Fouad F, Cook SA, Napoli CA, Ferrario CM. Alterations in cardiac function and cardiopulmonary blood volume in chronic sodium depletion in dogs. *Clin Sci (Lond).* 1980; 59 Suppl 6:393s-395s.
38. Machado BH e Bonagamba LGH. Microinjection of L-glutamate into the nucleus tractus solitarii increases arterial pressure in conscious rats. *Brain Research.* 1992; 576:131-138.
39. Menani JV, De Luca LA Jr, Johnson AK. Lateral parabrachial nucleus serotonergic mechanisms and salt appetite induced by sodium depletion. *Am J Physiol.* 1998; 274:R555-60.
40. Menani JV, Silveira JEN, Colombari DAS, De Luca LA Jr (2004) Mecanismos fisiológicos de controle da excreção de sódio: Aspectos fisiológicos. *Hipertensão* 7:2
41. Menezes MF, Barbosa SP, De Andrade CA, Menani JV, De Paula PM. Purinergic mechanisms of lateral parabrachial nucleus facilitate sodium depletion-induced NaCl intake. *Brain Research.* 2011; 1372:49-58.
42. Mizusawa A, Ogawa H, Kikuchi Y, Hida W. In vivo release of glutamate in nucleus tractus solitarii of the rat during hypoxia. *Journal of Physiology.* 1994; 478:1.

43. Nozaki PN, Pereira DT, Moura FV, Menani JV, De Luca LA. Ingestion of hypertonic NaCl vs. palatable drinks by sodium-depleted rats. *Physiol Behav.* 2002; 75:443-8.
44. Palkovits, M., and L. Zaborsky. Neuroanatomy of central cardiovascular control. Nucleus tractus solitarius: afferent and efferent neuronal connections in relation to baroreceptor reflex arc, in W De Jong, AP Provoost, and AP Shapiro eds., *Hypertension and Brain Mechanisms*: Amsterdam, Elsevier, 1977; 9-34.
45. Paton JF, de Paula PM, Spyer KM, Machado BH, Boscan P. Sensory afferent selective role of P2 receptors in the nucleus tractus solitarius for mediating the cardiac component of the peripheral chemoreceptor reflex in rats. *J Physiol.* 2002; 543:995–1005.
46. Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, 5 ed. Academic Press. 2004; San Diego.
47. Phillis JW, Scislo TJ, O’Leary DS. Purines and the nucleus tractus solitarius: effects on cardiovascular and respiratory function. *Clin Exp Pharmacol and Physiol.* 1997; 24:738–742.
48. Ralevic V, Burnstock G. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev.* 1998; 50: 413-92.
49. Ralevic V, Thomas T, Burnstock G, Spyer KM. Characterization of P2 receptors modulating neural activity in rat rostral ventrolateral medulla. *Neuroscience.* 1999; 94: 867-78.
50. Ralevic V. P2 receptors in the central and peripheral nervous systems modulating sympathetic vasomotor tone. *J Auton Nerv Syst.* 2000; 81(1-3):205-11.

51. Rocchini AP, Cant JR, Barger AC. Carotid sinus reflex in dogs with low-to-high-sodium intake. *Am J Physiol.* 1977; 233:H196-H202.
52. Salgado HC, Salgado MC, Krieger EM. Cardiovascular reflexes in conscious sodium-depleted rats. *Braz J Med Biol Res.* 1986; 19:319-25.
53. Salgado HC, Salgado MC, Krieger EM. Hemodynamics and sodium balance in conscious sodium-depleted rats. *Braz J Med Biol Res.* 1985; 18:47-54.
54. Sato MA, Yada MM, Renzi A, Camargo LA, Saad WA, Menani JV, De Luca Júnior LA. Antagonism of clonidine injected intracerebroventricularly in different models of salt intake. *Braz J Med Biol Res.* 1996; 29:1663-6.
55. Speilman WS, Davis JO. The renin-angiotensin system and aldosterone secretion during sodium depletion in the rat. *Circulation Research.* 1974; 35:615-624.
56. Szilagyi JE, Masaki Z, Brosnihan KB, Ferrario CM. Neurogenic suppression of carotid sinus reflexes by vagal afferents in sodium depleted dogs. *Am J Physiol.* 1981; 241:H255-H262.
57. Talman WT, Perrone MH, Reis DJ. Evidence for L-glutamate as the neurotransmitter of baroreceptor afferents. *Science.* 1980; 209:813-815.
58. Talman WT. Kynurenic acid microinjected into the nucleus tractus solitaries of rat blocks the arterial baroreflex but not responses to glutamate. *Neuroscience Letters.* 1989; 102:247-252.
59. Ter Horst G J, Streefland DC. Ascending projections of the solitary tract nucleus, in IRA Barraco ed., *Nucleus of the Solitary Tract*: Boca Raton, Florida, CRC Press, 1994; 93-104.

60. Thurston H, Laragh JH. Prior receptor occupancy as a determinant of the pressor activity of infused angiotensin II in the rat. *Circ Res.* 1975; 36:113-7.
61. Van Giersbergen PL, Palkovits M, De Jong W. Involvement of neurotransmitters in the nucleus tractus solitarii in cardiovascular regulation. *Physiol Rev.* 1992; 72: 789–824.
62. Vardhan A, Kachroo A, Sapru HN. Excitatory amino acid receptors in commissural nucleus of the NTS mediate carotid chemoreceptor responses. *Am J Physiol Regul Integr comp Physiol.* 1993; 264:41–50.
63. Verbalis JG. Disorders of body water homeostasis. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism.* 2003; 17: 471–503.
64. Vieira AA, Colombari E, De Luca LA Jr, Colombari DS, De Paula PM, Menani JV. Importance of angiotensinergic mechanisms for the pressor response to l-glutamate into the rostral ventrolateral medulla. *Brain Res.* 2010; 1322:72-80.
65. Vieira AA, Colombari E, De Luca LA Jr, Colombari DS, Menani JV. AV3V lesions reduce the pressor response to L-glutamate into the RVLM. *Brain Res.* 2006; 1086:160-7.
66. Vieira AA, Colombari E, De Luca LA Jr, de Almeida Colombari DS, Menani JV. Cardiovascular responses to microinjection of L-glutamate into the NTS in AV3V-lesioned rats. *Brain Res.* 2004; 1025:106-12.
67. Vieira AA, Colombari E, De Luca LA Jr, de Almeida Colombari DS, Menani JV. Central cholinergic blockade reduces the pressor response to L-glutamate into the rostral ventrolateral medullary pressor area. *Brain Res.* 2007; 1155:100-7.

68. Weiner, IM. Diuretics and other agents employed in the mobilization of edema fluid. In: Goodman and Gilman's the pharmacological basics of therapeutics. (Gilman AG, Rall TW, Nies AS and Taylor P, eds), pp 696-722. Pergamon Press, 1990.
69. Yao ST, Barden JA, Finkelstein DI, Bennett MR, Lawrence AJ. Comparative study on the distribution patterns of P2X(1)-P2X(6) receptor immunoreactivity in the brainstem of the rat and the common marmoset (*Callithrix jacchus*): association with catecholamine cell groups. *J Comp Neurol* 2000; 427: 485-507.
70. Zardetto-Smith AM, Thunhorst RL, Cicha MZ, Johnson AK. Afferent signaling and forebrain mechanisms in the behavioral control of extracellular fluid volume. *Ann N Y Acad Sci.* 1993; 689:161-76.
71. Zhang W, Mifflin SW. Excitatory amino acid receptors within NTS mediate arterial chemoreceptor reflexes in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 1993; 265:77-773.
72. Zimmerman BG, Sybertz EJ, Wrong PC. Interaction between sympathetic and renin-angiotensin system. *Journal of Hypertension.* 1984; 2:581-587.
73. Zimmerman BG. Blockade of adrenergic potentiating effect of angiotensin by 1-Sar-8-Ala-angiotensin II. *Journal of Phamacology and Experimental Therapeutics.*1973; 85:486-492.

Autorizo a reprodução deste trabalho.
(Direitos de publicação reservados ao autor)

Araraquara, 02 de Março de 2012.

MICHELE THAÍS FÁVERO