

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**

Luciana Mesquita Passamani

**ESTUDO DO PAPEL DO SISTEMA PURINÉRGICO NA
MEDIAÇÃO DAS RESPOSTAS CARDIOVASCULARES DO
NÚCLEO AMBÍGUO E DO REFLEXO BEZOLD-JARISCH EM
RATOS ANESTESIADOS**

**VITÓRIA
2009**

LUCIANA MESQUITA PASSAMANI

**ESTUDO DO PAPEL DO SISTEMA PURINÉRGICO NA
MEDIAÇÃO DAS RESPOSTAS CARDIOVASCULARES DO
NÚCLEO AMBÍGUO E DO REFLEXO BEZOLD-JARISCH EM
RATOS ANESTESIADOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo, para obtenção do grau de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos Schenberg

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Karla Nívea Sampaio

VITÓRIA
2009

Passamani, Luciana Mesquita

Estudo do papel do sistema purinérgico na mediação das respostas cardiovasculares do núcleo ambíguo e do reflexo Bezold-Jarisch em ratos anestesiados/ Luciana Mesquita Passamani. – 2009.
114p.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos Schenberg

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Karla Nívea Sampaio

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas.

1. Núcleo ambíguo 2. Receptores purinérgicos P2 3. ATP 4. PPADS
5. Reflexo Bezold-Jarisch I. Título

LUCIANA MESQUITA PASSAMANI

**ESTUDO DO PAPEL DO SISTEMA PURINÉRGICO NA
MEDIÇÃO DAS RESPOSTAS CARDIOVASCULARES DO
NÚCLEO AMBÍGUO E DO REFLEXO BEZOLD-JARISCH EM
RATOS ANESTESIADOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, para obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Aprovada em 22 de maio de 2009.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Luiz Carlos Schenberg
Depto. Ciências Fisiológicas – UFES
Orientador

Prof^a. Dr^a. Karla Nívea Sampaio
Depto. Ciências Farmacêuticas – UFES
Co-orientadora

Prof. Dr. Benedito Honório Machado
Depto. de Fisiologia – FMRP – USP

Prof. Dr. Hélder Mauad
Depto. Ciências Fisiológicas – UFES

Prof. Dr. Luiz Carlos Schenberg
Depto. Ciências Fisiológicas – UFES
Coordenador do PPGCF – UFES

Dedico este trabalho a:

Meu Pai, que sabe educar com amor e carinho e não mede esforços para o meu sucesso.

Minha Mãe, uma mulher linda, sempre doce e generosa, meu porto seguro.

Meus Irmãos, Rodrigo e Henrique, meninos amáveis e companheiros.

Meus Avós, Fernando e Sizeny, que não sabem mais o que fazer nesta vida para me agradar.

Minha Tia Fernanda, irmã, amiga e madrinha de coração.

Meu Namorado, Ricardo, que com amor e paciência sempre está ao meu lado.

Demais Tios, Primos e Amigos que me incentivaram.

A todos vocês, meu muito obrigada.

AGRADECIMENTOS

A Deus e a Nossa Senhora por mais este momento especial em minha vida;

A Prof^a. Dr^a. Karla Nívea Sampaio pela maravilhosa orientação e, principalmente, por ser amiga paciente, conselheira e confiar em meu trabalho.

Ao Prof. Dr. Luiz Carlos Schenberg pela oportunidade de ser aluna da PPGCF e por toda a atenção prestada durante meu trabalho.

Ao Prof. Dr. Hélder Mauad por me receber como aluna, disponibilizando seus conhecimentos e abrindo as portas do seu laboratório.

Ao Prof. Dr. Benedito Honório Machado pela doação de uma substância que possibilitou dar início a este trabalho.

Ao Prof. Dr. Julian F. R. Paton pela doação de substâncias e pela valiosa contribuição na discussão dos resultados.

Ao Prof. Dr. Antonio de Melo Cabral e a Prof^a. Dr^a. Nazaré de Souza Bissoli pelo agradável convívio no laboratório.

A todos os demais professores do PPGCF.

As ex-alunas de iniciação científica, Cristina Nascimento e Gabriela Maretto pela grande amizade e parceria nos experimentos.

A todos os amigos que conquistei durante este período, em especial, Débora Pires, Quézia Pires, Aline Lamas, Fagna Schimitel, Mirian Fiorese, Lorena Furieri e Renata Tiradentes pela amizade, apoio e carinho.

Aos amigos, Pablo Gava, Élio Waichert e Diego Pedrosa pelo acolhimento no laboratório e apoio nos experimentos.

Ao amigo Edson Dias pela amizade e apoio técnico na realização dos experimentos.

RESUMO

O nucleotídeo purinérgico, adenosina 5'-trifosfato (ATP) pode agir como um neurotransmissor/neuromodulador no sistema nervoso central, inclusive em núcleos associados com o controle autonômico. Estudos anatômicos têm demonstrado a existência de receptores purinérgicos P2 no núcleo ambíguo (NA). Entretanto, pouco se sabe sobre o papel destes receptores na mediação das respostas cardiovasculares do NA. Sendo assim, o nosso trabalho teve como objetivos: a) avaliar os efeitos da ativação dos receptores purinérgicos do NA sobre a pressão arterial e a frequência cardíaca, b) avaliar os efeitos do bloqueio autonômico periférico na modulação das respostas cardiovasculares mediadas pela ativação dos receptores purinérgicos do NA, c) avaliar o papel dos receptores purinérgicos na modulação das respostas mediadas pela ativação glutamatérgica do NA, e d) avaliar a modulação do sistema purinérgico ao nível do NA na mediação das respostas cardiovasculares do reflexo Bezold-Jarisch. Foram utilizados ratos Wistar, anestesiados com uretana (1,4 g/kg, i.p.), paralisados com succinilcolina e ventilados artificialmente. A artéria e veia femorais foram cateterizadas para permitir os registros cardiovasculares e a administração de drogas, respectivamente. As coordenadas estereotáxicas de referência utilizadas para atingir o NA foram: +0,5 mm rostral ao óbex, $\pm 1,7$ mm lateral e -1,2 a -1,8 mm ventral. As drogas utilizadas foram: L-Glutamato (5,0 nmol/50 nL), ATP (0,31; 2,5; 3,5; 5,0; 6,0 nmol/50 nL), prazosin (1,0 mg/kg), metil-atropina (2,0 mg/kg), PPADS (500 pmol/100 nL) e solução salina (0,9%). O reflexo Bezold-Jarisch foi ativado pela administração intravenosa de fenilbiguanida (12,0 μ g/kg). Os dados obtidos mostraram respostas bradicárdicas com um padrão dose-dependente e também respostas pressoras às microinjeções de ATP nas doses testadas (0,31; 2,5; 3,5; 5,0; 6,0 nmol/50 nL) no NA. O bloqueio α_1 -adrenérgico com prazosin não alterou significativamente a resposta bradicárdica, mas aboliu a resposta pressora gerada pela microinjeção de ATP (3,5 nmol/50 nL). O bloqueio muscarínico com metil-atropina aboliu a resposta bradicárdica gerada pela microinjeção de ATP (3,5 nmol/50 nL). Microinjeções ipsilaterais de PPADS (500 pmol/100 nL) no NA promoveram uma significativa atenuação da resposta bradicárdica e nenhuma alteração na resposta pressora à microinjeção de ATP (3,5 nmol/50 nL). Além disso, microinjeções ipsilaterais de PPADS (500 pmol/100 nL) no NA promoveram uma significativa atenuação da

resposta bradicárdica gerada pela microinjeção de L-Glutamato (5,0 nmol/50 nL). Microinjeções bilaterais de PPADS (500 pmol/100 nL) no NA atenuaram significativamente as respostas hipotensora e bradicárdica do reflexo Bezold-Jarisch. Estes resultados sugerem que os receptores purinérgicos do tipo P2 no NA parecem estar envolvidos na mediação das respostas cardiovasculares ao ATP e que estes efeitos podem envolver uma neuromodulação do sistema glutamatérgico ao nível do NA em ratos anestesiados. Adicionalmente, nossos dados mostram que os receptores purinérgicos do tipo P2 do NA, parecem ter participação na mediação das respostas cardiovasculares do reflexo Bezold-Jarisch. No entanto, os subtipos específicos de receptores purinérgicos envolvidos bem como a participação do sistema purinérgico em outros reflexos cardiovasculares ao nível do NA permanecem por ser elucidados.

Palavras-chave: NA; receptores purinérgicos P2; ATP; PPADS; reflexo Bezold-Jarisch.

ABSTRACT

The purine nucleotide adenosine 5'-triphosphate (ATP) may act as a neurotransmitter/neuromodulator in the central nervous system, including nuclei associated with autonomic control. Anatomical studies have demonstrated the existence of P2 receptors in the nucleus ambiguus (NA). However, very little is known about the role of these receptors in mediating the cardiovascular responses of the NA. Therefore, the aims of our study were: a) to evaluate the effects on blood pressure and heart rate of the activation of purinoceptors in the NA, b) to evaluate the effects of the autonomic blockade on the cardiovascular responses due to the activation of purinoceptors in the NA, c) to evaluate if the purinoceptors modulate the cardiovascular responses due to glutamatergic activation of the NA, and d) to evaluate the role of the purinergic system at the level of the NA in mediating the cardiovascular responses of the Bezold-Jarish reflex. This study used anesthetized (urethane, 1.4 g/kg, i.p.) Wistar rats blocked with succinylcholine and artificially ventilated. The femoral artery and vein were catheterized to allow cardiovascular recordings and drugs injections, respectively. The stereotaxic coordinates used to reach the NA were: +0.5 mm rostral to obex, \pm 1.7 mm lateral and -1.2 to -1.8 mm ventral. The following drugs were used: L-Glutamate (5.0 nmol/50 nL), ATP (0.31; 2.5; 3.5; 5.0; 6.0 nmol/50 nL), prazosin (1.0 mg/kg), methyl-atropine (2.0 mg/kg), PPADS (500 pmol/100 nL) and saline (0.9%). The Bezold-Jarish reflex was activated by the intravenous injection of phenylbiguanide (12.0 μ g/kg). Our data showed dose-dependent bradycardic responses and also pressor responses to the ATP microinjection in the NA with the doses tested (0.31; 2.5; 3.5; 5.0; 6.0 nmol/50 nL). The α_1 -adrenergic blockade with prazosin did not change the bradycardic response but abolished the pressor response to the ATP (3.5 nmol/50 nL) microinjection in the NA. The muscarinic blockade with methyl-atropine abolished the bradycardic response induced by the ATP (3.5 nmol/50 nL). Ipsilateral microinjection of PPADS (500 pmol/100 nL) in the NA significantly attenuated the bradycardia but did not affect the pressor response to the ATP (3.5 nmol/50 nL) in the NA. Moreover, ipsilateral microinjection of PPADS (500 pmol/100 nL) in the NA significantly attenuated the bradycardic response to L-Glutamate (5.0 nmol/50 nL) microinjection into the NA. Bilateral microinjections of PPADS in the NA significantly attenuated the depressor and bradycardic responses due to the Bezold-Jarisch reflex activation. These results suggest

that the P2 purinoceptors seem to be involved in the mediation of the cardiovagal responses of the NA and that this effect might involve a neuromodulation of the glutamatergic system at the level of the NA in anesthetized rats. Additionally, our data show that the purinoceptors of the NA, seem to participate in the mediation of the cardiovascular responses of the Bezold-Jarish reflex. However, the specific subtypes of purinergic receptors involved in these responses as well as the participation of the purinergic system in other cardiovascular reflexes at the level of the NA, remain to be elucidated.

Key-words: NA; P2 purinergic receptors; ATP; PPADS; Bezold-Jarisch reflex.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1. Registro de ratos representativos de seus grupos mostrando as mudanças na pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) em resposta à microinjeção unilateral de doses crescentes de ATP (0,31; 2,5; 3,5; 5,0 e 6,0 nmol/50 nL) no NA.

Figura 2. Deltas de pressão arterial média (PAM) (A) e frequência cardíaca (FC) (B) em resposta à microinjeção unilateral de doses crescentes de ATP (0,31; 2,5; 3,5; 5,0 e 6,0 nmol/50 nL) no NA de ratos. O número de ratos estudados em cada grupo está representado entre parênteses.

** $p < 0,01$ e * $p < 0,05$ indicam diferenças estatisticamente significantes em relação à dose de 0,31 nmol/50 nL.

$p < 0,01$ indica diferença estatisticamente significativa em relação à dose de 2,5 nmol/50 nL.

&& $p < 0,01$ indica diferença estatisticamente significativa em relação à dose de 3,5 nmol/50 nL.

Figura 3. Registro de um animal representativo do grupo mostrando as mudanças na pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) induzidas pela microinjeção unilateral de ATP (3,5 nmol/50 nL) no NA antes (controle), 5 minutos após injeção intravenosa de prazosin (1,0 mg/kg) e 2 minutos após injeção intravenosa de metil-atropina (2,0 mg/kg).

Figura 4. Deltas de pressão arterial média (PAM) (A) e frequência cardíaca (FC) (B) em resposta à microinjeção unilateral de ATP (3,5 nmol/50 nL) no NA antes (controle), 5 minutos após injeção intravenosa de prazosin (1,0 mg/kg) e 2 minutos após injeção intravenosa de metil-atropina (2,0 mg/kg), (n=6).

** $p < 0,01$ indica diferença estatisticamente significativa comparada ao controle.

Figura 5. Traçado mostrando as mudanças na pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) induzidas pela

microinjeção unilateral de ATP (3,5 nmol/50 nL) antes (controle) e após (7', 17', 27' e 37') o bloqueio do NA com PPADS (500 pmol/100 nL) em um rato do grupo.

Figura 6. Deltas de pressão arterial média (PAM) (A) e frequência cardíaca (FC) (B) em resposta à microinjeção unilateral de ATP (3,5 nmol/50 nL) antes (controle) e após (7', 17', 27' e 37') o bloqueio do NA com PPADS (500 pmol/100 nL), (n=5).

**p<0,01 e *p<0,05 indicam diferenças estatisticamente significantes comparadas ao controle.

Figura 7. Registro de um animal representativo do grupo mostrando as mudanças na pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) induzidas pela microinjeção unilateral de ATP (3,5 nmol/50 nL) antes (controle) e após (7', 17', 27' e 37') a microinjeção de salina (0,9%, 100 nL) no NA.

Figura 8. Deltas de pressão arterial média (PAM) (A) e frequência cardíaca (FC) (B) em resposta à microinjeção unilateral de ATP (3,5 nmol/50 nL) antes (controle) e após (7', 17', 27' e 37') a microinjeção de salina (0,9%, 100 nL) no NA, (n=5).

Figura 9. Registro de um rato representativo do grupo mostrando as mudanças na pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) induzidas pela microinjeção unilateral de L-Glutamato (5,0 nmol/50 nL) antes (controle) e após (7', 17', 27' e 37') o bloqueio do NA com PPADS (500 pmol/100 nL).

Figura 10. Deltas de pressão arterial média (PAM) (A) e frequência cardíaca (FC) (B) em resposta à microinjeção unilateral de L-Glutamato (5,0 nmol/50 nL) antes (controle) e após (7', 17', 27' e 37') o bloqueio do NA com PPADS (500 pmol/100 nL), (n=9).

**p<0,01 e *p<0,05 indicam diferenças estatisticamente significantes comparadas ao controle.

Figura 11. Traçado mostrando as mudanças na pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) induzidas pela microinjeção unilateral de L-Glutamato (5,0 nmol/50 nL) antes (controle) e após (7', 17', 27' e 37') a microinjeção de salina (0,9%, 100 nL) no NA em um rato do grupo.

Figura 12. Deltas de pressão arterial média (PAM) (A) e frequência cardíaca (FC) (B) em resposta à microinjeção unilateral de L-Glutamato (5,0 nmol/50 nL) antes (controle) e após (7', 17', 27' e 37') a microinjeção de salina (0,9%, 100 nL) no NA, (n=7).

*p<0,05 indica diferença estatisticamente significativa comparada ao controle.

Figura 13. Registro de um rato representativo do grupo mostrando as mudanças na pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) induzidas pela fenilbiguanida (FBG, 12 µg/kg, i.v.) antes (controle) e após (7', 12', 17' e 27') o bloqueio bilateral do NA com PPADS (500 pmol/100 nL).

Figura 14. Quedas reflexas de pressão arterial diastólica (PAD) (A) e de frequência cardíaca (FC) (B), expressas na forma de percentual de queda, induzidas pela fenilbiguanida (12 µg/kg, i.v.) antes (controle) e após (7', 12', 17' e 27') o bloqueio bilateral do NA com PPADS (500 pmol/100 nL), (n=9).

**p<0,01 e *p<0,05 indicam diferenças estatisticamente significantes comparadas ao controle.

Tabela 1. Valores basais de pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) antes e após bloqueio bilateral com PPADS (500 pmol/100 nL) no NA.

*p<0,05 e **p<0,01 indicam diferenças estatisticamente significantes comparadas aos valores antes do bloqueio bilateral com PPADS.

Figura 15. Traçado mostrando as mudanças na pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) induzidas pela

fenilbiguanida (FBG, 12 µg/kg, i.v.) antes (controle) e após (7', 12', 17' e 27') a microinjeção de salina (0,9%, 100 nL) no NA em um rato do grupo.

Figura 16. Quedas reflexas de pressão arterial diastólica (PAD) (A) e de frequência cardíaca (FC) (B), expressas na forma de percentual de queda, induzidas pela fenilbiguanida (12 µg/kg, i.v.) antes (controle) e após (7', 12', 17' e 27') a microinjeção bilateral de salina (0,9%, 50 nL) no NA, (n=9).

Figura 17. Representação esquemática do núcleo ambíguo (NA) em um corte histológico na região -13,8mm em relação ao bregma (à esquerda) (Modificado de Paxinos e Watson, 1998). Fotomicrografia de uma secção transversal do tronco cerebral de um animal, mostrando o sítio de microinjeção no NA (à direita) (aumento de 30,7x).

LISTA DE ABREVIATURAS

AP-5, Ácido fosfonoaléxico
ATP, Adenosina 5'-trifosfato
CVLM, Bulbo Ventrolateral Caudal
DMV, Núcleo Motor Dorsal do Vago
DPCPX, 8-ciclopentil-1,3-dipropilxantina
FBG, Fenilbiguanida
FC, Frequência Cardíaca
IML, Coluna Intermediolateral
IP₅I, diinosina pentafofato
i.p., Intraperitoneal
i.v., Intravenoso
KN-62, 1-[*N,O*-bis(5-isoquinolinasulfonil)-*N*-metil-*L*-tirosil]-4-fenilpiperazina
LTF, Campo Tegumentar Lateral
NA, Núcleo Ambíguo
NTS, Núcleo do Trato Solitário
PA, Pressão Arterial
PAD, Pressão Arterial Diastólica
PAM, Pressão Arterial Média
PAP, Pressão Arterial Pulsátil
PPADS, ácido piridoxalfosfato-6-azofenil-2',4'-dissulfônico
8-PT, 8- ciclopentilteofilina
RVLM, Bulbo Ventrolateral Rostral
SNC, Sistema Nervoso Central
TNP-ATP, 2',3'-O-(2,4,6,-trinitrofenil) adenosina 5'-trifosfato
UTP, Uridina 5'-trifosfato

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO		20
OBJETIVOS		30
MATERIAIS E MÉTODOS		32
1. Animais	Animais	33
experimentais		
2. Registros	Registros	33
hemodinâmicos		
3. Ventilação	Ventilação	33
artificial e bloqueio de junção neuromuscular		
4. Bloqueio da	Bloqueio da	34
atividade simpática cardíaca		
5. Microinjeções	Microinjeções	34
no NA		
5.1. Identificação funcional do NA		35
5.2. Ativação de receptores purinérgicos do NA		35
5.3. Bloqueio de receptores purinérgicos do NA		36
6. Bloqueio	Bloqueio	36
autônômico periférico		
7. Ativação do	Ativação do	36
reflexo Bezold-Jarisch		
8. Análise	Análise	36
histológica do NA		
9. Análise	Análise	37
estatística		
10. Drogas	Drogas	37
utilizadas		
PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS		39
1. Efeitos da microinjeção de doses crescentes de ATP no NA		40

2. Bloqueio autonômico periférico com prazosin e metil-atropina	41
3. Efeitos da microinjeção de antagonista de receptores P2 sobre as respostas do ATP no NA	42
4. Efeitos da microinjeção de salina sobre as respostas do ATP no NA	43
5. Efeitos da microinjeção de antagonista de receptores P2 sobre as respostas do L-Glutamato no NA	44
6. Efeitos da microinjeção de salina sobre as respostas do L-Glutamato no NA	45
7. Efeitos da microinjeção de antagonista de receptores P2 sobre o reflexo Bezold-Jarisch no NA	46
8. Efeitos da microinjeção de salina sobre o reflexo Bezold-Jarisch no NA	47
RESULTADOS	48
1. Efeitos da microinjeção de doses crescentes de ATP no NA	49
2. Bloqueio autonômico periférico com prazosin e metil-atropina	52
3. Efeitos da microinjeção de antagonista de receptores P2 sobre as respostas do ATP no NA	55
4. Efeitos da microinjeção de salina sobre as respostas do ATP no NA	58
5. Efeitos da microinjeção de antagonista de receptores P2 sobre as respostas do L-Glutamato no NA	61
6. Efeitos da microinjeção de salina sobre as respostas do L-Glutamato no NA	64
7. Efeitos da microinjeção de antagonista de receptores P2 sobre o reflexo Bezold-Jarisch no NA	67
8. Efeitos da microinjeção de salina sobre o reflexo Bezold-Jarisch no NA	71
9. Fotomicrografia e representação esquemática	74
DISCUSSÃO	75

1. Efeitos da microinjeção de doses crescentes de ATP no NA e do bloqueio autonômico periférico com prazosin e metil-atropina sobre as respostas cardiovasculares do ATP	76
2. Efeitos da microinjeção de antagonista de receptores P2 sobre as respostas do ATP e do L-Glutamato no NA	80
3. Efeitos da microinjeção de antagonista de receptores P2 sobre o reflexo Bezold-Jarisch no NA	85
CONCLUSÕES	88
REFERÊNCIAS	91
APÊNDICE	110
ANEXOS	112

INTRODUÇÃO

A perfusão tecidual apropriada é garantida pela manutenção da pressão arterial sanguínea em níveis adequados e razoavelmente constantes ao longo de toda a vida dos indivíduos. Os mecanismos de ajuste da pressão arterial (PA) envolvem a regulação a curto-prazo e a regulação a longo-prazo. O controle a curto-prazo é efetuado por mecanismos reflexos neurais, que promovem uma estabilização rápida e eficiente da PA a cada batimento cardíaco. Entre os mecanismos que o organismo possui para a regulação a curto-prazo da PA, destacam-se os reflexos cardiovasculares.

O barorreflexo constitui uma importante ferramenta dentre os mecanismos de regulação neural por promover ajustes rápidos da PA. Este reflexo exerce a regulação da PA por meio de receptores localizados nas paredes do arco aórtico e do seio carotídeo. Os barorreceptores são sensíveis às alterações de tensão produzida na parede dos vasos pelas ondas de pressão sistólica ou por elevações súbitas da PA (Persson, 1991). A ativação destes receptores gera potenciais de ação, os quais são transmitidos ao sistema nervoso central (SNC) por meio de aferências que caminham juntamente com os nervos vago e glossofaríngeo. Quando há um aumento súbito da PA, a ativação barorreflexa promove simultaneamente uma elevação da atividade parassimpática para o coração e uma diminuição da atividade simpática tanto para os vasos de resistência quanto para o coração (Spyer, 1990). Isto resulta em bradicardia, redução da força de contração cardíaca, redução da resistência vascular periférica e, conseqüentemente, uma diminuição do débito cardíaco e da PA. Em contrapartida, a queda da PA é compensada por um decréscimo na descarga aferente barorreceptora, promovendo alterações opostas às acima descritas para os componentes autonômicos.

Todavia, o controle reflexo neural da circulação não depende somente do barorreflexo, mas também, em grande parte, dos reflexos cardiopulmonares

(Zanchetti e Mancia, 1991). Os reflexos cardiopulmonares exercem o controle da circulação por meio de receptores que estão localizados nos átrios, ventrículos, vasos pulmonares e parênquima pulmonar (Krayner, 1961; Kappagoda *et al.*, 1972) e são estimulados por mudanças na pressão de enchimento cardíaco e/ou por agentes químicos (Zucker, 1989). A ativação dos receptores ventriculares, mais especificamente do ventrículo esquerdo (Dawes, 1947; Paintal, 1973), por agentes químicos refere-se ao reflexo Bezold-Jarisch. O reflexo Bezold-Jarisch pode ser ativado por uma variedade de estímulos químicos entregues pela circulação ao coração, incluindo alcalóides do veratrum (Dawes, 1947; De Burgh *et al.*, 1988), nicotina (Evans *et al.*, 1991) e agonistas do receptor 5-HT₃, tais como serotonina (Verberne *et al.*, 2003; Verberne *et al.*, 1989) e fenilbiguanida (Barman *et al.*, 2005; Bell *et al.*, 1993; Daly e Kirkman, 1988; Evans *et al.*, 1990; Gieroba *et al.*, 1995). A ativação deste reflexo produz apnéia, bradicardia e hipotensão pela inibição da atividade simpática e pela redução do débito cardíaco (Chein, 1979; Verberne e Guyenet, 1992; Vardhan *et al.*, 1993; Gieroba *et al.*, 1995; Chianca e Machado, 1996; Chianca *et al.*, 1997), assim como diminuição da atividade do nervo simpático renal e da secreção de renina (Donald e Shepherd, 1978; Vayssettes-Courchay *et al.*, 1997). As vias aferentes que se originam nos receptores cardiopulmonares acompanham os nervos vago no caminho ao SNC. A inervação aferente consiste principalmente de fibras do tipo C não-mielinizadas, podendo em menor extensão ser do tipo mielinizada (Paintal, 1955; Krayner, 1961; Coleridge *et al.*, 1964; Muers e Slight, 1972). A via eferente envolve um aumento da atividade do nervo vago e diminuição do tono simpático para os vasos da periferia (Thorén, 1979) e nervo renal (DiBona, 1989).

Dados clínicos e experimentais têm mostrado que o reflexo Bezold-Jarisch tem um papel importante no controle da função cardiovascular em condições normais e fisiopatológicas (Mark, 1983; Meyrelles *et al.*, 1994; Perez-Gomez e Garcia-Aguado, 1977). Animais que sofreram desnervação sinoaórtica aguda ou crônica têm a sensibilidade do reflexo Bezold-Jarisch aumentada, sugerindo a importância deste reflexo na regulação da PA na ausência do barorreflexo (Persson *et al.*, 1988; Raymundo *et al.*, 1989; Chianca e Machado, 1994;

Chianca *et al.*, 1997). A sensibilidade do reflexo Bezold-Jarisch é modificada em diversas doenças cardiovasculares. Em ratos com hipertensão induzida pela inibição da enzima óxido nítrico sintase, a sensibilidade reflexa encontra-se aumentada (Araújo *et al.*, 1998). Em contrapartida, estudos em camundongos com o mesmo modelo de hipertensão mostraram uma atenuação deste reflexo nos animais avaliados (Peotta *et al.*, 2001). De modo semelhante, um prejuízo do reflexo também é observado em situações de hipertrofia cardíaca, após infarto crônico do miocárdio (Meyrelles *et al.*, 1998; 1996), ou com a idade, provavelmente devido à redução da distensibilidade cardíaca nos idosos (Ferrari *et al.*, 1990), mostrando assim, que o reflexo Bezold-Jarisch desempenha um importante papel na regulação cardiovascular. Deste modo, estudos que buscam avaliar os mecanismos que modulam o funcionamento deste reflexo abrem um amplo campo de investigação.

A integração central do reflexo Bezold-Jarisch parece ser semelhante àquela do barorreflexo (Vayssettes-Courchay *et al.*, 1997; Verberne *et al.*, 1989; Verberne e Guyenet, 1992), envolvendo estruturas bulbares e suprabulbares na mediação e modulação das respostas reflexas. As projeções das fibras C aferentes dos receptores cardiopulmonares para o SNC fazem a primeira sinapse ao nível do núcleo do trato solitário (NTS) (Kalia e Mesulam, 1980). Estudos utilizando lesões eletrolíticas evidenciaram que as fibras C aferentes projetam-se para o NTS (Ahluwalia *et al.*, 1977). Estudos posteriores mostraram que estas projeções são glutamatérgicas (Vardhan *et al.*, 1993). Do NTS partem projeções neurais excitatórias glutamatérgicas para o bulbo ventrolateral caudal (CVLM) (Urbanski e Sapru, 1988a; Yu e Gordon, 1996; Aicher *et al.*, 1996). Por sua vez, os neurônios depressores do CVLM exercem uma ação inibitória gabaérgica tônica sobre o bulbo ventrolateral rostral (RVLM) (Urbanski e Sapru, 1988a; Murugaian *et al.*, 1989; Willette *et al.*, 1984). O RVLM possui neurônios com propriedades marco-passo intrínsecas implicados na gênese e manutenção do tono simpático (Sun *et al.*, 1988; Ross *et al.*, 1984; Guyenet, 1990), os quais enviam projeções monossinápticas excitatórias para a coluna intermediolateral (IML) na medula espinhal (Guyenet, 1990). Na IML estão localizados a maioria dos neurônios pré-ganglionares simpáticos (Milner *et al.*, 1988; Gebber, 1990; Sved e Gordon, 1994), os quais

estimulam os neurônios pós-ganglionares simpáticos dos gânglios simpáticos, que distribuem a atividade simpática para os diversos órgãos-alvo. Por estas vias neurais ocorre então a modulação do componente simpatoinibitório do reflexo Bezold-Jarisch. Numa situação em que os receptores cardiopulmonares são estimulados, a atividade tônica dos neurônios do RVLM é inibida via CVLM, levando à redução da contratilidade cardíaca, da frequência cardíaca (FC) e da resistência vascular periférica. Quando a excitação destes receptores diminui, a atividade do RVLM é liberada promovendo alterações exatamente opostas sobre tais parâmetros hemodinâmicos.

Paralelamente a esta modulação simpática ocorre a modulação parassimpática cardiorreflexa. O NTS também envia projeções excitatórias para os neurônios pré-ganglionares parassimpáticos localizados no núcleo motor dorsal do vago (DMV), em algumas espécies, e no núcleo ambíguo (NA) (McAllen e Spyer, 1978a; 1978b; 1976; Nosaka *et al.*, 1979; 1978; 1982; Spyer, 1979; Loewy e Spyer, 1990). A excitação destes neurônios pré-ganglionares vagais promoveria uma redução na FC, o que caracteriza o componente cardiovascular do reflexo Bezold-Jarisch.

Todavia, os neurônios pré-ganglionares encontrados no DMV e no NA diferem na sua estrutura e função (Taylor *et al.*, 1999). Os neurônios pré-ganglionares vagais no DMV têm axônios não-mielinizados (Ford *et al.* 1990; Jones *et al.*, 1998) e sua baixa taxa de atividade não mostra relação evidente com as variáveis respiratória e cardíaca. Eles não são afetados pela estimulação dos barorreceptores arteriais, mas podem ser ativados em curta latência pela estimulação de aferências cardiopulmonares não-mielinizadas. Em contraste, os neurônios pré-ganglionares vagais no NA têm pequenos axônios mielinizados. Em animais anestesiados, eles apresentam pequena ou nenhuma atividade espontânea, mas quando ativados mostram um claro aumento em relação ao pulso arterial (McAllen e Spyer, 1978a). Além disso, sua atividade é modulada em fase com a respiração, sendo reduzida na fase inspiratória e aumentada na pós-inspiração (Gilbey *et al.*, 1984a). O NA, particularmente, tem despertado nosso interesse quanto ao seu envolvimento sobre as respostas cardiovasculares dos reflexos cardiovasculares, em especial sobre as respostas autonômicas à ativação do reflexo Bezold-Jarisch.

O NA é um núcleo localizado na área bulbar ventrolateral, composto de duas colunas longitudinais de neurônios, começando na margem posterior do núcleo facial e estendendo-se caudalmente até o primeiro segmento espinhal cervical. A coluna dorsal é dividida em uma formação compacta rostral esofagomotora, uma formação semicompacta intermediária faringo-laringomotora e uma formação reticulada caudal laringomotora (Bieger e Hopkins, 1987). Os neurônios eferentes vagais com projeção pulmonar são encontrados amplamente distribuídos por todo o NA, particularmente nos extremos dorsais (Jordan *et al.*, 1986; Loewy e Spyer, 1990). A coluna ventral ou formação externa do NA contém os neurônios pré-ganglionares parassimpáticos que inervam o coração e outras estruturas supradiaphragmáticas, incluindo a traquéia (Bieger e Hopkins, 1987; Hopkins e Armour, 1982; Kalia, 1981). A formação externa é também o local de pré-motoneurônios respiratórios bulboespinhais (Von Euler, 1979). O NA, portanto, é formado por uma múltipla combinação de neurônios sobrepostos com uma complexa variedade de funções fisiológicas.

Evidências fornecidas por estudos neuroanatômicos e funcionais têm apontado para o NA como o principal núcleo de origem dos neurônios pré-ganglionares vagais em diversas espécies, ainda que o papel do DMV não possa ser descartado. De acordo com estudos de marcação retrógrada obtidos por Massari e colaboradores (1998), os neurônios motores que controlam as respostas cronotrópicas, dromotrópicas e inotrópicas negativas estão distribuídos principalmente no NA. Estudos de McAllen e Spyer (1978a; 1976), utilizando a estimulação antidrômica do nervo cardíaco intratorácico em gatos, mostraram ativação maior dos neurônios do NA que dos neurônios do DMV. De modo semelhante, em estudos de marcação retrógrada a partir de tecidos cardíacos, neurônios do NA foram muito mais marcados que neurônios do DMV (Corbett *et al.*, 1999; Hsieh *et al.*, 1998; Nosaka *et al.*, 1979). Plecha e colaboradores (1988) também mostraram que 90% dos neurônios marcados após injeções de horseradish peroxidase dentro de gânglios parassimpáticos intracardíacos em cães se encontravam numa área dentro e ao redor do NA.

Diversos estudos também têm fornecido evidências funcionais para o envolvimento do NA na mediação das respostas cardioinibitórias em diversas espécies. Microinjeções de L-Glutamato dentro de sub-regiões do NA de gatos

promoveu uma intensa bradicardia e uma redução da velocidade de condução atrioventricular (Massari *et al.*, 1995, Gatti *et al.*, 1996). McAllen e Spyer (1978b) mostraram que a ativação de um único neurônio cardiovagal dentro do NA do gato foi capaz de promover bradicardia. A aplicação iontoforética de ácido DL-Homocistéico no NA de coelhos também promoveu uma lentificação cardíaca (Jordan *et al.*, 1982). Uma rápida resposta bradicárdica após a estimulação elétrica de baixo limiar dentro do NA de ratos também foi demonstrada (Nosaka *et al.*, 1979). Em contrapartida, microinjeções de glicina dentro do NA promoveram um aumento significativo da FC basal (Chitravanshi *et al.*, 1991). Sendo assim, diversas evidências anatômicas e funcionais apontam para o NA como o principal núcleo de origem dos neurônios pré-ganglionares vagais cardíacos, com importante papel na mediação das respostas cardioinibitórias.

A natureza química de algumas sinapses dentro do NA e o efeito de alguns neurotransmissores envolvidos na regulação cardíaca também têm sido alvos de investigação por diversos pesquisadores (Maqbool *et al.*, 1991; Izzo *et al.*, 1993; Massari *et al.*, 1998; 1996; 1994; Chan *et al.*, 1984; Agarwal e Calaresu, 1991). Diversos estudos mostram a participação de receptores de aminoácidos excitatórios na neurotransmissão do NA (Chan *et al.*, 1984; Agarwal e Calaresu, 1991; Massari *et al.*, 1996; 1995). O L-Glutamato quando microinjetado no NA promove uma bradicardia de início rápido e curta duração, com poucas alterações de PA (Brandão, 2000; Sampaio, 2001; Marchenko e Sapru, 2003). A acetilcolina, a substância P e as encefalinas também promovem bradicardia quando microinjetadas no NA, mas as respostas são menores, mais lentas e de maior duração (Agarwal e Calaresu, 1991). Massari e colaboradores (1996; 1994) demonstraram que terminais nervosos imunorreativos à substância P fazem sinapse em neurônios do NA, e que estes parecem estar envolvidos na modulação da FC, mas não na condução atrioventricular. Adicionalmente, tem sido demonstrado que neurônios pré-ganglionares vagais do NA, envolvidos no controle da contratilidade cardíaca, são monossinapticamente inervados por terminais nervosos catecolaminérgicos (Massari *et al.*, 1998). O envolvimento de receptores dopaminérgicos e nicotínicos na mediação das respostas cardiovagas do NA

também tem sido demonstrado (Chitravanshi e Calaresu, 1992, Neff *et al.*, 1998, Pedrosa, 2007). Maqbool e colaboradores (1991) mostraram que motoneurônios marcados pela enzima horseradish peroxidase no NA apresentavam sinapses gabaérgicas tanto no corpo celular como nos dendritos. De fato, a aplicação de um antagonista gabaérgico, bicuculina, no NA, aumentou significativamente a frequência de descarga destes neurônios, sugerindo a existência de impulsos gabaérgicos tonicamente ativos para estas células (Gilbey *et al.*, 1984b). Impulsos serotoninérgicos também foram encontrados em neurônios cardiovascularis do NA (Izzo *et al.*, 1993). Deste modo, diversos sistemas neurotransmissores parecem atuar na mediação das respostas cardiovasculares do NA. Todavia, muito pouco se sabe sobre a participação do sistema purinérgico na mediação das respostas cardiovasculares do NA, particularmente àquelas decorrentes da ativação do reflexo Bezold-Jarisch.

Uma função potencial do nucleotídeo purinérgico adenosina 5'-trifosfato (ATP) agindo como um neurotransmissor não-adrenérgico não-colinérgico nos nervos periféricos foi originalmente sugerida por Burnstock (1972), e vários estudos recentes indicam que o ATP pode agir como um neurotransmissor/neuromodulador no SNC (Edwards *et al.*, 1992). Estudos têm mostrado que o ATP parece agir como um neurotransmissor em um número de núcleos associados com o controle autonômico, tais como o NTS (Scislo *et al.*, 2001; Kitchen *et al.*, 2001; Kato e Shigetomi, 2001) e o RVLM (Ralevic *et al.*, 1999; Horiuchi *et al.*, 1999). Estudos anatômicos têm demonstrado a existência de receptores purinérgicos tanto no NA quanto no DMV (Fong *et al.*, 2002; Ashour e Deuchars, 2004; Yao e Lawrence, 2000), entretanto pouco se sabe sobre o papel das purinas no controle vagal cardíaco do NA.

Os nucleotídeos purinérgicos extracelulares medeiam seus efeitos via receptores específicos expressos na membrana celular de neurônios do SNC: A₁, A_{2a}, A_{2b} e A₃ para adenosina (receptores do tipo P1) e receptores do tipo P2 para ATP. Os receptores do tipo P2 têm sido divididos em duas famílias distintas, P2X e P2Y, os quais diferem na estrutura e no mecanismo de transdução de sinal (Fredholm *et al.*, 1997; North e Barnard, 1997). Os receptores P2X são canais catiônicos de membrana não-seletivos que se

abrem em resposta a ligação de ATP extracelular, com permeabilidade principalmente aos íons cálcio, mas também aos íons sódio e potássio (Gever *et al.*, 2006). Já foi demonstrada a existência de sete subtipos de receptores P2X (P2X₁₋₇) (Soto *et al.*, 1997; Harden *et al.*, 1998; Ralevic e Burnstock, 1998; MacKenzie *et al.*, 1999). A característica estrutural principal dos receptores P2X são dois domínios transmembrana separados por uma alça extracelular N-glicosilada e segmentos N- e C-terminal intracelulares relativamente pequenos, com exceção das subunidades P2X₂ e P2X₇, as quais têm um extenso segmento C-terminal. Os receptores P2X podem ser formados como multímeros de várias subunidades. Já foram identificados e caracterizados canais homoméricos (P2X₁₋₇) (Ralevic e Burnstock, 1998) e heteroméricos (P2X_{2/3}, P2X_{4/6}, P2X_{2/6}, P2X_{1/2} e P2X_{1/5}) (North, 2002). Membros da família de receptores P2X são largamente expressos no SNC e na periferia do corpo (Ralevic e Burnstock, 1998; Evans *et al.*, 1998; Robertson, 1998), onde exercem importantes funções fisiológicas e fisiopatológicas em uma variedade de processos biológicos. Dentre estas funções incluem-se a contração muscular, imunomodulação, inflamação e morte celular, geração e transmissão de sinais nociceptivos, transmissão sináptica rápida e modulação da liberação de neurotransmissores, excitabilidade neuronal e modulação do sistema cardiovascular e respiratório (Abbracchio e Burnstock, 1998; Ralevic e Burnstock, 1998; Robertson, 1998; Silinsky *et al.*, 1998; Di Virgilio *et al.*, 1998).

Em contrapartida, os receptores P2Y são receptores metabotrópicos acoplados às proteínas G (North e Barnard, 1997). Oito subtipos de receptores P2Y ativados por nucleotídeos extracelulares já foram identificados: P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆, P2Y₁₁, P2Y₁₂, P2Y₁₃ e P2Y₁₄ (Abbracchio *et al.*, 2006). Os subtipos P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆ e P2Y₁₁ utilizam principalmente a proteína G_q/G₁₁ para ativar a fosfolipase C, a qual medeia a liberação de Ca²⁺ intracelular via inositol trifosfato (IP₃) (Vorkhratsky, 2005). Já os subtipos P2Y₁₂, P2Y₁₃ e P2Y₁₄ estão acoplados à proteína G_{i/o}, a qual inibe a adenilato ciclase e modula canais iônicos (Abbracchio *et al.*, 2006). Os receptores P2Y parecem ter um papel mais modulatório do que diretamente de mediação da transmissão purinérgica (Fong *et al.*, 2002). O envolvimento do sistema purinérgico, particularmente dos subtipos de receptores purinérgicos P2, na mediação das respostas de núcleos

bulbares tem sido investigado. Estudo de Ralevic e colaboradores (1999) indica que o ATP pode modular a atividade de neurônios do RVLM via ações em purinorreceptores P2 e que ambos subtipos de receptores P2X e P2Y estão envolvidos neste processo. Estudos de Thomas e colaboradores (1999) mostraram a participação de purinorreceptores P2, de neurônios bulbares do grupo respiratório ventral, na mediação das respostas respiratórias do rato. Adicionalmente, tem sido sugerido que o ATP parece estar envolvido na quimiorrecepção central, possivelmente por agir em purinorreceptores P2X localizados em neurônios do grupo respiratório ventral (Thomas e Spyer, 2000).

Vários estudos também têm demonstrado que o ATP tem um importante papel como neurotransmissor/neuromodulador em mecanismos cardiovasculares e autonômicos em neurônios do NTS (Barroco *et al.*, 1996; Phillis *et al.*, 1997; Scislo e O'Leary, 1998; Scislo *et al.*, 1997; Scislo *et al.*, 1998). Estudos envolvendo microinjeções de α,β -metileno ATP, agonista seletivo de receptor P2X, e 2-metil ATP, agonista não-seletivo de receptor P2, no NTS de ratos anestesiados produziram respostas hipotensoras e bradicárdicas (Ergene *et al.*, 1994). De Paula e colaboradores (2004) mostraram que a microinjeção de ATP no NTS de ratos acordados também produziu resposta bradicárdica, mas, ao invés de uma resposta hipotensora, uma resposta hipertensora foi observada. Antunes e colaboradores (2005) mostraram que a microinjeção de ATP em sub-regiões diferentes do NTS (intermediário e caudal) de ratos acordados produziu respostas similares às observadas pela ativação quimiorreflexa, sugerindo o envolvimento dos receptores purinérgicos na neurotransmissão deste reflexo cardiovascular. Adicionalmente, estudo de Braga e colaboradores (2007) mostrou que a resposta pressora quimiorreflexa parece envolver receptores glutamatérgicos ionotrópicos e purinorreceptores P2 no NTS de ratos acordados e na preparação tronco cerebral-coração isolado.

Todos estes achados em núcleos bulbares suportam o conceito da sinalização purinérgica no SNC e mais especificamente no controle da função cardiovascular. Todavia, apesar de várias evidências funcionais da participação do sistema purinérgico na mediação das respostas cardiorespiratórias de diversos núcleos bulbares, poucos estudos avaliaram a participação deste sistema na mediação das respostas cardiovasculares do NA. Estudo de

Jameson e colaboradores (2008) utilizando preparações *in vitro* demonstrou que o ATP ativa receptores P2X pré-sinápticos que facilitam a neurotransmissão glutamatérgica excitatória em neurônios parassimpáticos do NA. Em estudos *in vitro* usando fatias de tronco cerebral foi demonstrado que o ácido piridoxalfosfato-6-azofenil-2',4'-dissulfônico (PPADS), um antagonista não-seletivo de receptores P2, bloqueou o aumento da neurotransmissão excitatória glutamatérgica dos neurônios parassimpáticos do NA no período após hipóxia (Griffioen *et al.*, 2007). Deste modo, estudos neuroanatômicos e estudos *in vitro* apontam para a existência e participação dos receptores purinérgicos na mediação das respostas do NA. Entretanto, ainda não foi investigado qual o papel do sistema purinérgico na mediação das respostas cardiovasculares do NA. Além disto, os estudos *in vitro* apontam para uma interação entre os sistemas purinérgico e glutamatérgico ao nível do NA. Todavia, se essa interação ocorre na mediação das respostas cardiovasculares do NA *in vivo* ainda precisa ser elucidado. Adicionalmente, ainda não foi investigado o papel dos receptores purinérgicos do NA na regulação dos reflexos cardiovasculares, particularmente do reflexo Bezold-Jarisch.

OBJETIVOS

Diante do anteriormente exposto os objetivos do presente trabalho foram:

OBJETIVO GERAL

- Avaliar o papel dos receptores purinérgicos do NA na mediação das respostas cardiovasculares em ratos anestesiados.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os efeitos da ativação dos receptores purinérgicos do NA sobre a PA e a FC em ratos anestesiados.
- Avaliar os efeitos do bloqueio autonômico periférico na modulação das respostas cardiovasculares mediadas pela ativação dos receptores purinérgicos do NA.
- Avaliar os efeitos do bloqueio dos receptores purinérgicos P2 do NA sobre as respostas cardiovasculares geradas pelo ATP.
- Avaliar o papel dos receptores purinérgicos na modulação das respostas mediadas pela ativação glutamatérgica do NA.
- Avaliar a modulação do sistema purinérgico ao nível do NA na mediação das respostas cardiovasculares do reflexo Bezold-Jarisch.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Animais experimentais

Foram utilizados ratos Wistar machos pesando entre 300 e 350 g fornecidos pelo Biotério do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo. Os animais foram mantidos em gaiolas com livre acesso à água e à ração e em ambientes com controle de temperatura (20-22°C) e luminosidade (ciclos claro e escuro de 12 em 12 horas). Os experimentos foram desenvolvidos seguindo as normas estabelecidas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e pela Sociedade Brasileira de Fisiologia (SBFis).

2. Registros hemodinâmicos

Os animais foram anestesiados com 1,4 g/kg, i.p., de uretana (Sigma, St. Louis, EUA) e, em seguida, foram cateterizados para permitir os registros de pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC), bem como a administração endovenosa de drogas. O procedimento de cateterização foi realizado através de uma incisão inguinal, onde a artéria e veia femorais foram isoladas e os catéteres de polietileno, PE-10 (SIMS Portex Ltd, Kent, Inglaterra) conectados a PE-50 (CPL MEDICAL'S, São Paulo, SP, Brasil), previamente preenchidos com solução salina, foram introduzidos nos vasos. Os registros pressóricos foram obtidos por meio de um transdutor de pressão (Spectramed-Statham, P23XL, Oxnard, EUA) acoplado a um sistema de registro computadorizado (BIOPAC Systems, Santa Bárbara, Califórnia). Os registros de FC foram derivados a partir do sinal pulsátil do próprio software. Antes dos registros, o catéter arterial foi preenchido com uma solução de heparina (Liquemine, Roche, Rio de Janeiro, Brasil) (1:50) em solução fisiológica para impedir a formação de coágulos.

3. Ventilação artificial e bloqueio de junção neuromuscular

Após a cateterização, sob anestesia pela uretana, foi feita uma incisão na porção ventral do pescoço do animal, afastando-se a musculatura para a exposição da traquéia. Através de uma incisão na traquéia, foi inserida uma cânula de polietileno, PE-90 (SIMS Portex Ltda, Kent, Inglaterra), para permitir a posterior ventilação artificial do animal. Após a traqueostomia, foi feito o bloqueio neuromuscular administrando 10,0 mg/kg, i.v., de succinilcolina (Sigma, St. Louis, EUA), evitando assim a interferência de receptores pulmonares de estiramento nas respostas observadas. Após a administração de succinilcolina, a cânula traqueal foi conectada a uma bomba ventilatória (Harvard Rodent Ventilator, modelo 683, EUA). O volume corrente foi ajustado para 2,0 mL e a frequência respiratória para 70 ciclos/minuto. Ao longo de todos os protocolos a efetividade e duração do bloqueio foram averiguadas.

4. Bloqueio da atividade simpática cardíaca

O bloqueio da atividade simpática cardíaca foi realizado administrando 2,0 mg/kg, i.v., do bloqueador β_1 -adrenérgico, atenolol (Sigma, St. Louis, EUA). Tal bloqueio foi realizado visando evitar eventuais interferências do simpático cardíaco sobre as respostas cardiovasculares observadas.

5. Microinjeções no NA

Sob anestesia pela uretana (1,4 g/kg, i.p.), os animais foram colocados em um estereotáxico (David Kopf Instruments, EUA) sobre uma manta aquecedora para manter a temperatura corporal entre 36,5 e 37,5°C. Durante todo o

experimento, a temperatura foi monitorada por meio de um termômetro digital intra-retal (Becton & Dickinson, EUA). A cabeça do animal foi fixada na armação estereotáxica com uma inclinação de 12,0 mm abaixo da linha interauricular. Em seguida, foi feita uma incisão sobre a pele na região dorsal da cabeça para expor o crânio, afastando-se os tecidos e o perióstio que recobrem o crânio. Posteriormente, foi realizada uma craniotomia por meio de uma broca odontológica (405-N-DENTEC, Brasil). As meninges foram removidas, com o auxílio de uma lupa estereoscópica (WPI, modelo 13301, Sarasota, USA), para melhor acesso das micropipetas. As coordenadas estereotáxicas de referência utilizadas para atingir o NA foram: +0,5 mm rostral ao óbex, $\pm 1,7$ mm lateral e -1,2 a -1,8 mm ventral.

As drogas utilizadas para as microinjeções foram dissolvidas em solução fisiológica (NaCl, 0,9%) e o pH ajustado para valores próximos do fisiológico (pH 7,4) com bicarbonato de sódio (99,5%) (Jand Química Ind., Brasil).

5.1. Identificação funcional do NA

A identificação inicial do NA foi feita por meio de microinjeções de L-Glutamato (5,0 nmol/50 nL) (Ácido Glutâmico, Sigma, St. Louis, EUA), considerando como uma resposta efetiva uma bradicardia ≥ 100 bpm com mínima alteração na pressão arterial. Para as microinjeções foram utilizadas micropipetas de vidro que variavam quanto ao número de vias conforme a necessidade dos protocolos. A utilização do L-Glutamato se deve ao fato dos receptores de aminoácidos excitatórios participarem diretamente da estimulação dos neurônios pré-ganglionares parassimpáticos que se dirigem ao coração promovendo as respostas cronotrópicas e dromotrópicas cardíacas. Adicionalmente a esta caracterização, foi feita a averiguação posterior dos sítios de injeção para todos os protocolos experimentais, conforme descrito no item número 8 de materiais e métodos.

As microinjeções foram efetuadas por meio de uma bomba de pressão (PV820-Pneumatic Pico-Pump, WPI, EUA) conectada a um cilindro de gás nitrogênio

(White Martins, Brasil) e à micropipeta de vidro através de um tubo de polietileno. As micropipetas utilizadas tinham uma ponta com diâmetro externo de aproximadamente 20 µm. Os volumes microinjetados foram monitorados pelo deslocamento do menisco com o auxílio de uma escala previamente calibrada.

5.2. Ativação de receptores purinérgicos do NA

Utilizando-se a mesma metodologia anteriormente citada para as microinjeções glutamatérgicas, a ativação de receptores purinérgicos no NA foi feita por meio de microinjeções unilaterais de ATP (Sigma, St. Louis, EUA) nas doses de 0,31; 2,5; 3,5; 5,0 e 6,0 nmol/50 nL. Os efeitos sobre a PA e FC foram medidos e os dados obtidos utilizados na construção de uma curva conforme descrito no item número 1 de protocolos experimentais.

5.3. Bloqueio de receptores purinérgicos do NA

Para o bloqueio de receptores purinérgicos do tipo P2 do NA foram realizadas microinjeções unilaterais e/ou bilaterais do antagonista de receptores purinérgicos do tipo P2, o ácido piridoxalfosfato-6-azofenil-2',4'-dissulfônico (PPADS, 500 pmol/100 nL) (Sigma, St. Louis, EUA).

6. Bloqueio autonômico periférico

O bloqueio autonômico periférico foi realizado pela injeção intravenosa do antagonista α_1 -adrenérgico, prazosin 1,0 mg/kg (Sigma, St. Louis, EUA), e do antagonista muscarínico, metil-atropina 2,0 mg/kg (Sigma, St. Louis, EUA). As doses de bloqueio utilizadas foram obtidas de protocolos de teste de efetividade de bloqueio, previamente determinados no laboratório.

7. Ativação do reflexo Bezold-Jarisch

O reflexo Bezold-Jarisch foi quimicamente ativado pela injeção intravenosa do agonista serotoninérgico 5-HT₃ fenilbiguanida na dose de 12,0 µg/kg (Sigma St. Louis, EUA). Para administração das doses de fenilbiguanida, o catéter venoso foi conectado a uma microseringa (Hamilton 5,0 µL, EUA). O reflexo foi identificado por reduções na FC e pressão arterial diastólica (PAD), simultaneamente.

8. Análise histológica do NA

Ao final dos experimentos, foi feita a marcação dos sítios de microinjeção com o corante Azul de Evans a 2% (50 nL) (Sigma, St. Louis, EUA) para averiguação final das áreas microinjetadas. Logo após a marcação, foi realizada uma infusão intracardíaca com 20 mL de solução salina, seguida por 40 mL de formalina 10%. O tronco cerebral foi removido e deixado em solução fixadora de formalina 10% por, no mínimo, 48 horas. Após esta etapa, os troncos cerebrais foram seccionados por meio de um micrótomo (Vibratome 1000 Plus, Sectioning System, St. Louis, EUA) em fatias de aproximadamente 100 µm. Posteriormente, as secções foram montadas em lâminas gelatinizadas e mantidas em estufa a 45°C por 24 horas para a completa desidratação. A seguir, os cortes foram corados com vermelho neutro a 1% (Sigma, St. Louis, EUA) e as lâminas foram cobertas com D.P.X. (Aldrich Chemical Company, Inc., Milwaukee, USA) e lamínulas, e deixadas em estufa a 45°C para secagem. A visualização dos sítios marcados foi feita através de uma lupa estereoscópica, baseando-se no Atlas de Paxinos e Watson (1998). Para todos os protocolos experimentais, foram considerados somente os animais com confirmação histológica.

9. Análise estatística

Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (EPM). Os métodos estatísticos utilizados foram análise de variância (ANOVA) uma via para medidas repetidas, com análise *Post-Hoc* pelos testes de Tukey e

Dunnett's, e teste t-Student. As diferenças foram fixadas como sendo estatisticamente significantes para * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

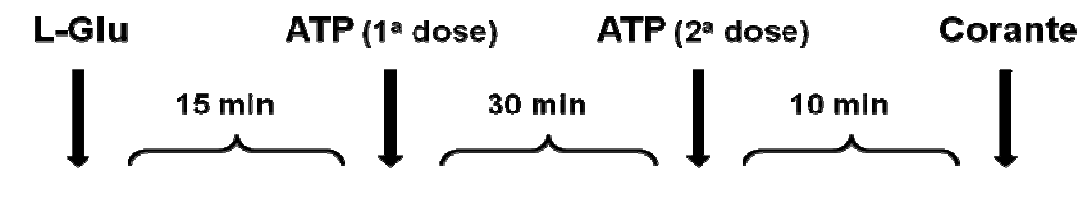
10. Drogas utilizadas

- Uretana (Sigma, St. Louis, EUA)
- Solução fisiológica (NaCl, 0,9%)
- Solução de heparina (Liquemine, Roche, Rio de Janeiro, Brasil)
- Succinilcolina (Sigma, St. Louis, EUA)
- Atenolol (Sigma, St. Louis, EUA)
- Bicarbonato de sódio (Jand Química Ind., Brasil)
- L-Glutamato monossódico (Sigma, St. Louis, EUA)
- ATP (Sigma, St. Louis, EUA)
- PPADS (Sigma, St. Louis, EUA)
- Prazosin (Sigma, St. Louis, EUA)
- Metil-atropina (Sigma, St. Louis, EUA)
- Fenilbiguanida (Sigma, St. Louis, EUA)
- Azul de Evans (Sigma, St. Louis, EUA)
- Formol (Vetec Química Fina Ltda, Rio de Janeiro, Brasil)
- Vermelho neutro (Sigma, St. Louis, EUA)
- D.P.X. (Aldrich Chemical Company, Inc., Milwaukee, USA)

PROCOLOS EXPERIMENTAIS

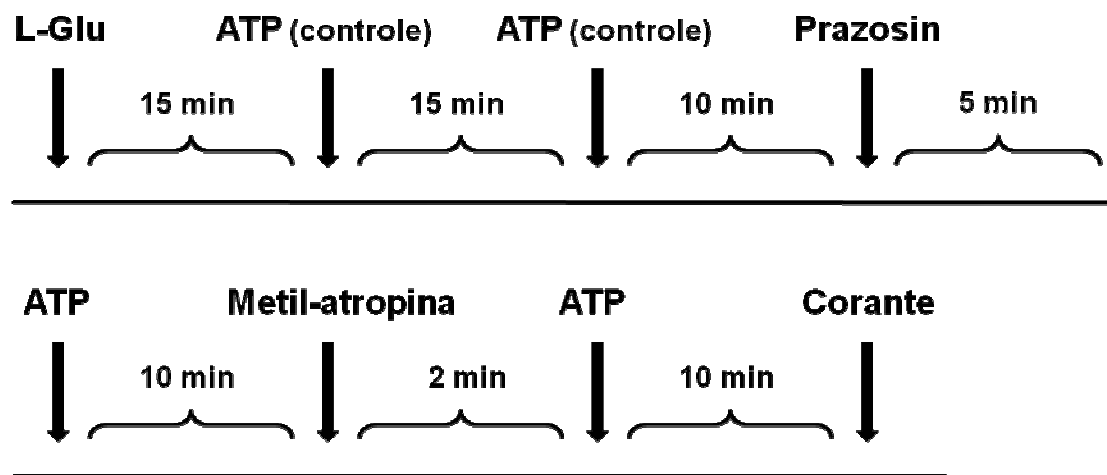
1. Efeitos da microinjeção de doses crescentes de ATP no NA

Uma curva dose-resposta do agonista adenosina 5'-trifosfato (ATP) foi construída com o objetivo de avaliar as respostas de pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) geradas pelo ATP no NA e também determinar uma dose efetiva de ATP a ser utilizada nos protocolos subsequentes. Para isso, foram microinjetadas doses crescentes de ATP no NA. Primeiramente, o NA foi identificado com microinjeções de L-Glutamato (5,0 nmol/50 nL), considerando como uma resposta efetiva uma bradicardia ≥ 100 bpm com mínima alteração na pressão arterial. Após 15 minutos de intervalo, em cada grupo de animais, foram feitas microinjeções unilaterais de duas doses diferentes de ATP, com intervalo de 30 minutos entre elas. Ao final dos registros, os animais receberam uma microinjeção unilateral de azul de Evans no NA para posterior identificação do sítio de microinjeção. As respostas geradas pelas diferentes concentrações de ATP foram avaliadas obtendo-se uma curva com as doses de 0,31 (n=7); 2,5 (n=10); 3,5 (n=10); 5,0 (n=5) e 6,0 nmol/50 nL (n=5). Neste protocolo foram utilizadas micropipetas de vidro de quatro vias contendo L-Glutamato, duas doses diferentes de ATP e o corante azul de Evans. Todos os experimentos de todos os protocolos testados foram realizados sob bloqueio neuromuscular e bloqueio da atividade simpática cardíaca.



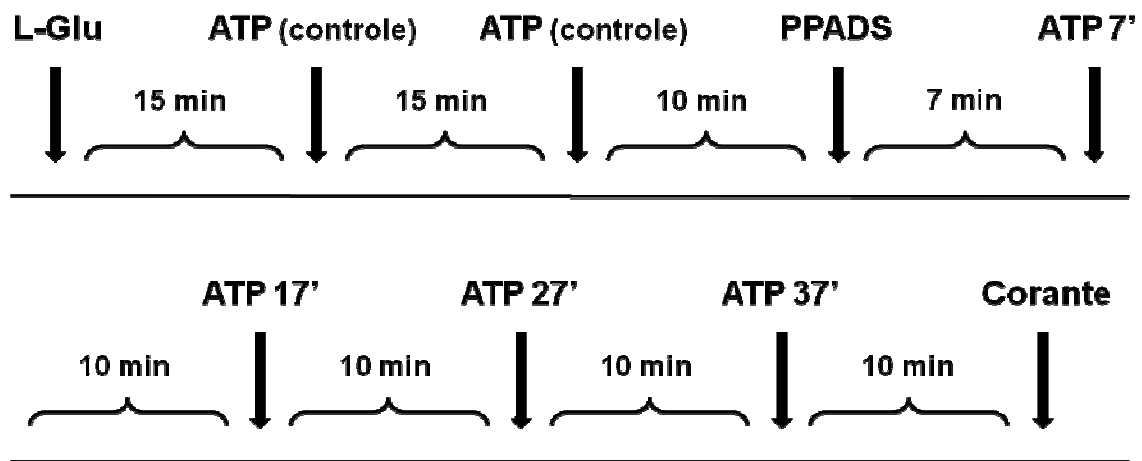
2. Bloqueio autonômico periférico com prazosin e metil-atropina

Neste protocolo os componentes autonômicos envolvidos nas respostas cardiovasculares geradas pela microinjeção de ATP no NA foram avaliados. Para isso, prazosin (1,0 mg/kg, i.v.) e metil-atropina (2,0 mg/kg, i.v.) foram usados para bloquear as atividades eferentes simpática e parassimpática, respectivamente (n=6). Inicialmente, foi feita a microinjeção de L-Glutamato (5,0 nmol/50 nL) para caracterização do NA, conforme citado anteriormente. Após 15 minutos de intervalo, foram realizadas duas microinjeções unilaterais de ATP (3,5 nmol/50 nL) (controles), com intervalo de 15 minutos entre elas. Respeitando-se mais 10 minutos, foi realizado o bloqueio autonômico com prazosin (1,0 mg/kg, i.v.). A microinjeção de ATP (3,5 nmol/50nL) foi repetida 5 minutos após o bloqueio simpático. Seguindo mais 10 minutos de intervalo, foi realizado o bloqueio autonômico com metil-atropina (2,0 mg/kg, i.v.). A microinjeção de ATP (3,5 nmol/50 nL) foi repetida 2 minutos após o bloqueio parassimpático. Ao final dos registros, os animais receberam uma microinjeção unilateral de azul de Evans no NA para posterior identificação do sítio de microinjeção. Neste protocolo foram utilizadas micropipetas de vidro de três vias contendo L-Glutamato, ATP e o corante azul de Evans.



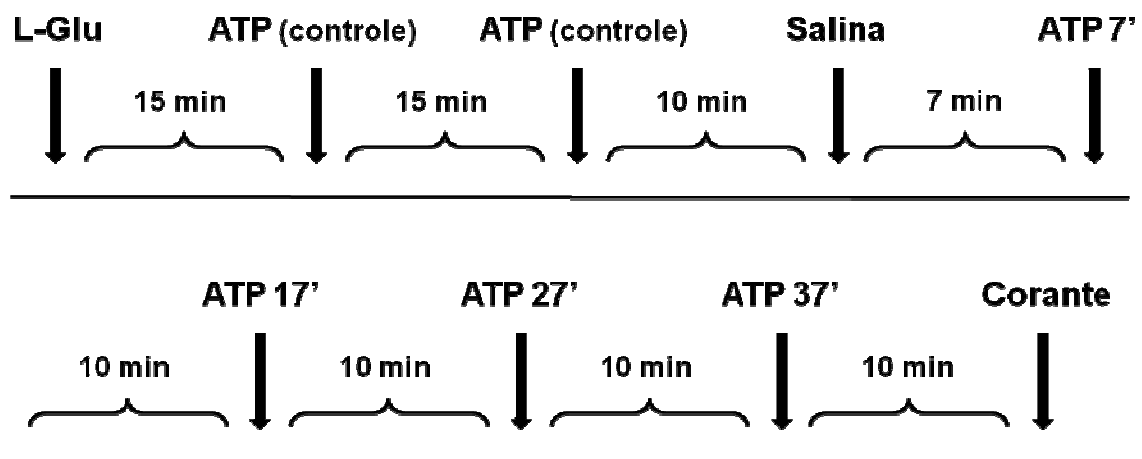
3. Efeitos da microinjeção de antagonista de receptores P2 sobre as respostas do ATP no NA

Este protocolo foi realizado com o objetivo de avaliarmos se a dose do antagonista purinérgico P2, escolhida para ser testada nos protocolos seguintes, era efetiva em atenuar as respostas geradas pelo ATP no NA e para avaliarmos o envolvimento dos receptores do tipo P2 na mediação das respostas cardiovasculares do ATP. Para isso, doses de ATP foram microinjetadas antes e após o bloqueio com PPADS no NA (n=5). Após 15 minutos à identificação do NA com L-Glutamato (5,0 nmol/50 nL), foram realizadas duas microinjeções unilaterais de ATP (3,5 nmol/50 nL) (controles), com intervalo de 15 minutos entre elas. Respeitando-se mais 15 minutos, foi realizado o bloqueio ipsilateral do NA com PPADS (500 pmol/100 nL). As microinjeções de ATP (3,5 nmol/50 nL) foram repetidas nos tempos de 7, 17, 27 e 37 minutos após bloqueio. Ao final dos registros, os animais receberam uma microinjeção unilateral de azul de Evans no NA para posterior identificação dos sítios de microinjeção. Foram utilizadas micropipetas de vidro de quatro vias contendo L-Glutamato, ATP, PPADS e o corante azul de Evans.



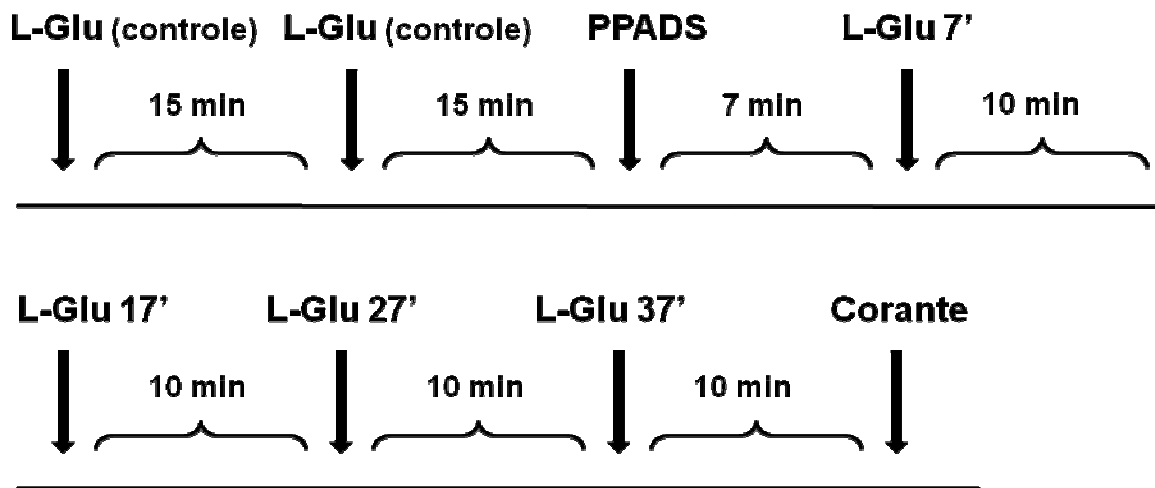
4. Efeitos da microinjeção de salina sobre as respostas do ATP no NA

Para a obtenção de um grupo controle, este protocolo foi realizado conforme descrito no item número 3 de protocolos experimentais, porém foi microinjetada salina (0,9%, 100 nL) (n=5) ao invés do bloqueio com PPADS.



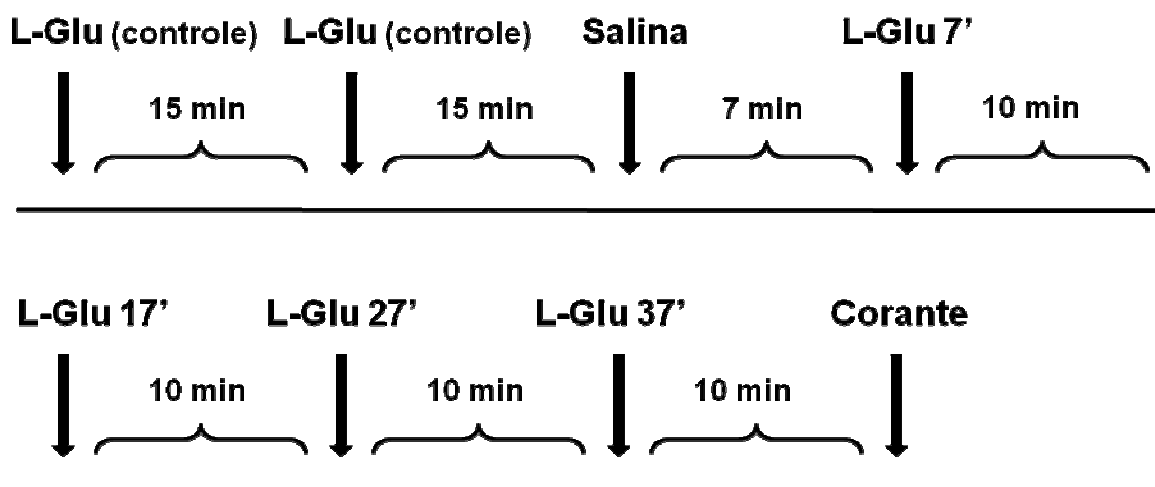
5. Efeitos da microinjeção de antagonista de receptores P2 sobre as respostas do L-Glutamato no NA

Para avaliar a possibilidade de interferência do sistema purinérgico na neurotransmissão glutamatérgica (Gu e MacDermott, 1997), realizamos este protocolo testando o efeito do bloqueio dos receptores P2 na mediação das respostas cardiovasculares do L-Glutamato no NA. Para isso, doses de L-Glutamato foram microinjetadas antes e após o bloqueio com PPADS no NA (n=9). Foram realizadas duas microinjeções unilaterais de L-Glutamato (5,0 nmol/50 nL) (controles), com intervalo de 15 minutos entre elas. Respeitando-se mais 15 minutos, foi realizado o bloqueio ipsilateral do NA com PPADS (500 pmol/100 nL). As microinjeções de L-Glutamato (5,0 nmol/50 nL) foram repetidas nos tempos de 7, 17, 27 e 37 minutos após bloqueio. Ao final dos registros, os animais receberam uma microinjeção unilateral de azul de Evans no NA para posterior identificação dos sítios de microinjeção. Foram utilizadas micropipetas de vidro de três vias contendo L-Glutamato, PPADS e o corante azul de Evans.



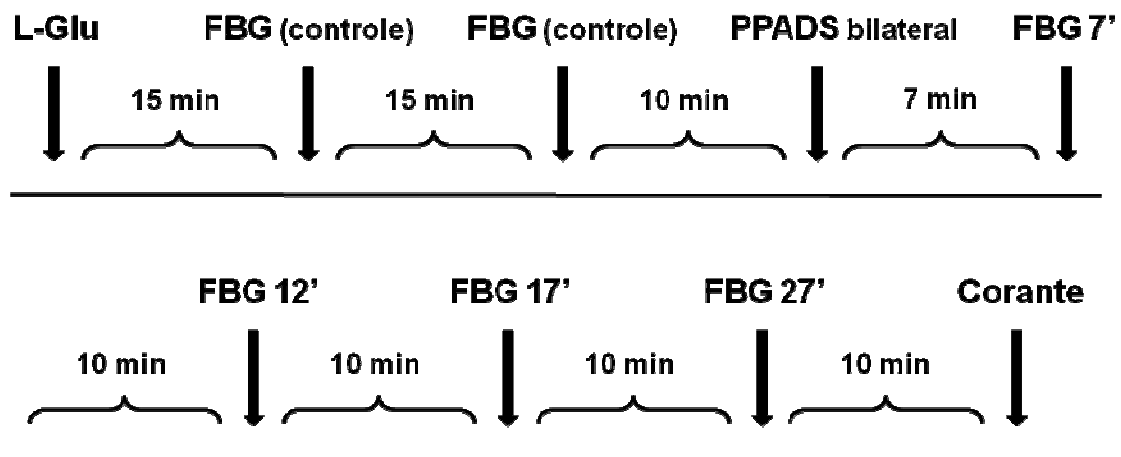
6. Efeitos da microinjeção de salina sobre as respostas do L-Glutamato no NA

Este protocolo foi feito para a obtenção de um grupo controle conforme o protocolo experimental de número 5, sendo microinjetada salina (0,9%, 100 nL) (n=7) no lugar do PPADS.



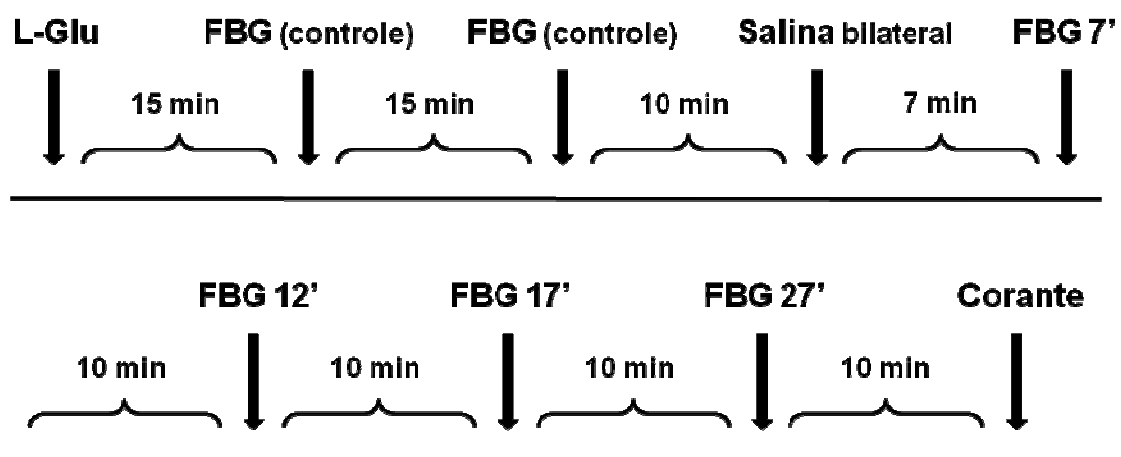
7. Efeitos da microinjeção de antagonista de receptores P2 sobre o reflexo Bezold-Jarisch no NA

Este protocolo foi realizado com o objetivo de avaliarmos a participação dos receptores purinérgicos P2 do NA na mediação das respostas do reflexo Bezold-Jarisch (n=9). Primeiramente, o NA foi identificado com microinjeções de L-Glutamato (5,0 nmol/50 nL). Respeitando um intervalo de 15 minutos, foi feita a ativação do reflexo Bezold-Jarisch com fenilbiguanida (12 µg/kg, i.v.) antes (duas injeções controles) e 7, 12, 17 e 27 minutos após a microinjeção bilateral do antagonista de receptores purinérgicos do tipo P2, PPADS (500 pmol/100 nL), no NA. Os efeitos nas respostas reflexas foram avaliados antes e após o bloqueio purinérgico. Ao final dos registros, os animais receberam uma microinjeção bilateral de azul de Evans no NA para posterior identificação dos sítios de microinjeção. Neste protocolo foram utilizadas micropipetas de vidro de três vias contendo L-Glutamato, PPADS e o corante azul de Evans.



8. Efeitos da microinjeção de salina sobre o reflexo Bezold-Jarisch no NA

Este protocolo foi feito para a obtenção de um grupo controle conforme o protocolo experimental de número 7, sendo microinjetada salina (0,9%, 100 nL) (n=9) no lugar do PPADS.



RESULTADOS

1. Efeitos da microinjeção de doses crescentes de ATP no NA

A figura 1 apresenta traçados de ratos representativos de seus grupos mostrando as mudanças na pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) em resposta a microinjeções unilaterais de doses crescentes de ATP (0,31; 2,5; 3,5; 5,0 e 6,0 nmol/50 nL) no NA. As microinjeções de ATP produziram resposta pressora e bradicárdica nas doses testadas (figuras 1 e 2). As respostas bradicárdicas apresentaram um padrão dose-dependente: 0,31 ($-18,6 \pm 5,2$ bpm); 2,5 ($-38,9 \pm 8,8$ bpm); 3,5 ($-134,6 \pm 18,9$ bpm); 5,0 ($-187,2 \pm 24,4$ bpm) e 6,0 nmol/50 nL ($-243,8 \pm 34,3$ bpm).

Com base nestes resultados, a dose de 3,5 nmol/50 nL foi definida como a dose efetiva de ATP a ser utilizada nos protocolos subsequentes.

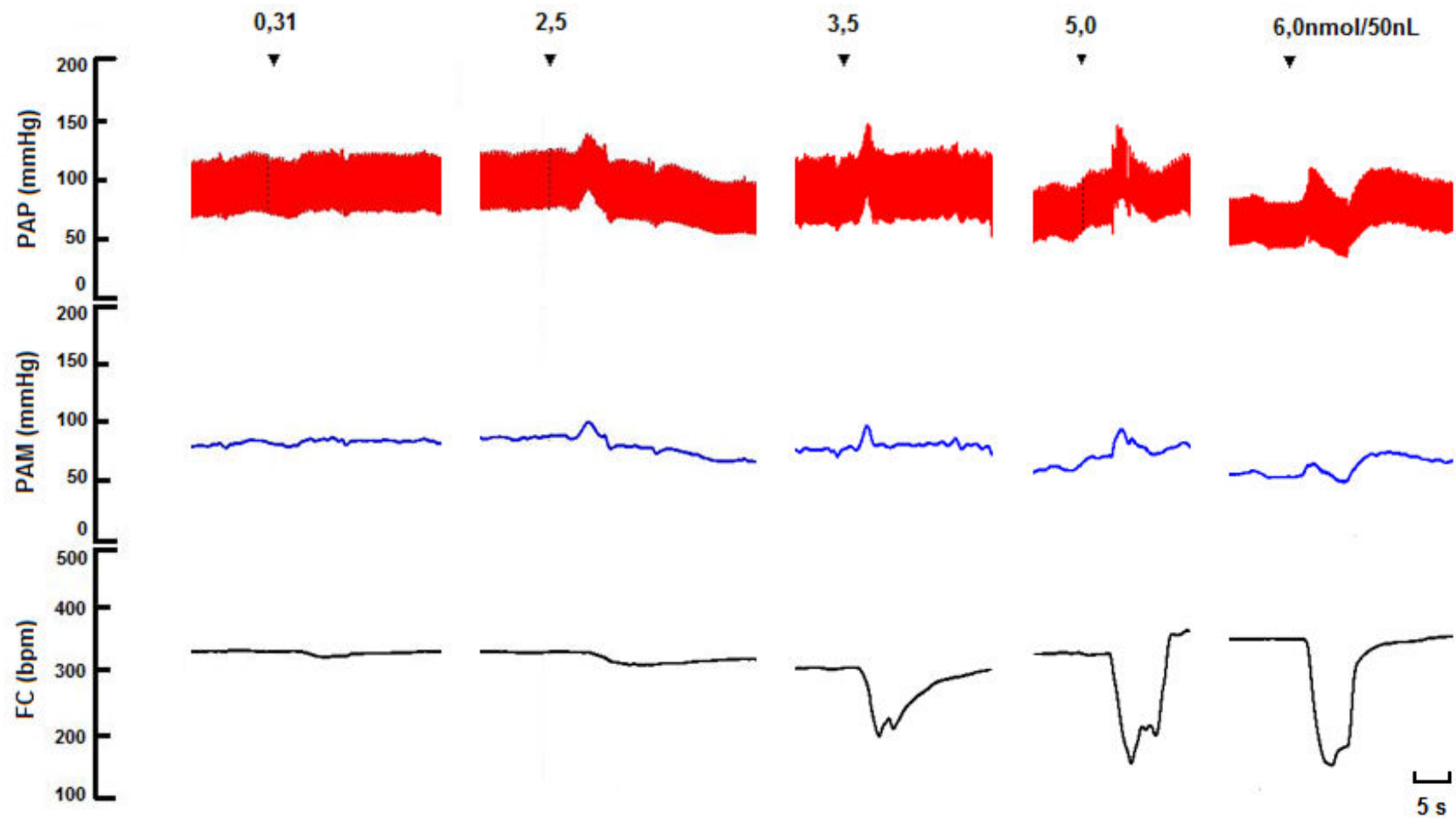
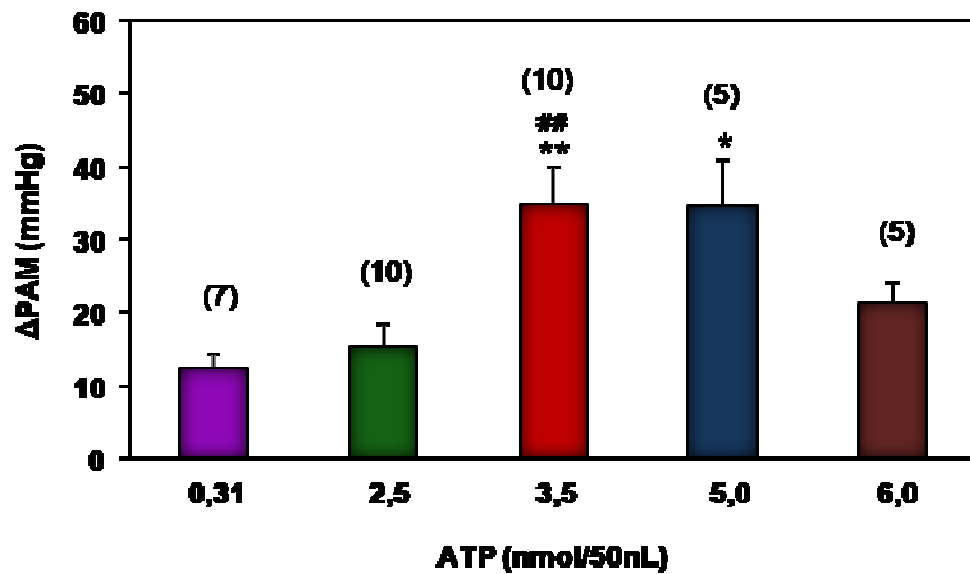


Figura 1. Registro de ratos representativos de seus grupos mostrando as mudanças na pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) em resposta à microinjeção unilateral de doses crescentes de ATP (0,31; 2,5; 3,5; 5,0 e 6,0 nmol/50 nL) no NA.

(A)



(B)

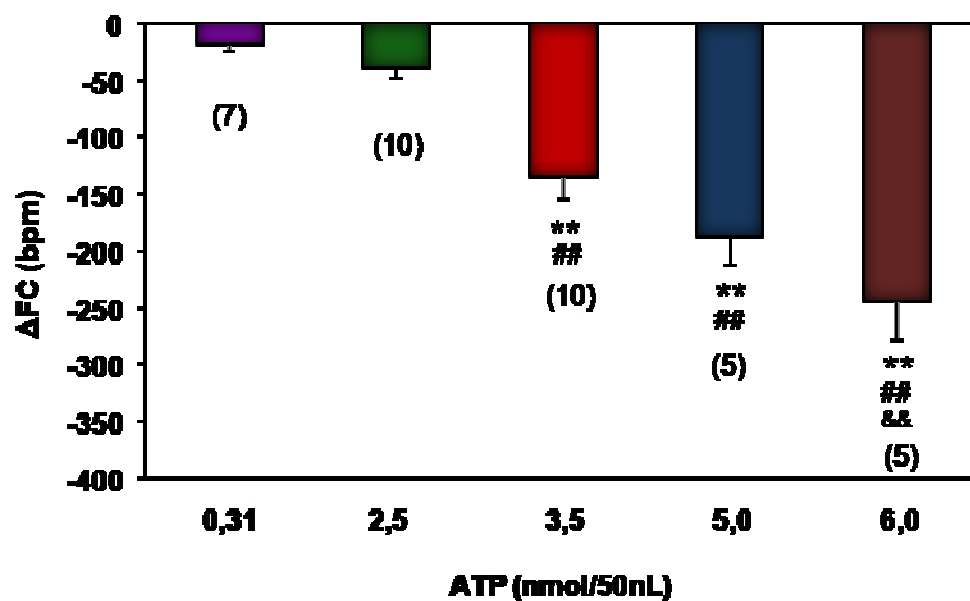


Figura 2. Deltas de pressão arterial média (PAM) (A) e frequência cardíaca (FC) (B) em resposta à microinjeção unilateral de doses crescentes de ATP (0,31; 2,5; 3,5; 5,0 e 6,0 nmol/50 nL) no NA de ratos. O número de ratos estudados em cada grupo está representado entre parênteses.

**p<0,01 e *p<0,05 indicam diferenças estatisticamente significantes em relação à dose de 0,31 nmol/50 nL.

##p<0,01 indica diferença estatisticamente significativa em relação à dose de 2,5 nmol/50 nL.

&&p<0,01 indica diferença estatisticamente significativa em relação à dose de 3,5 nmol/50 nL.

2. Bloqueio autonômico periférico com prazosin e metil-atropina

A figura 3 apresenta traçados de um rato representativo do grupo mostrando as mudanças na PAP, PAM e FC em resposta a microinjeções unilaterais de ATP (3,5 nmol/50 nL) antes e após bloqueio autonômico periférico do NA. As figuras 3 e 4 mostram que a resposta pressora produzida pela microinjeção de ATP foi substituída por uma discreta hipotensão 5 minutos após injeção intravenosa de prazosin (1,0 mg/kg) ($29,2 \pm 4,8$ vs. $-5,8 \pm 3,8$ mmHg, $p < 0,01$) e manteve-se significativamente reduzida 2 minutos após injeção intravenosa de metil-atropina (2,0 mg/kg) ($29,2 \pm 4,8$ vs. $4,7 \pm 2,2$ mmHg, $p < 0,01$). A resposta bradicárdica não foi significativamente alterada 5 minutos após prazosin ($-104,4 \pm 12,7$ vs. $-113,2 \pm 22,5$ bpm). Em contrapartida, 2 minutos após o bloqueio com metil-atropina, a resposta bradicárdica ao ATP foi abolida ($-104,4 \pm 12,7$ vs. $6,8 \pm 2,6$ bpm, $p < 0,01$) (figuras 3 e 4).

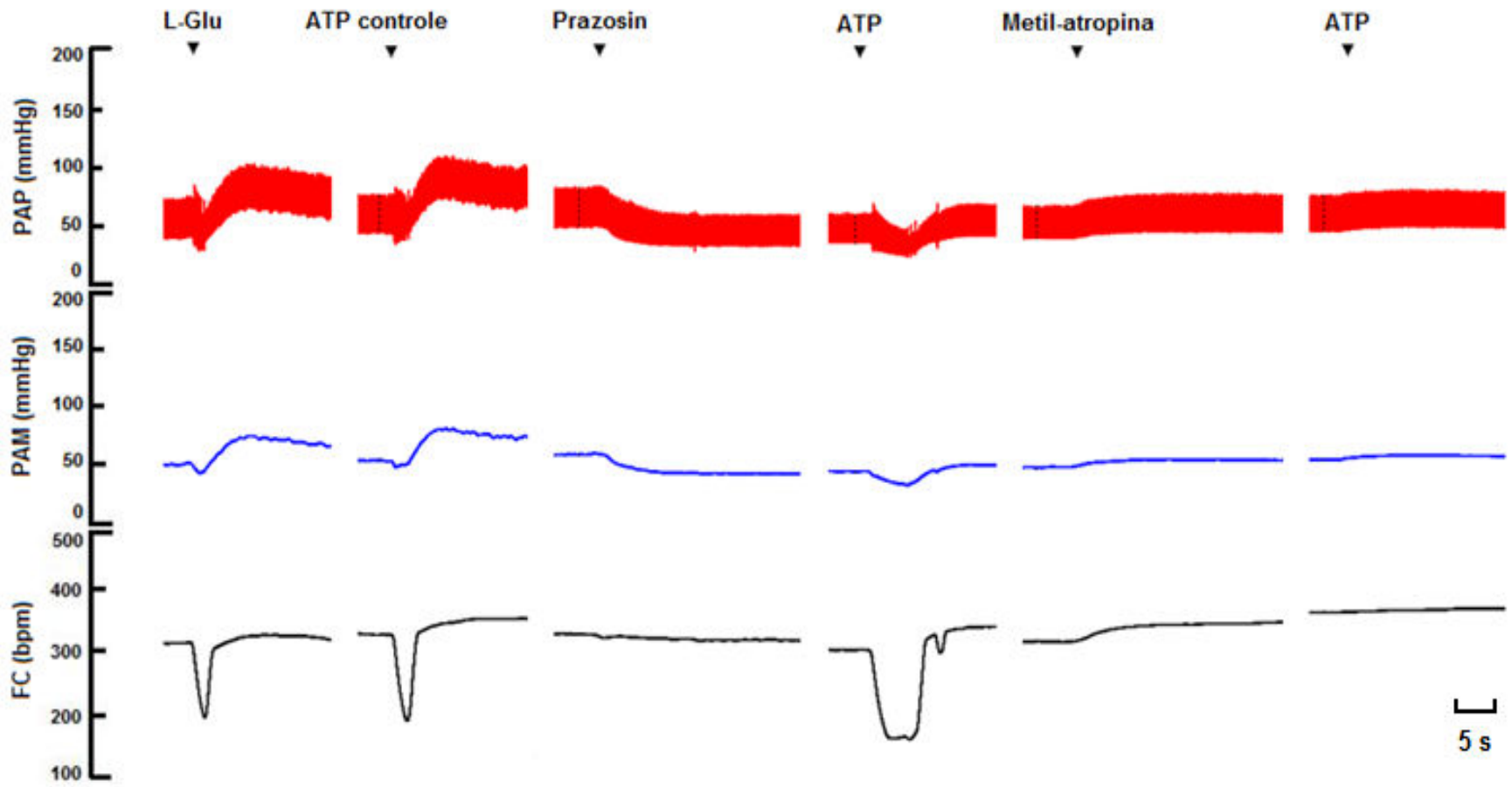
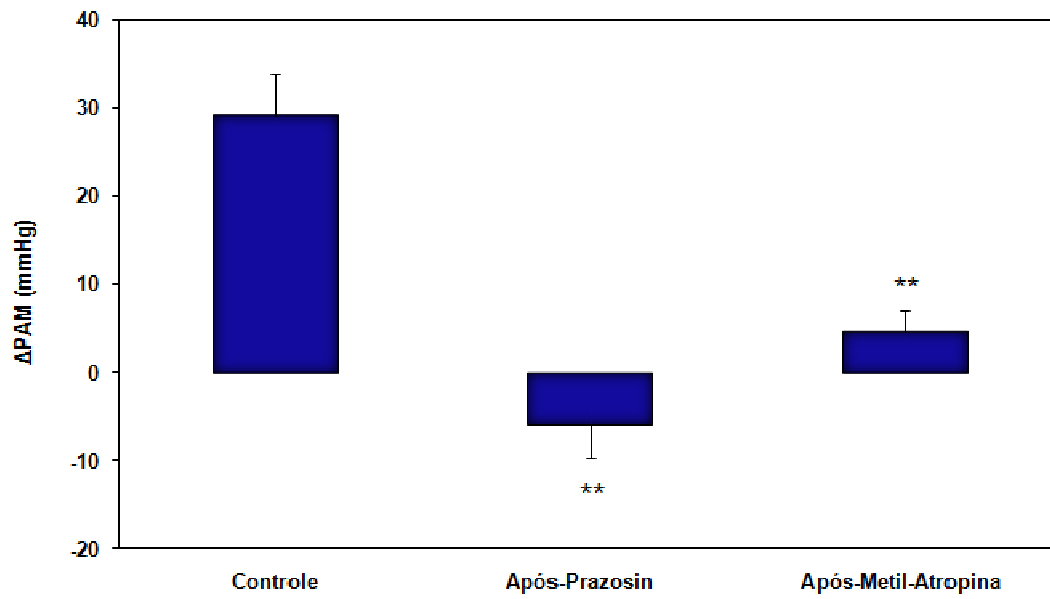


Figura 3. Registro de um animal representativo do grupo mostrando as mudanças na pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) induzidas pela microinjeção unilateral de ATP (3,5 nmol/50 nL) no NA antes (controle), 5 minutos após injeção intravenosa de prazosin (1,0 mg/kg) e 2 minutos após injeção intravenosa de metil-atropina (2,0 mg/kg).

(A)



(B)

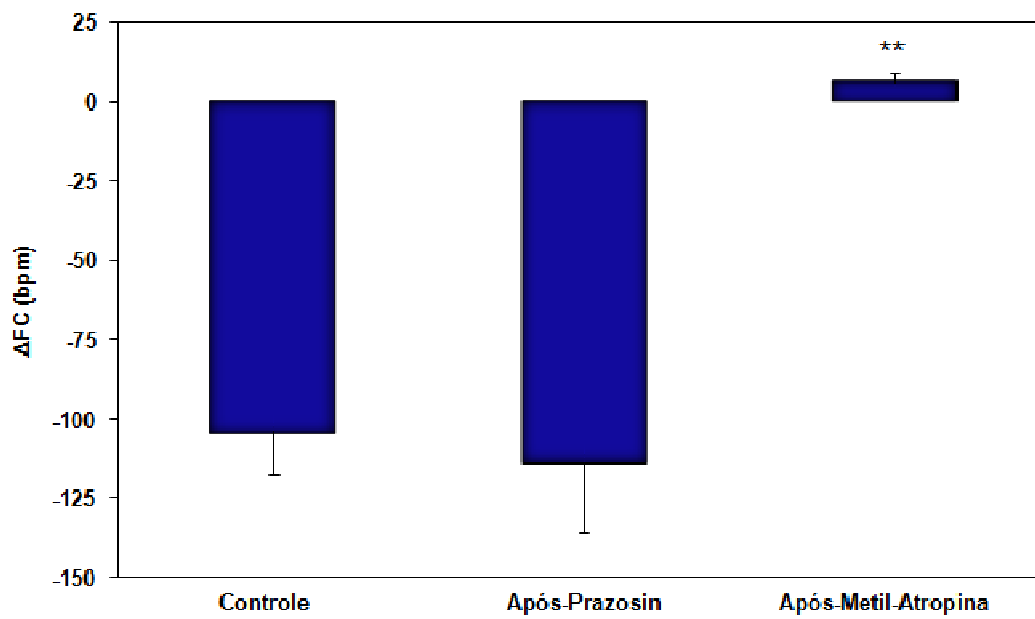


Figura 4. Deltas de pressão arterial média (PAM) (A) e frequência cardíaca (FC) (B) em resposta à microinjeção unilateral de ATP (3,5 nmol/50 nL) no NA antes (controle), 5 minutos após injeção intravenosa de prazosin (1,0 mg/kg) e 2 minutos após injeção intravenosa de metil-atropina (2,0 mg/kg), (n=6).

**p<0,01 indica diferença estatisticamente significativa comparada ao controle.

3. Efeitos da microinjeção de antagonista de receptores P2 sobre as respostas do ATP no NA

A figura 5 apresenta traçados de um rato representativo do grupo mostrando que a microinjeção unilateral de ATP (3,5 nmol/50 nL) no NA produziu resposta pressora e bradicárdica. Após a microinjeção do antagonista PPADS (500 pmol/100 nL) no NA ipsilateral, a resposta bradicárdica gerada pela microinjeção de ATP (3,5 nmol/50 nL) ($-164,6 \pm 30,0$ bpm) foi significativamente reduzida em 7' ($-83,7 \pm 27,4$ bpm, $p < 0,01$), 17' ($-87,5 \pm 24,9$ bpm, $p < 0,05$), 27' ($-68,6 \pm 13,4$ bpm, $p < 0,01$) e 37' ($-29,3 \pm 0,6$ bpm, $p < 0,01$). Em dois animais deste grupo (animais 1 e 2), a microinjeção de ATP foi repetida em 57', sendo observada uma tendência à recuperação da resposta de FC ($-33,1$ e $-48,3$ bpm, respectivamente). Nenhuma mudança estatisticamente significativa foi observada na resposta pressora gerada pela microinjeção de ATP (3,5 nmol/50 nL) em 7', 17', 27' e 37' após o bloqueio com PPADS (500 pmol/100 nL) no NA. Os dados deste protocolo experimental estão sumariados na figura 6.

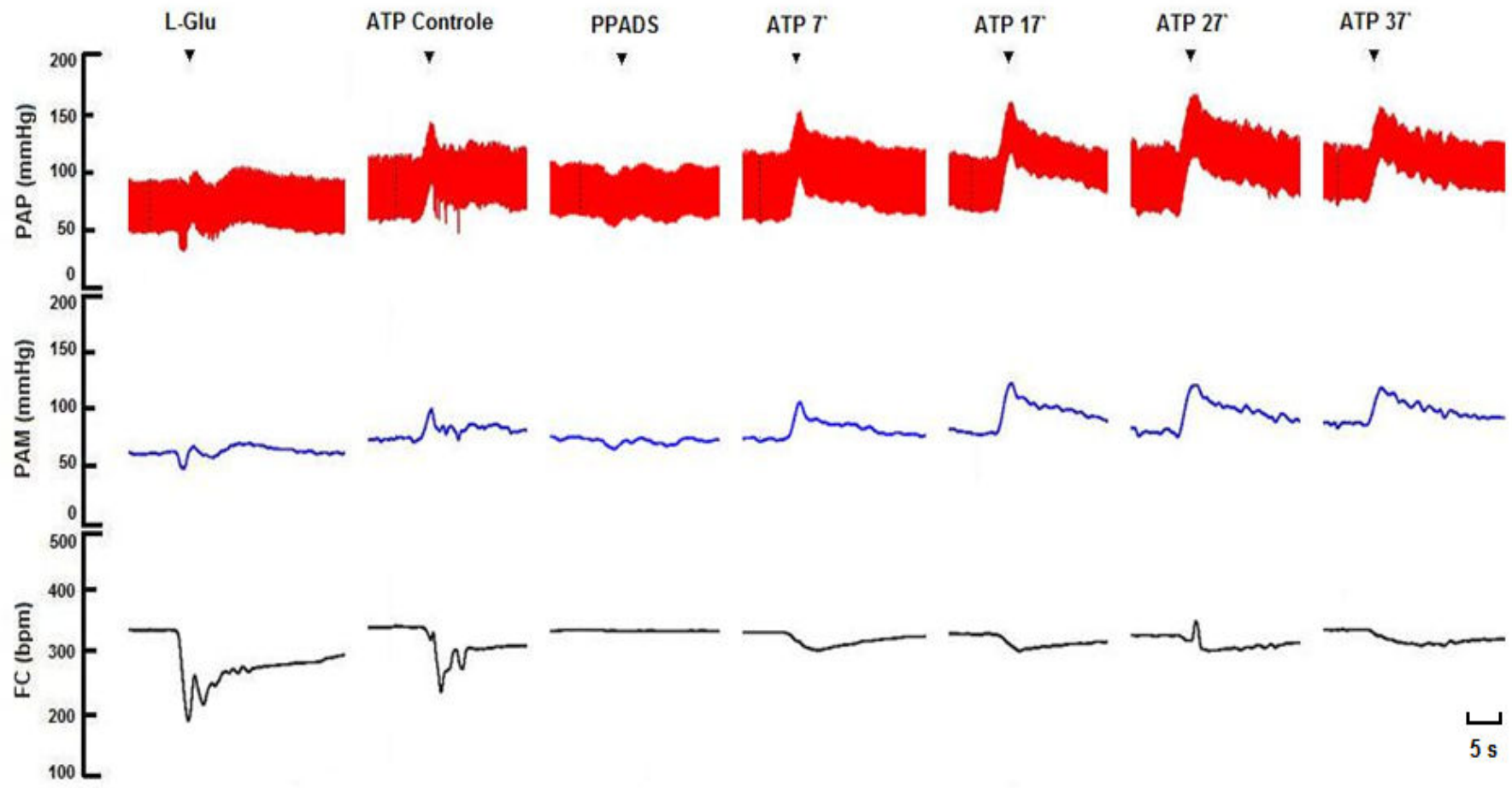
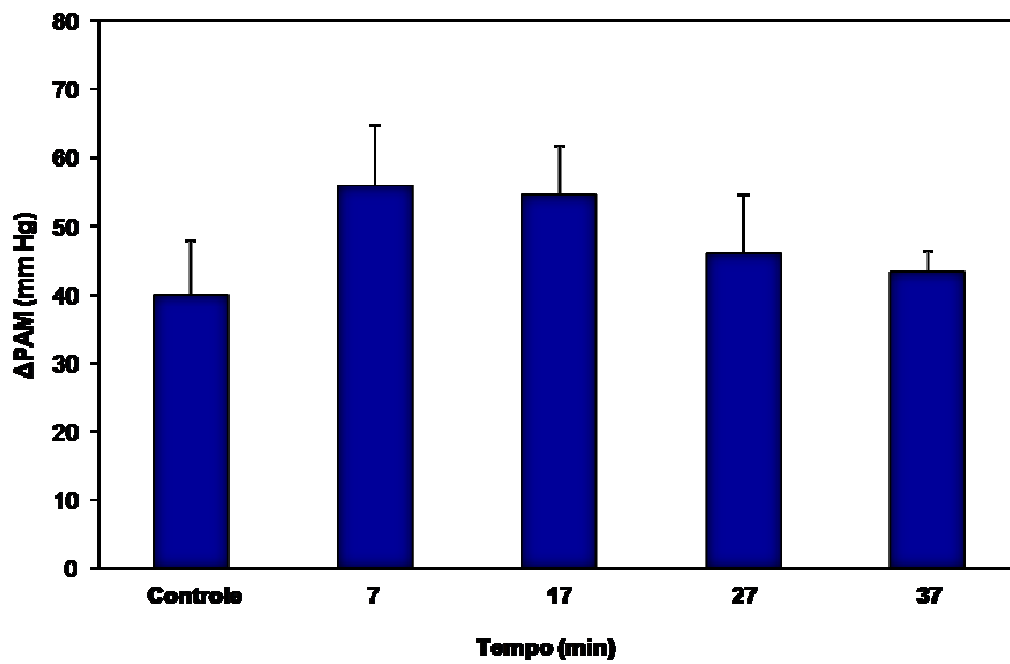


Figura 5. Traçado mostrando as mudanças na pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) induzidas pela microinjeção unilateral de ATP (3,5 nmol/50 nL) antes (controle) e após (7', 17', 27' e 37') o bloqueio do NA com PPADS (500 pmol/100 nL) em um rato do grupo.

(A)



(B)

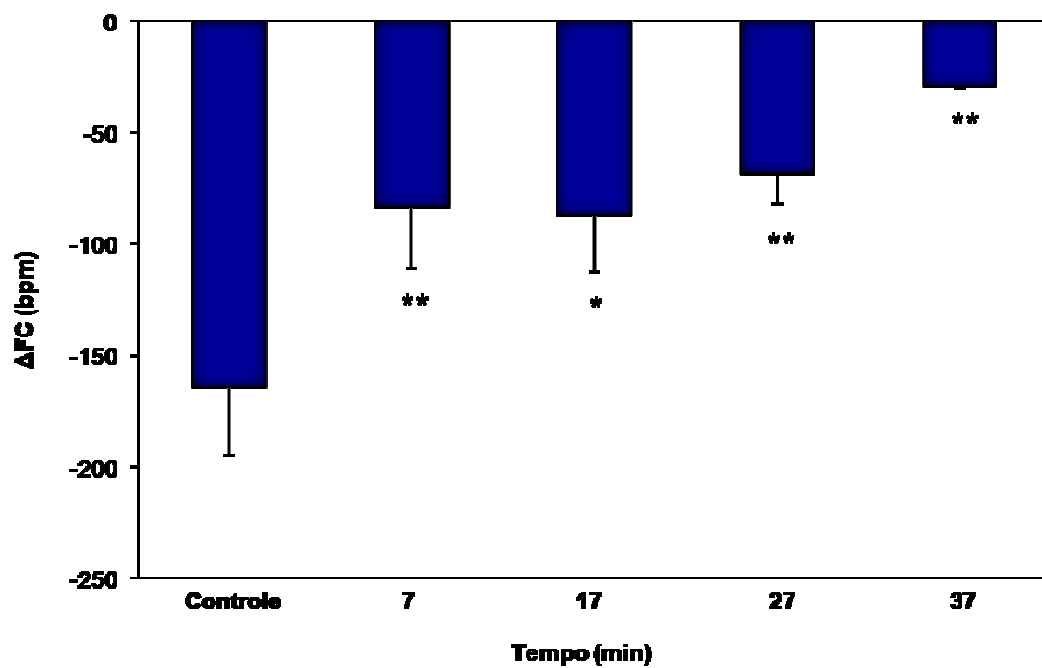


Figura 6. Deltas de pressão arterial média (PAM) (A) e frequência cardíaca (FC) (B) em resposta à microinjeção unilateral de ATP (3,5 nmol/50 nL) antes (controle) e após (7', 17', 27' e 37') o bloqueio do NA com PPADS (500 pmol/100 nL), (n=5).

**p<0,01 e *p<0,05 indicam diferenças estatisticamente significantes comparadas ao controle.

4. Efeitos da microinjeção de salina sobre as respostas do ATP no NA

A figura 7 apresenta um registro representativo de um animal deste grupo. Como podemos notar, a resposta pressora à microinjeção de ATP (3,5 nmol/50 nL) no NA não foi alterada aos 7', 17', 27' e 37' após a microinjeção ipsilateral de salina (0,9%, 50 nL) no NA (figuras 7 e 8). Do mesmo modo, a resposta bradicárdica gerada pela microinjeção de ATP (3,5 nmol/50 nL) em 7', 17', 27' e 37' após microinjeção de salina (0,9%, 50 nL) no NA não foi estatisticamente significativa em relação ao controle (figuras 7 e 8).

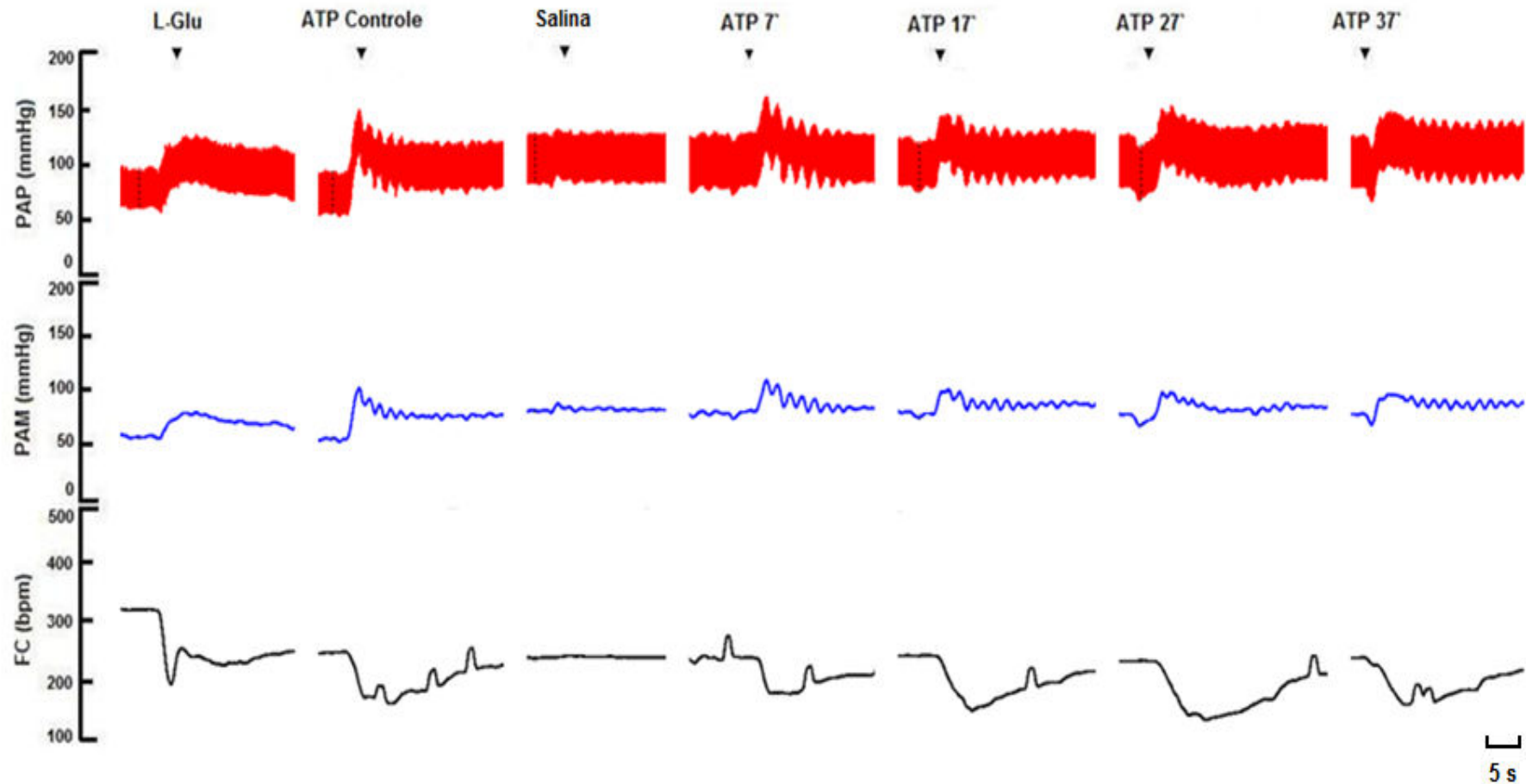
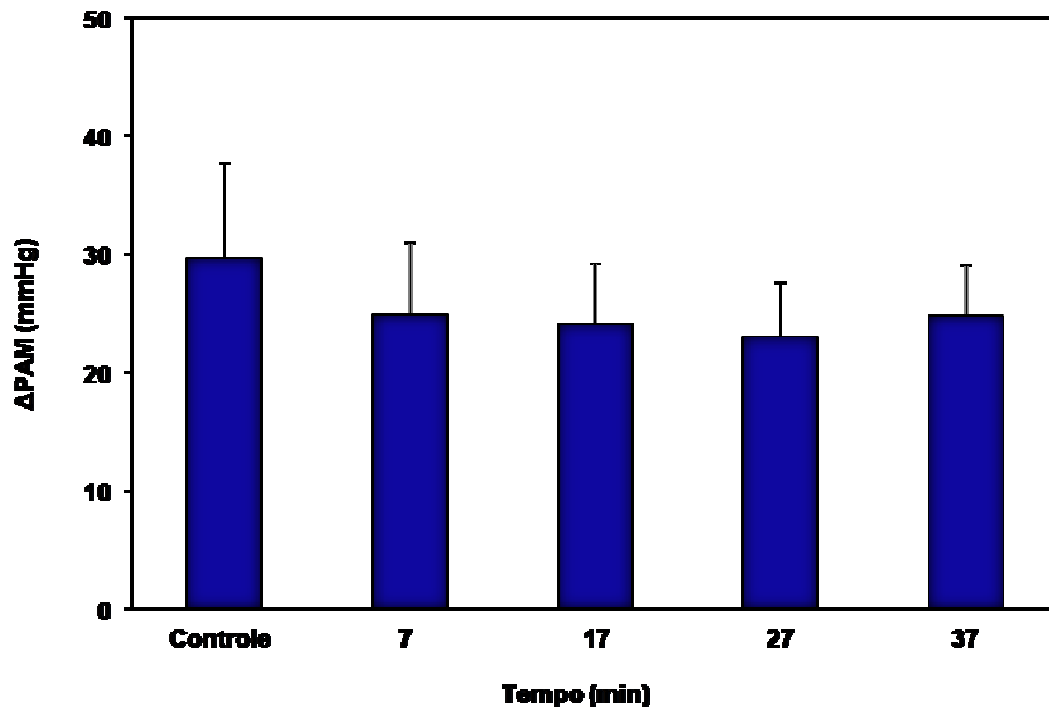


Figura 7. Registro de um animal representativo do grupo mostrando as mudanças na pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) induzidas pela microinjeção unilateral de ATP (3,5 nmol/50 nL) antes (controle) e após (7', 17', 27' e 37') a microinjeção de salina (0,9%, 100 nL) no NA.

(A)



(B)

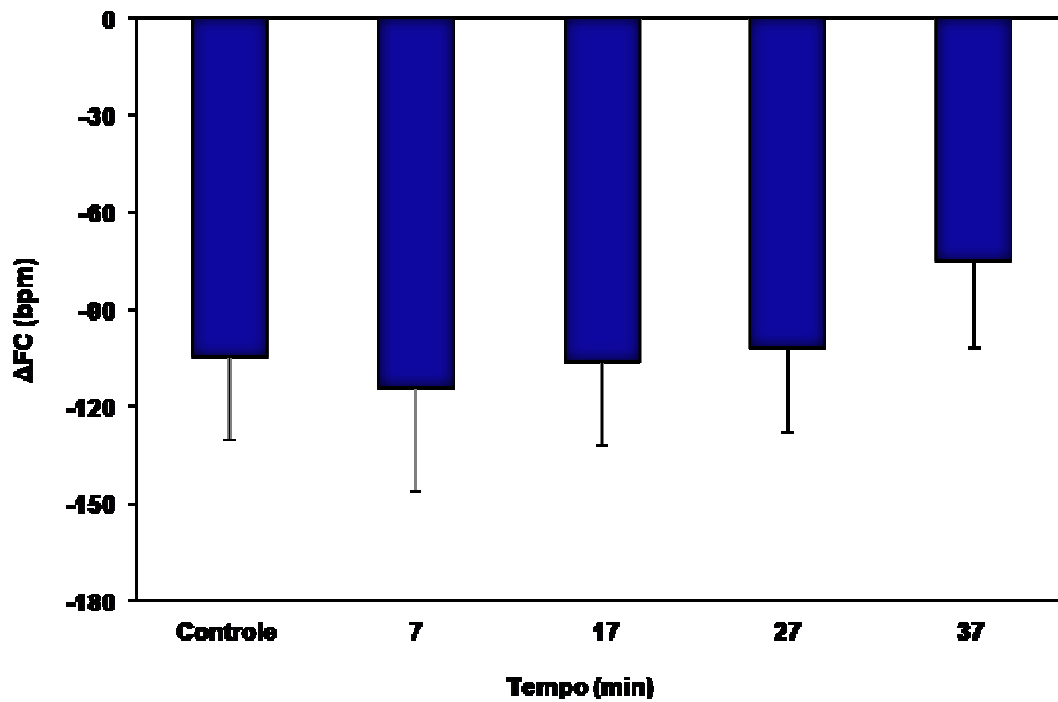


Figura 8. Deltas de pressão arterial média (PAM) (A) e frequência cardíaca (FC) (B) em resposta à microinjeção unilateral de ATP (3,5 nmol/50 nL) antes (controle) e após (7', 17', 27' e 37') a microinjeção de salina (0,9%, 100 nL) no NA, (n=5).

5. Efeitos da microinjeção de antagonista de receptores P2 sobre as respostas do L-Glutamato no NA

A figura 9 apresenta um traçado de um rato representativo deste grupo mostrando o efeito da microinjeção prévia de PPADS (500 pmol/100 nL) nas respostas cardiovasculares do L-Glutamato (5,0 nmol/50 nL) microinjetado no NA. A resposta pressora gerada pela microinjeção de L-Glutamato foi significativamente aumentada aos 7' ($60,0 \pm 3,3$ mmHg, $p < 0,01$) e reduzida aos 27' ($7,4 \pm 6,8$ mmHg, $p < 0,05$) e 37' ($2,5 \pm 5,7$ mmHg, $p < 0,01$) após o bloqueio com PPADS (500 pmol/100 nL) quando comparada ao controle ($26,0 \pm 6,7$ mmHg). Nenhuma alteração estatisticamente significativa sobre a resposta pressora foi observada aos 17' após o bloqueio. A resposta bradicárdica ao L-Glutamato se manteve aos 7' ($-136,8 \pm 28,2$ bpm), mas passou a ser reduzida aos 17' ($-49,9 \pm 22,3$ bpm, $p < 0,01$), 27' ($-23,2 \pm 10,2$ bpm, $p < 0,01$) e 37' ($-24,8 \pm 17,4$ bpm, $p < 0,01$) quando comparada ao controle ($-150,0 \pm 14,7$ bpm). Os dados deste protocolo experimental estão sumariados na figura 10.

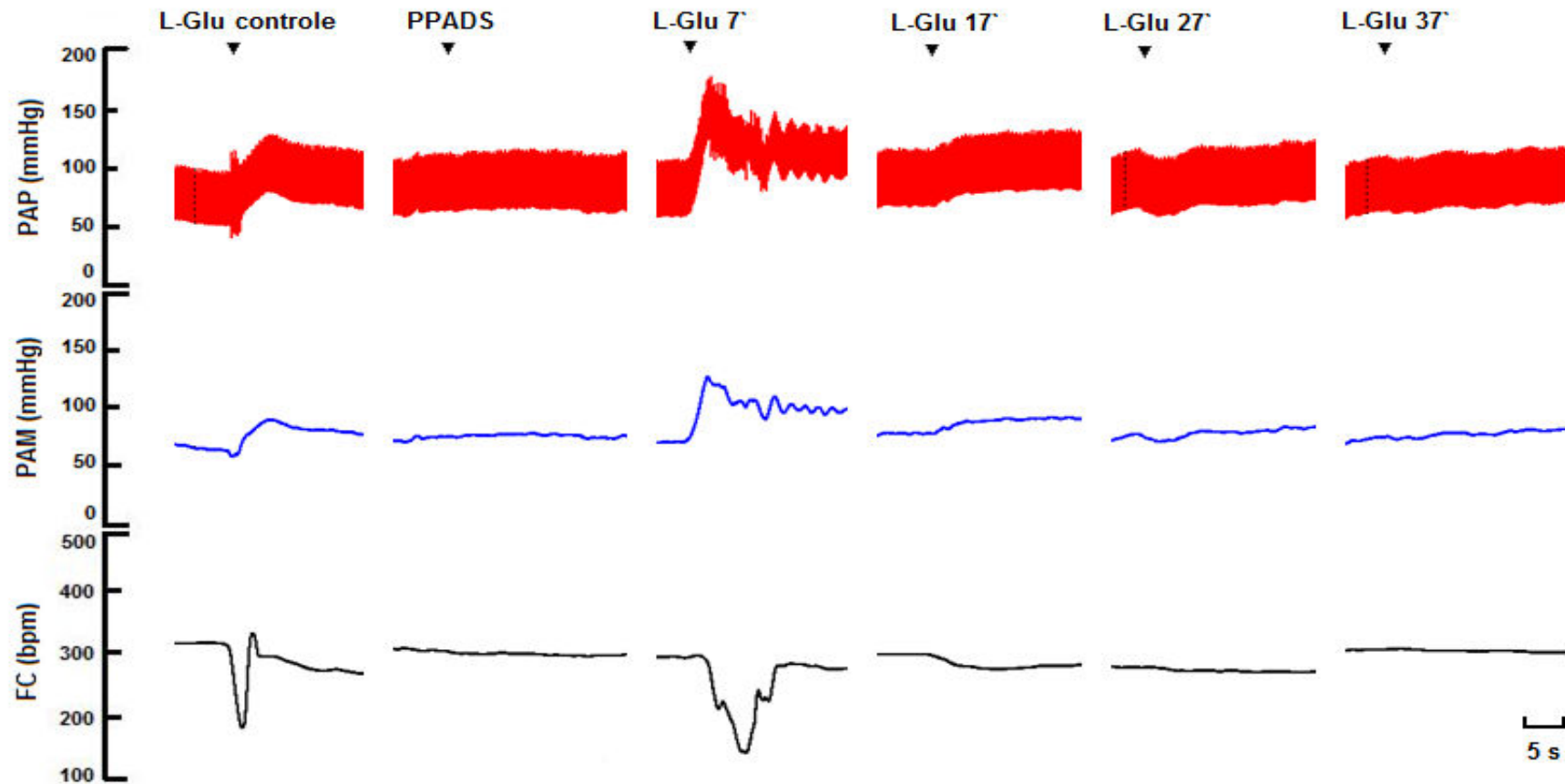
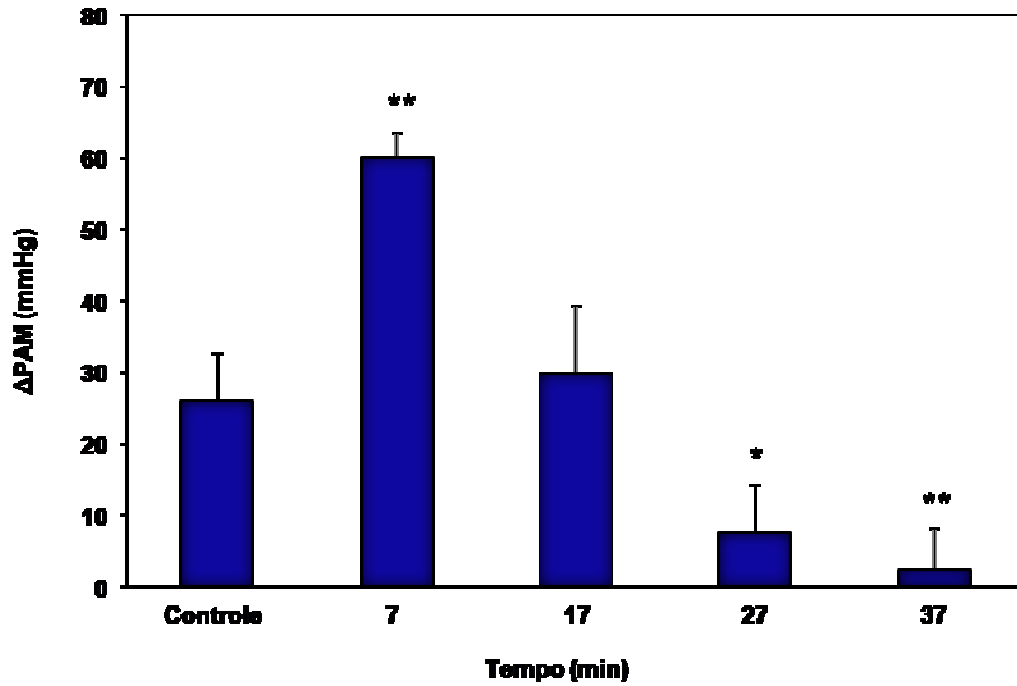


Figura 9. Registro de um rato representativo do grupo mostrando as mudanças na pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) induzidas pela microinjeção unilateral de L-Glutamato (5,0 nmol/50 nL) antes (controle) e após (7', 17', 27' e 37') o bloqueio do NA com PPADS (500 pmol/100 nL).

(A)



(B)

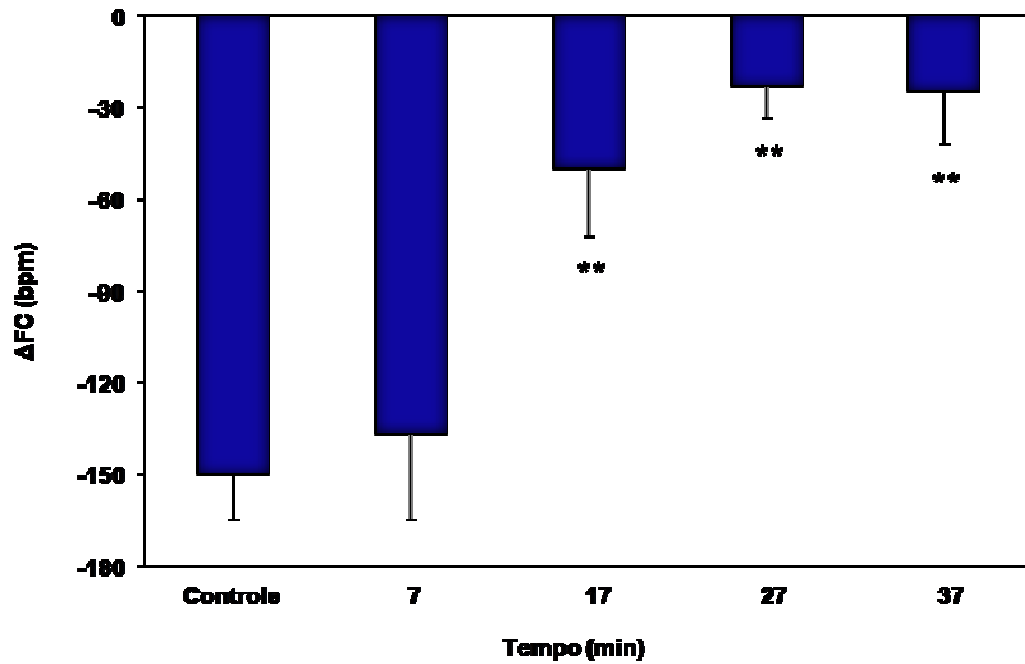


Figura 10. Deltas de pressão arterial média (PAM) (A) e frequência cardíaca (FC) (B) em resposta à microinjeção unilateral de L-Glutamato (5,0 nmol/50 nL) antes (controle) e após (7', 17', 27' e 37') o bloqueio do NA com PPADS (500 pmol/100 nL), (n=9).

**p<0,01 e *p<0,05 indicam diferenças estatisticamente significantes comparadas ao controle.

6. Efeitos da microinjeção de salina sobre as respostas do L-Glutamato no NA

A figura 11 apresenta um registro representativo de um animal deste grupo. A resposta pressora à microinjeção de L-Glutamato (5,0 nmol/50 nL) no NA não foi significativamente alterada aos 7', 17', 27' e 37' após a microinjeção ipsilateral de salina (0,9%, 50 nL) no NA (figuras 11 e 12). Em relação à resposta bradicárdica ao L-Glutamato (5,0 nmol/50 nL), esta não foi significativamente alterada aos 7', 17' e 27', mas houve uma discreta atenuação da resposta bradicárdica no tempo de 37' após microinjeção de salina (0,9%, 50 nL) no NA quando comparado ao controle (figuras 11 e 12).

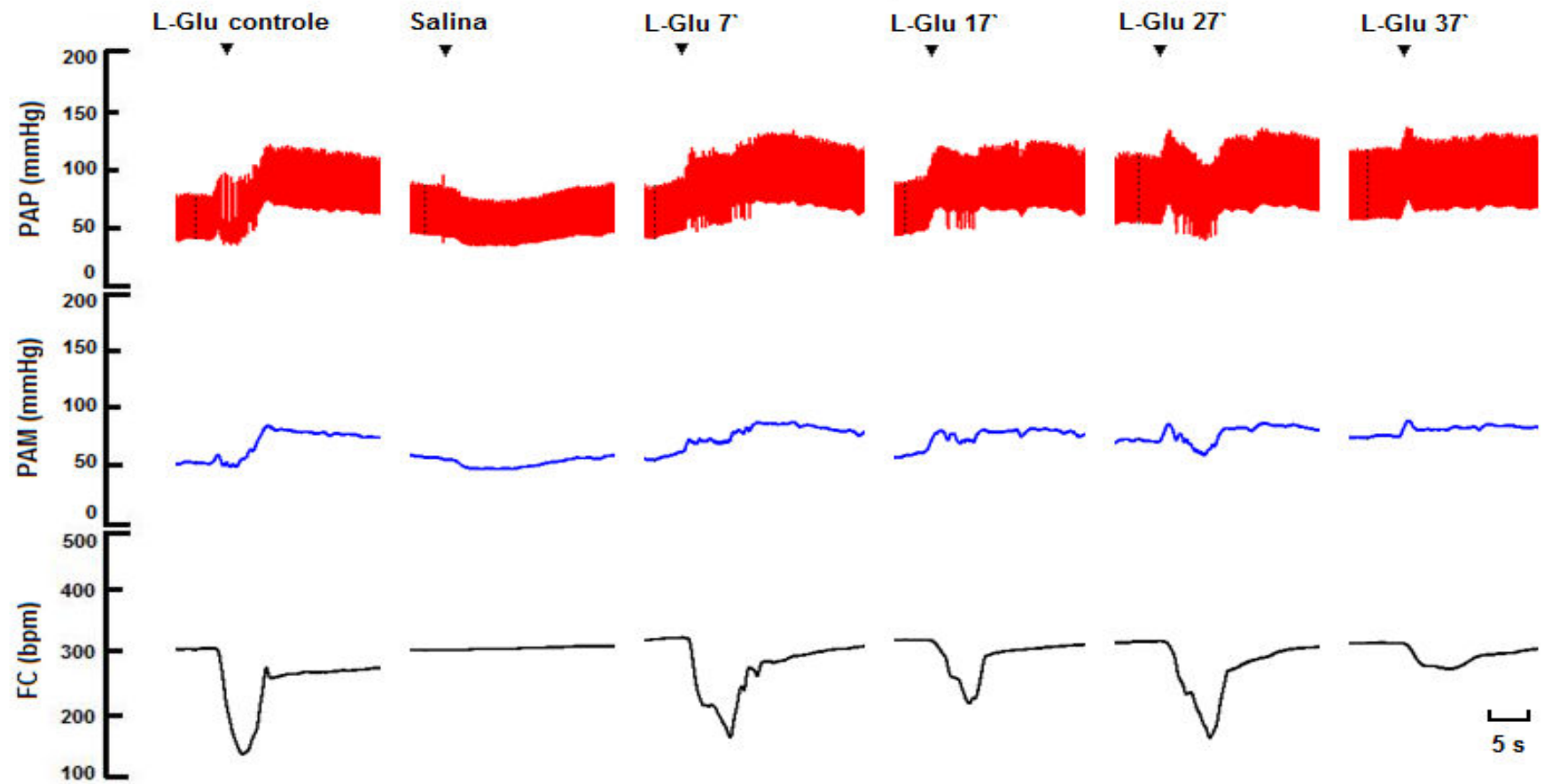
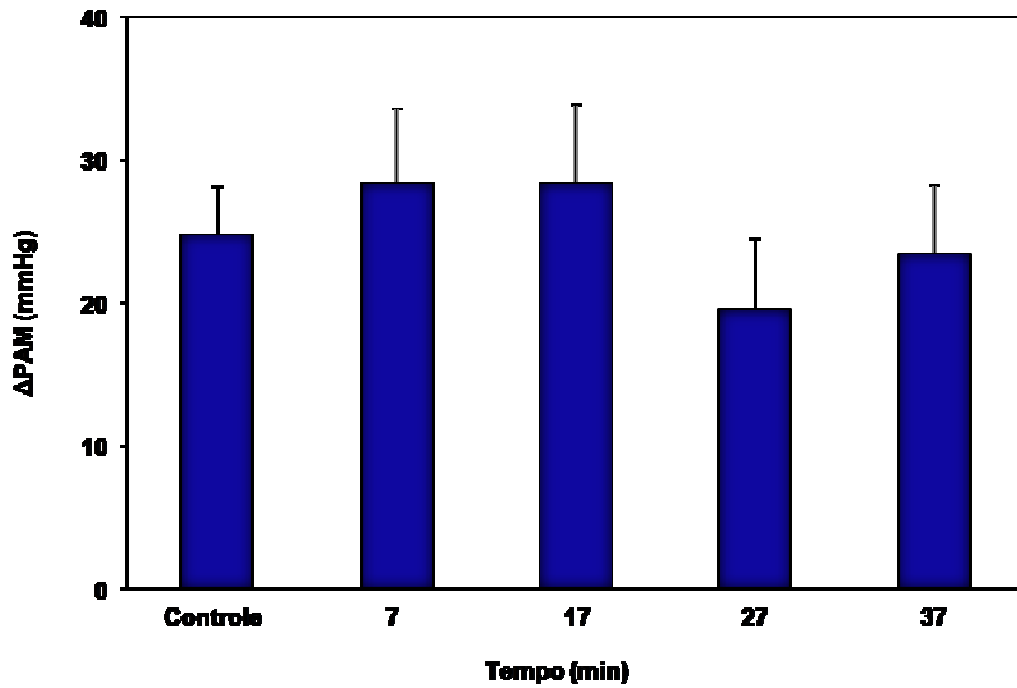


Figura 11. Traçado mostrando as mudanças na pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) induzidas pela microinjeção unilateral de L-Glutamato (5,0 nmol/50 nL) antes (controle) e após (7', 17', 27' e 37') a microinjeção de salina (0,9%, 100 nL) no NA em um rato do grupo.

(A)



(B)

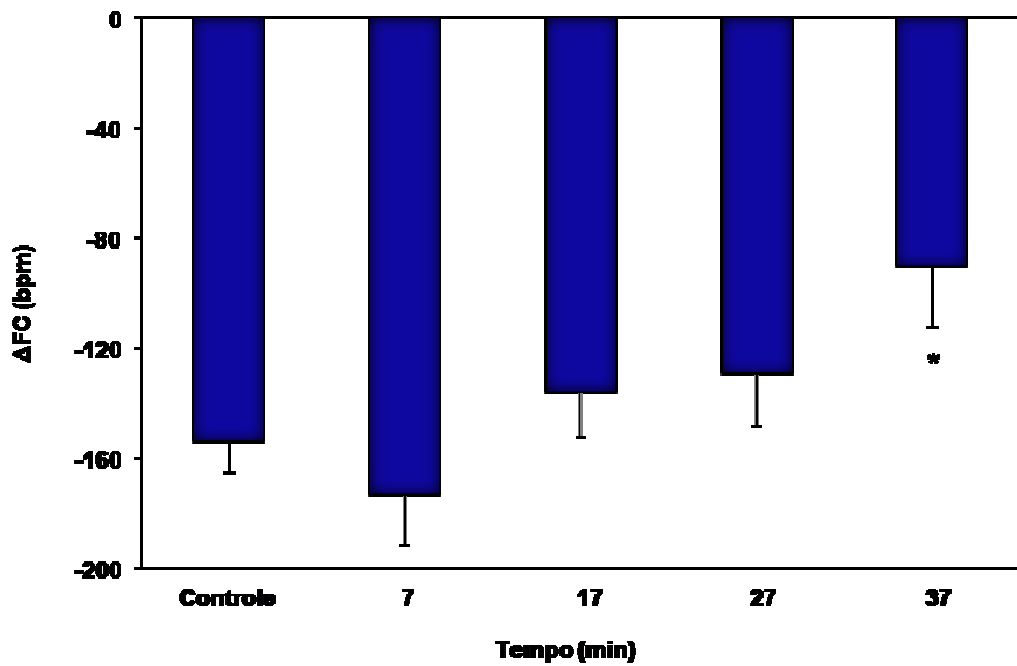


Figura 12. Deltas de pressão arterial média (PAM) (A) e frequência cardíaca (FC) (B) em resposta à microinjeção unilateral de L-Glutamato (5,0 nmol/50 nL) antes (controle) e após (7', 17', 27' e 37') a microinjeção de salina (0,9%, 100 nL) no NA, (n=7).

* $p < 0,05$ indica diferença estatisticamente significativa comparada ao controle.

7. Efeitos da microinjeção de antagonista de receptores P2 sobre o reflexo Bezold-Jarisch no NA

A figura 13 apresenta um registro representativo de um animal deste grupo mostrando o efeito da microinjeção prévia de PPADS (500 pmol/100 nL) no NA nas respostas cardiovasculares geradas pela ativação do reflexo Bezold-Jarisch com fenilbiguanida (12 µg/kg, i.v.). A microinjeção bilateral de PPADS no NA atenuou o percentual de queda da PAD e da FC gerado pelo reflexo Bezold-Jarisch aos 7' ($-47,4 \pm 4,0\%$ e $-21,6 \pm 4,4\%$), 12' ($-41,0 \pm 5,3\%$ e $-21,5 \pm 3,9\%$) e 17' ($-43,1 \pm 4,6\%$ e $-22,6 \pm 3,2\%$) após o bloqueio em relação ao controle ($-67,4 \pm 3,2\%$ e $-39,5 \pm 3,5\%$, respectivamente). Entretanto, as respostas do reflexo Bezold-Jarisch retornaram aos valores pré-bloqueio aos 27' pós-injeção (figuras 13 e 14).

A tabela 1 apresenta os valores basais de PAM e FC antes e após o bloqueio bilateral com PPADS (500 pmol/100 nL) no NA, mostrando que o bloqueio promoveu um discreto aumento na PAM basal e uma discreta redução na FC basal. Todavia, estes valores retornaram aos níveis pré-bloqueio antes da primeira injeção de fenilbiguanida.

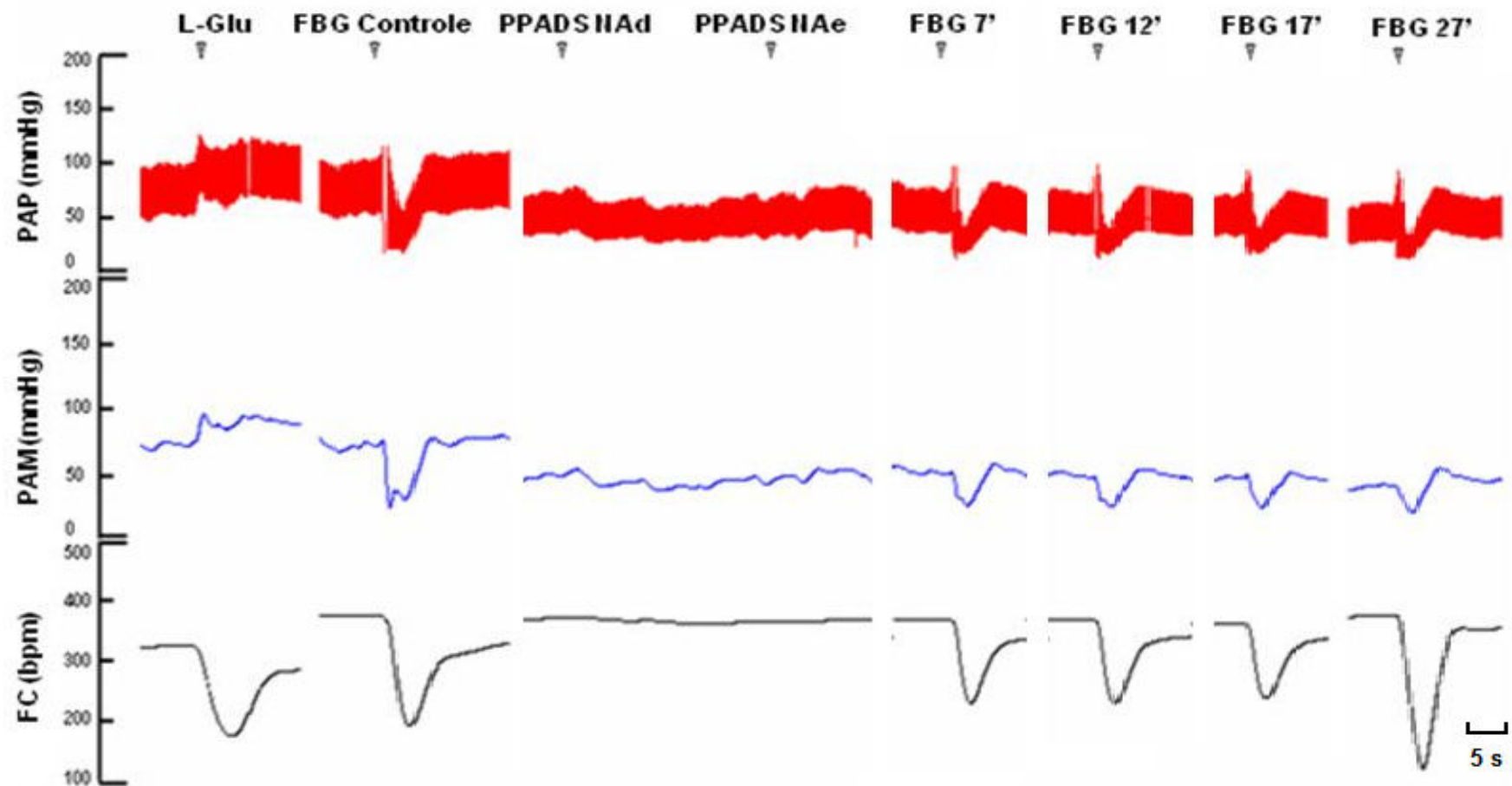
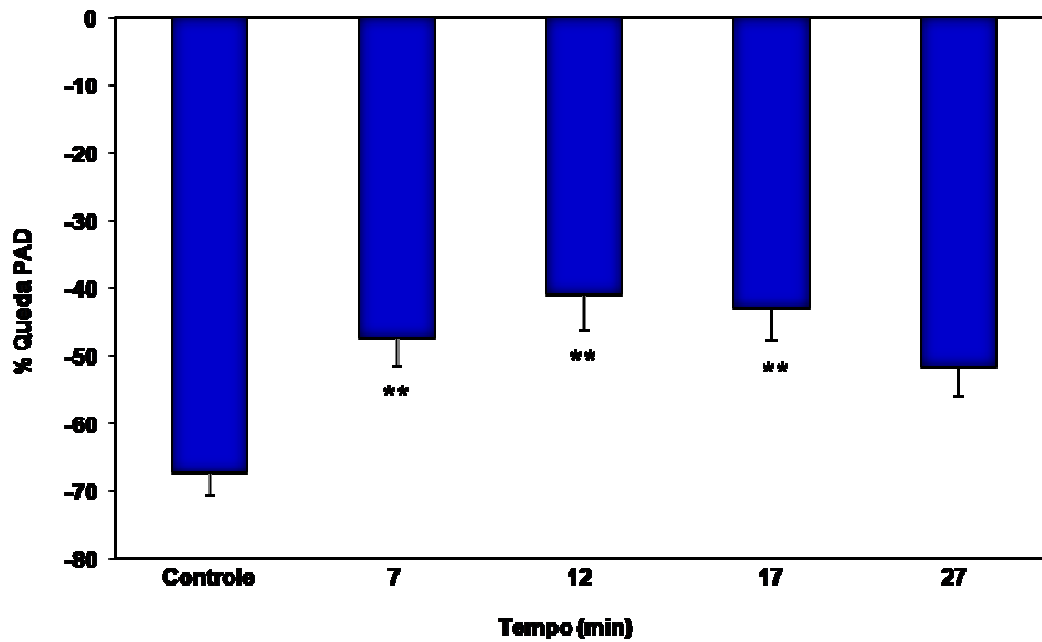


Figura 13. Registro de um rato representativo do grupo mostrando as mudanças na pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) induzidas pela fenilbiguanida (FBG, 12 $\mu\text{g}/\text{kg}$, i.v.) antes (controle) e após (7', 12', 17' e 27') o bloqueio bilateral do NA com PPADS (500 pmol/100 nL).

(A)



(B)

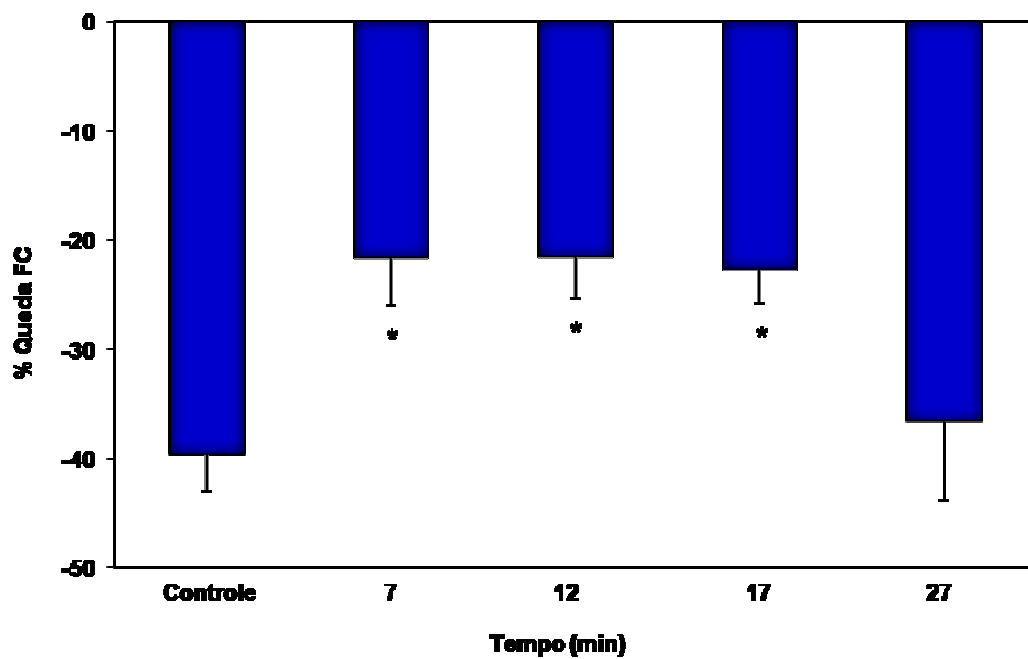


Figura 14. Quedas reflexas de pressão arterial diastólica (PAD) (A) e de frequência cardíaca (FC) (B), expressas na forma de percentual de queda, induzidas pela fenilbiguanida (12 µg/kg, i.v.) antes (controle) e após (7', 12', 17' e 27') o bloqueio bilateral do NA com PPADS (500 pmol/100 nL), (n=9).

**p<0,01 e *p<0,05 indicam diferenças estatisticamente significantes comparadas ao controle.

Tabela 1. Valores basais de pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) antes e após bloqueio bilateral com PPADS (500 pmol/100 nL) no NA.

*p<0,05 e **p<0,01 indicam diferenças estatisticamente significantes comparadas aos valores antes do bloqueio bilateral com PPADS.

BLOQUEIO BILATERAL COM PPADS				
	Antes		Após	
N	PAM (mmHg)	FC (bpm)	PAM (mmHg)	FC (bpm)
9	73,3 ± 8,5	335,0 ± 13,4	81,1* ± 9,5	313,6** ± 12,7

8. Efeitos da microinjeção de salina sobre o reflexo Bezold-Jarisch no NA

A figura 15 apresenta um registro representativo de um animal deste grupo. Os percentuais de queda da PAD gerados pelo reflexo Bezold-Jarisch aos 7' ($62,6 \pm 1,8 \%$), 12' ($-65,1 \pm 1,4 \%$), 17' ($63,2 \pm 2,5 \%$) e 27' ($67,0 \pm 3,3 \%$) após microinjeção de salina (0,9%, 50nL) no NA não apresentaram diferenças estatisticamente significantes em relação ao controle ($-72,7 \pm 2,0 \%$) (figura 16). Do mesmo modo, os percentuais de queda da FC gerados pelo reflexo Bezold-Jarisch aos 7' ($-35,3 \pm 4,9 \%$), 12' ($-29,2 \pm 3,9 \%$), 17' ($-40,2 \pm 6,1 \%$) e 27' ($-41,9 \pm 5,6 \%$) após microinjeção de salina (0,9%, 50nL) no NA não apresentaram diferenças estatisticamente significantes em relação ao controle ($-39,5 \pm 2,6 \%$) (figura 16).

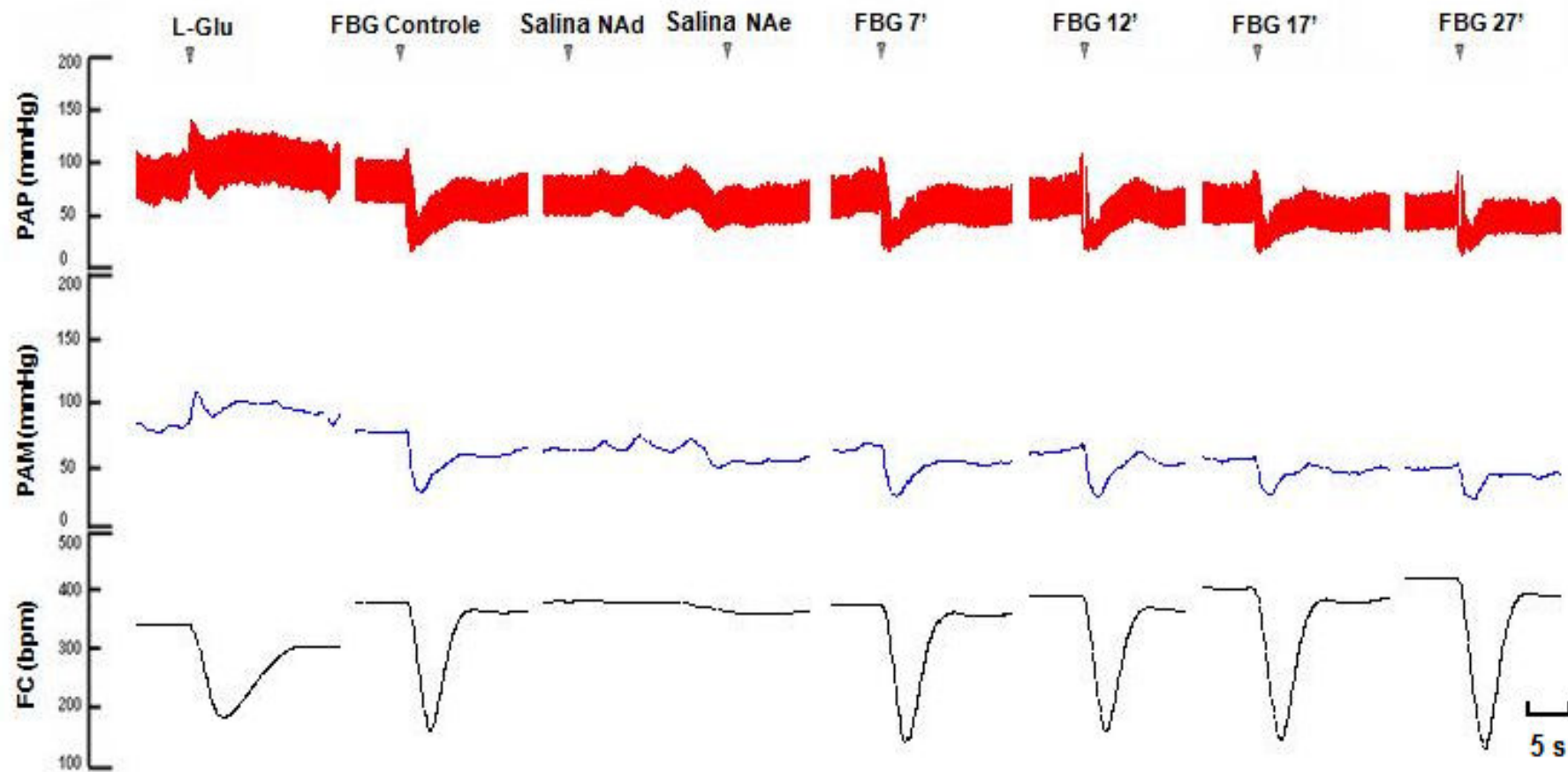
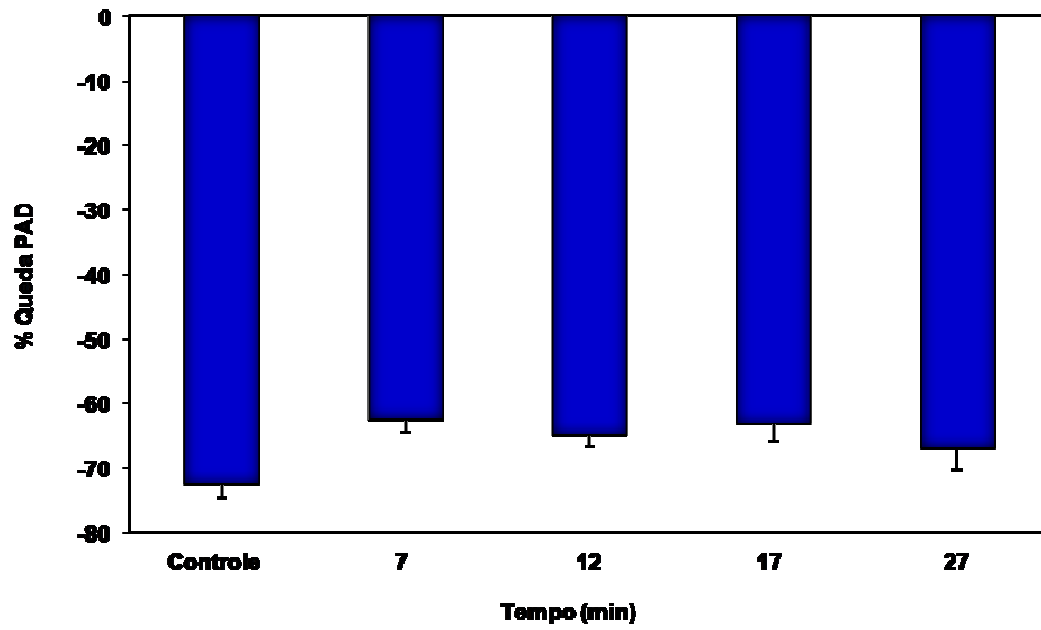


Figura 15. Traçado mostrando as mudanças na pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) induzidas pela fenilbiguanida (FBG, 12 µg/kg, i.v.) antes (controle) e após (7', 12', 17' e 27') a microinjeção de salina (0,9%, 100 nL) no NA em um rato do grupo.

(A)



(B)

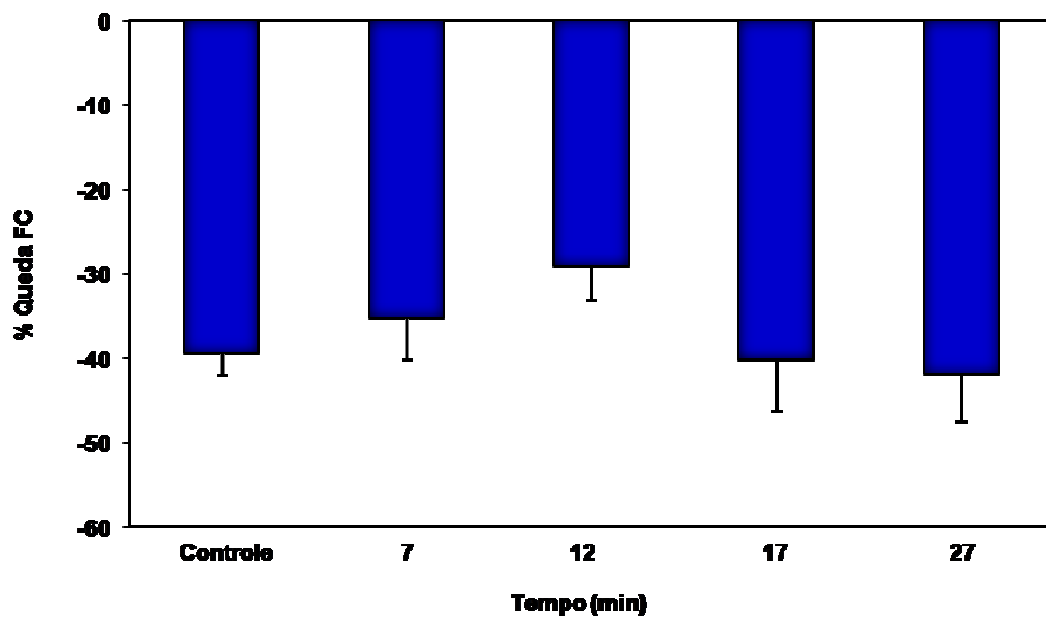


Figura 16. Quedas reflexas de pressão arterial diastólica (PAD) (A) e de frequência cardíaca (FC) (B), expressas na forma de percentual de queda, induzidas pela fenilbiguanida (12 $\mu\text{g}/\text{kg}$, i.v.) antes (controle) e após (7', 12', 17' e 27') a microinjeção bilateral de salina (0,9%, 50 nL) no NA, (n=9).

9. Fotomicrografia e representação esquemática

A figura 17 é uma fotomicrografia de uma secção transversal do tronco cerebral de um animal, mostrando um sítio de microinjeção no NA. Na mesma figura temos uma representação esquemática do NA, mostrando sua localização em relação ao parâmetro rostro-caudal (-13,80 mm) em relação ao bregma.

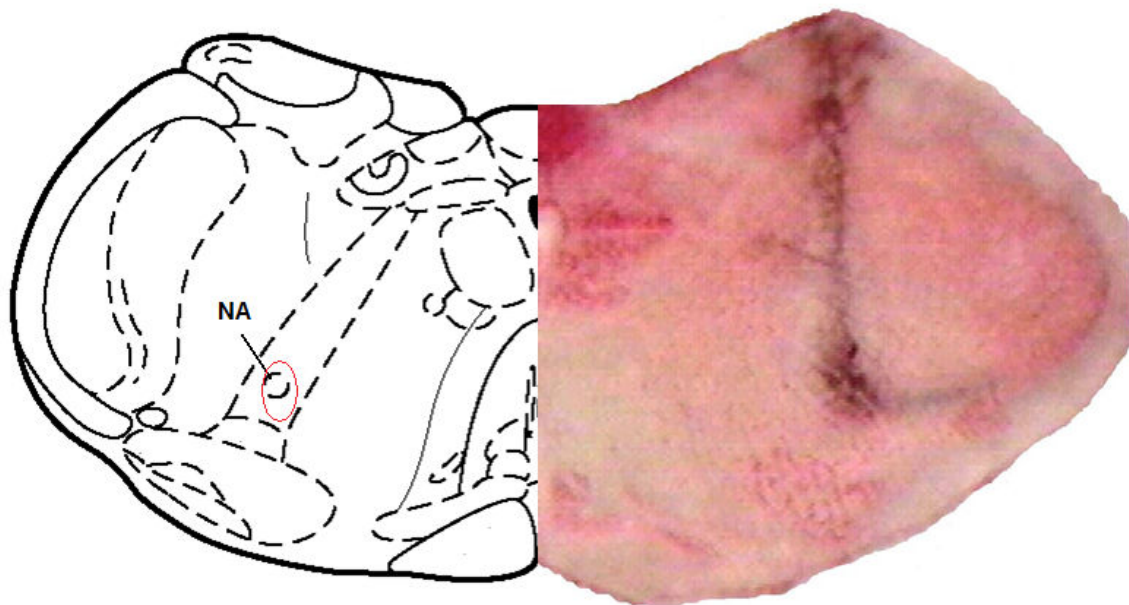


Figura 17. Representação esquemática do núcleo ambíguo (NA) em um corte histológico na região -13,8mm em relação ao bregma (à esquerda) (Modificado de Paxinos e Watson, 1998). Fotomicrografia de uma secção transversal do tronco cerebral de um animal, mostrando o sítio de microinjeção no NA (à direita) (aumento de 30,7x).

DISCUSSÃO

1. Efeitos da microinjeção de doses crescentes de ATP no NA e do bloqueio autonômico periférico com prazosin e metil-atropina sobre as respostas cardiovasculares do ATP

Nossos dados mostram que a microinjeção de ATP dentro do núcleo ambíguo (NA) de ratos anestesiados produziu importantes respostas cardiovasculares. Para todas as doses de ATP (0,31; 2,5; 3,5; 5,0 e 6,0 nmol/50 nL) microinjetadas no NA foi observada uma resposta pressora. Alguns estudos sugerem que o NA pode estar relacionado ao controle autonômico não somente de frequência cardíaca (FC), mas também de pressão arterial (PA) (Machado e Brody, 1992; 1990; 1988a; 1988b). No estudo de Machado e Brody (1988a) foi observado que a lesão eletrolítica do NA facilita o desenvolvimento da hipertensão em ratos com deafferenciação sinoaórtica e que a estimulação elétrica do NA produz um efeito bradicárdico e uma resposta pressora independente. Todavia, como os dados obtidos nesse estudo envolviam a estimulação elétrica do NA, poderia se questionar se tais efeitos não eram em decorrência da ativação de fibras de passagem. Entretanto, em um estudo subsequente, Machado e Brody (1988b) conseguiram reproduzir esses resultados com a lesão de corpos celulares do NA induzida pelo ácido kaínico e com a estimulação química e elétrica do NA, o que sugere que os efeitos observados no estudo anterior não parecem ser em decorrência da ativação de fibras de passagem. Nesse estudo, a lesão de corpos celulares do NA com o ácido kaínico gerou aumento da pressão arterial após deafferenciação sinoaórtica, sugerindo uma influência inibitória do NA sobre o tono vasomotor simpático. Adicionalmente, nesse estudo, a estimulação química (L-Glutamato) e elétrica do NA produziu bradicardia e aumento da PA, sugerindo tanto a presença de neurônios cardioinibitórios quanto de neurônios relacionados à excitação simpática no NA de ratos.

Em contrapartida, não pode ser descartada a possibilidade que a resposta pressora observada possa ser em decorrência de uma limitação metodológica. Com o volume utilizado nos experimentos (50 nL), é possível que as soluções de ATP microinjetadas no NA poderiam se difundir para outros núcleos, alcançando assim diferentes sub-populações de neurônios e interneurônios.

Considerando esta hipótese, uma região que poderia estar sendo atingida pelo extravasamento das soluções de ATP seria o campo tegumentar lateral (LTF). O LTF é considerado uma das estruturas geradoras da atividade simpática, junto com o bulbo ventrolateral rostral (RVLM) e o núcleo caudal da rafe (Gebber, 1990). Estudos feitos no rato sugerem uma função do LTF na regulação cardiovascular (Yardley *et al.*, 1989; Korkola e Weaver, 1993; Cochrane e Nathan, 1993). Em um estudo de Marchenko e Sapru (2003) em ratos decerebrados e com desnervação sinoaórtica, microinjeções de L-Glutamato no LTF e na formação reticular adjacente produziram respostas pressoras, consistentes com outros estudos (Chai *et al.*, 1988; Lin *et al.*, 1989; Yardley *et al.*, 1989), e bradicárdicas. As respostas bradicárdicas foram mais evidentes em áreas do LTF circundando o núcleo motor dorsal do vago (DMV) e o NA. Portanto, não podemos descartar a possibilidade de que o ATP poderia estar agindo no NA e também alcançando o LTF. É importante ressaltar, entretanto, que microinjeções fora do campo envolvendo o NA não foram capazes de gerar as respostas cardiovasculares características da ativação deste núcleo.

As diferentes doses de ATP (0,31; 2,5; 3,5; 5,0 e 6,0 nmol/50 nL) também produziram uma resposta bradicárdica, indicando que as microinjeções atingiram os neurônios da formação externa do NA, os quais contêm os neurônios pré-ganglionares parassimpáticos vagais (Loewy e Spyer, 1990). Sustentando estes resultados, estudos anatômicos têm demonstrado a existência de receptores purinérgicos tanto no NA quanto no DMV (Fong *et al.*, 2002; Ashour e Deuchars, 2004; Yao *et al.*, 2000). Vários subtipos de receptores P2 têm sido identificados no NA, como P2Y₁ (Fong *et al.*, 2002), P2X₂, P2X₄ e P2X₅ (Yao *et al.*, 2000). A ativação de receptores purinérgicos em outros núcleos bulbares produziu respostas cardiovasculares semelhantes. Estudos envolvendo microinjeções de α,β -metileno ATP, agonista de receptor P2X, e 2-metilatio ATP, agonista de receptor P2, no núcleo do trato solitário (NTS) de ratos anestesiados (Ergene *et al.*, 1994), o qual contém neurônios funcionalmente ligados aos neurônios pré-ganglionares parassimpáticos do NA (Loewy e Spyer, 1990), produziram resposta hipotensora e bradicárdica. Outro estudo mais recente de Paula e colaboradores (2004) mostrou que a

microinjeção de ATP no NTS de ratos acordados também produz resposta bradicárdica, mas ao invés de uma resposta hipotensora uma resposta hipertensora foi observada. Desta forma, o ATP e os receptores P2 parecem estar envolvidos no processamento das respostas parassimpáticas em diferentes núcleos bulbares.

Todavia, poderia se questionar se as respostas bradicárdicas à microinjeção de ATP no NA não poderiam ser reflexas às alterações pressoras observadas. Para avaliarmos esta possibilidade, promovemos o bloqueio autonômico periférico com prazosin e metil-atropina e avaliamos o efeito sobre as respostas cardiovasculares do ATP no NA. Por meio deste protocolo, pudemos observar que a resposta pressora gerada pela microinjeção de ATP no NA parece ser realmente devido à simpatoexcitação, pois a injeção intravenosa de prazosin, antagonista α_1 -adrenérgico, aboliu a resposta pressora. De fato, a microinjeção de ATP após prazosin produziu uma discreta resposta hipotensora, a qual parece ser essencialmente dependente da permanência da intensa resposta bradicárdica. Em contrapartida, a resposta bradicárdica do ATP não parece ser uma resposta reflexa à resposta pressora observada, haja vista que, após o bloqueio da resposta pressora pelo prazosin, a bradicardia gerada pela microinjeção de ATP persistiu. A bradicardia foi abolida somente após bloqueio dos receptores muscarínicos com metil-atropina. Deste modo, nossos resultados sugerem que a resposta bradicárdica do ATP parece ser realmente devido à ativação dos neurônios pré-ganglionares vagais do NA.

Há que se considerar também a possibilidade de que as respostas cardiovasculares geradas pela microinjeção de ATP no NA possam ser em decorrência do catabolismo do ATP em adenosina pelas 5'-ectonucleotidases, a qual poderia resultar em uma ativação subsequente de receptores P1 de adenosina no NA. Vários estudos indicam uma importante função da adenosina e dos receptores de adenosina na neurotransmissão/neuromodulação no sistema nervoso central (SNC) (Phillis *et al.*, 1997; Ralevic e Burnstock, 1998). Estudos realizados em preparações anestesiadas ou *in vitro* (Dale *et al.*, 2002; Kato e Shigetomi, 2001; Miles *et al.*, 2002; St. Lambert *et al.*, 1997) indicaram que as respostas geradas pela aplicação de ATP dentro de tecidos neurais foram mediadas pela adenosina. Em um estudo de Kato e Shigetomi (2001)

realizado em fatias do tronco cerebral, um efeito inibitório do ATP foi mostrado em neurônios do NTS, o qual não foi reproduzido pelo α,β -metileno ATP, análogo não-hidrolisável do ATP, e também não foi afetado pelo PPADS. Nesse mesmo estudo, Kato e Shigetomi (2001) foram capazes de bloquear este efeito inibitório do ATP com antagonistas de receptor A1 de adenosina, 8-ciclopentilteofilina (8-PT) ou 8-ciclopentil-1,3-dipropilxantina (DPCPX), indicando que este efeito inibitório do ATP foi mediado por receptores de adenosina A1. Em contrapartida, estudo de de Paula e Machado (2001) mostrou que o antagonista seletivo de receptores de adenosina A1, DPCPX, microinjetado no NTS bloqueou completamente a resposta cardiovascular gerada pela microinjeção de adenosina no NTS, mas não teve efeito nas respostas cardiovasculares geradas pela ativação quimiorreflexa (De Paula e Machado, 2001) ou pela microinjeção de ATP no NTS (De Paula *et al.*, 2004), indicando que em ratos acordados as respostas cardiovasculares à microinjeção de adenosina no NTS são mediadas por receptores A1 e sugerindo que os efeitos da microinjeção de ATP no NTS não são consequência da ação da adenosina em receptores A1. Nosso estudo não avaliou o papel dos receptores de adenosina na mediação das respostas cardiovasculares geradas pela microinjeção de ATP no NA. Entretanto, no protocolo em que foi utilizado o antagonista de receptores purinérgicos do tipo P2, observamos uma atenuação da resposta bradicárdica do ATP. Ainda que o papel dos receptores de adenosina não possa ser descartado, estes resultados sugerem que as respostas cardiovasculares da ativação do NA pelo ATP não parecem ser em decorrência da sua degradação à adenosina.

2. Efeitos da microinjeção de antagonista de receptores P2 sobre as respostas do ATP e do L-Glutamato no NA

No presente estudo, a resposta pressora gerada pela microinjeção de ATP no NA não foi bloqueada ou atenuada pelo PPADS. Uma questão que deve ser considerada é a seletividade e eficácia do antagonista. O antagonismo por PPADS tem sido investigado em vários tecidos e células (Lambrecht, 1996; Lambrecht et al., 1996; Ralevic e Burnstock, 1998). O PPADS é aceito como um antagonista não-seletivo (mas não universal) de receptor P2 (Ralevic e Burnstock, 1998), bloqueando recombinantes homoméricos P2X₁, P2X₂, P2X₃ e P2X₅, heteroméricos P2X_{2/3} e P2X_{1/5}, e receptores P2Y₁ com similar potência. Entretanto, O PPADS é pouco ou não-efetivo para homoméricos P2X₄, P2X₆ e P2X₇, heteroméricos P2X_{4/6} e receptores P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆ e P2Y₁₁ (Communi et al., 1999). Sendo assim, é possível que a ausência de efeito do bloqueio com PPADS sobre a resposta pressora do ATP possa ser devido ao fato que os subtipos de receptores purinérgicos envolvidos nesta resposta possam não estar sendo bloqueados pelo PPADS. Outro fato que deve ser avaliado é que o efeito pressor do ATP após PPADS pode estar relacionado à ativação de um diferente sistema neurotransmissor, considerando que o ATP pode agir como um co-transmissor com diferentes neurotransmissores (Burnstock, 1986).

Sobre a resposta bradicárdica do ATP observamos que a microinjeção de PPADS foi efetiva em atenuar esta resposta. Estes dados indicam que a resposta bradicárdica do ATP parece envolver a participação de receptores P2 na mediação desta resposta, haja vista que o PPADS foi capaz de atenuar a bradicardia do ATP. Todavia, como mencionado anteriormente, a ausência de bloqueio completo desta resposta pode ser devido ao fato de o PPADS não ser efetivo em bloquear todos os subtipos de receptores P2, podendo então a resposta remanescente ser em decorrência da ativação de receptores não bloqueados. De fato, a falta de agonistas e antagonistas seletivos para os subtipos de receptores P2 tem sido um obstáculo na caracterização destes receptores. Muitos dos ligantes de receptores P2 disponíveis são altamente limitados quanto à cinética de ação, afinidade pelo receptor, especificidade

para receptor P2X/P2Y e seletividade para os subtipos. Além disso, erros podem ocorrer na classificação do receptor com base em agonistas, considerando que muitos nucleotídeos variam metabolicamente e devem ser degradados pelas ectonucleotidases presentes nas células (Cusack, 1993; Zimmermann, 1996), resultando em uma possível caracterização errônea dos receptores P2 (Humphrey *et al.*, 1995; Ralevic e Burnstock, 1998). Um grande número de compostos tem sido usados para bloquear respostas mediadas pelos receptores P2, entretanto nenhum destes compostos é considerado ideal (Humphrey *et al.*, 1995; Bhagwat e Williams, 1997; Jacobson *et al.*, 1998; Ralevic e Burnstock, 1998). A princípio, a seletividade dos antagonistas de receptor P2 deveria ser testada contra todos os subtipos conhecidos da família de receptores P2X e P2Y. Isto tem sido feito com o suramin e o PPADS, antagonistas não-seletivos para receptores P2 (Lewis *et al.*, 1995; Soto *et al.*, 1997; Harden *et al.*, 1998; Lê *et al.*, 1998; Ralevic e Burnstock, 1998; Bianchi *et al.*, 1999). Outros antagonistas seletivos para subtipos de receptores P2X incluem o 1-[*N,O*-bis(5-isoquinolinasulfonil)-*N*-metil-*L*-tirosil]-4-fenilpiperazina (KN-62), o 2',3'-*O*-(2,4,6-trinitrofenil) adenosina 5'-trifosfato (TNP-ATP) e o diinosina pentafosfato (IP₅I) (Lambrecht, 2000). Deste modo, com base em nossos resultados não podemos saber ao certo quais os subtipos específicos de receptores P2 envolvidos na mediação das respostas. Todavia, apesar das limitações metodológicas do antagonista utilizado, os efeitos observados nos permitem inferir que os receptores P2 do NA participam das respostas cardiovasculares do ATP no NA.

Nossos resultados mostram pela primeira vez que o sistema purinérgico participa das respostas cardiovasculares do NA. O papel do sistema purinérgico na mediação do componente parassimpático do NTS também foi demonstrado no estudo de Paula e colaboradores (2004). Neste estudo, o bloqueio com PPADS foi efetivo em atenuar a resposta bradicárdica do ATP no NTS. Adicionalmente, dados de Thomas e Spyer (2000) corroboram nossos resultados mostrando que o PPADS bloqueou os efeitos excitatórios do ATP em neurônios inspiratórios do grupo respiratório ventral, o qual está localizado no bulbo ventrolateral e envolve os neurônios respiratórios do NA e dos complexos Botzinger e pré-Botzinger (Richter *et al.*, 1997). Sendo assim, o

ATP, provavelmente por sua ação em receptores P2, parece participar da mediação das respostas cardiovasculares do NA.

Todavia, há que se considerar que a atenuação promovida pelo PPADS sobre a resposta do ATP possa envolver uma interferência na transmissão glutamatérgica. A modulação purinérgica da neurotransmissão glutamatérgica tem sido relatada no SNC em diversas áreas, entre elas, o hipocampo (Rodrigues *et al.*, 2005), o NTS (Jin *et al.*, 2004) e o locus coeruleus (Yao e Lawrence, 2005). Estudo de Paula e colaboradores (2004), em ratos acordados, sugeriu a interação dos neurotransmissores ATP e L-Glutamato, uma vez que o antagonista de receptor P2, PPADS, e o antagonista não-seletivo de receptor glutamatérgico, ácido kinurênico, reduziram significativamente a resposta bradicárdica gerada pela microinjeção de ATP no NTS. Braga e colaboradores (2007) também mostraram que são necessárias microinjeções combinadas de PPADS e ácido kinurênico no NTS, tanto de ratos acordados quanto na preparação tronco cerebral-coração isolado, para que ocorra uma redução significativa na resposta pressora quimiorreflexa. A interação dos sistemas purinérgico e glutamatérgico na função cardiovascular também foi evidenciada no locus coeruleus de ratos anestesiados (Yao e Lawrence, 2005). Em contrapartida, estudo de Ralevic e colaboradores (1999), realizado em neurônios do RVLM de ratos anestesiados, não demonstrou um sinergismo funcional entre o α,β -metileno ATP e o L-Glutamato. Adicionalmente, em um estudo de Thomas e Spyer (2000), realizado em neurônios respiratórios localizados no bulbo ventrolateral de ratos anestesiados, foi demonstrado que as respostas excitatórias do ATP em neurônios inspiratórios provavelmente não estão envolvidas com a modulação da transmissão glutamatérgica, pois os efeitos excitatórios do L-Glutamato não foram afetados pelos antagonistas de receptor P2, suramim e PPADS.

Na tentativa de elucidar possíveis interações entre sistemas glutamatérgico e purinérgico no NA, o L-Glutamato foi microinjetado antes e após o antagonista de receptor P2, PPADS. A atenuação da resposta bradicárdica gerada pelo L-Glutamato observada nos tempos de 17, 27 e 37 minutos após o bloqueio com PPADS sugere o envolvimento dos receptores purinérgicos P2 modulando a liberação de L-Glutamato nos neurônios cardíaco-vagais do NA. De acordo

com esta hipótese, um estudo recente de Jameson e colaboradores (2008), em que foi examinada a atividade glutamatérgica dos neurônios cardíaco-vagais do NA, utilizando registros de *patch-clamp whole-cell* em uma preparação *in vitro* de fatias cerebrais de ratos, demonstrou que o ATP e o α,β -metileno ATP ativam receptores P2X pré-sinápticos que facilitam a neurotransmissão excitatória glutamatérgica dos neurônios cardíaco-vagais. Do mesmo modo, estudo de Griffioen e colaboradores (2007), utilizando registros de patch-clamp em uma preparação *in vitro* de fatias bulbares, também evidenciou o envolvimento dos receptores P2X na neurotransmissão glutamatérgica dos neurônios cardíaco-vagais no NA no período após hipóxia e mostrou que agonistas de receptores P2Y, o uridina 5'-trifosfato (UTP) e o adenosina 5'-0-(Z-tiodifosfato), não aumentaram significativamente a neurotransmissão glutamatérgica dos neurônios cardíaco-vagais. Estudos prévios também mostraram que o ATP agindo em receptores P2X no nível pré-sináptico em neurônios ganglionares da raiz dorsal resulta no aumento da liberação de L-Glutamato (Gu e Macdermott, 1997). Do mesmo modo, estudos de Shigetomi e Kato (2004) mostraram que a ativação de receptores P2X pré-sinápticos com α,β -metileno ATP no NTS gera liberação de L-Glutamato dependente de Ca^{2+} . Portanto, considerando que o ATP pode ser co-liberado juntamente com outros neurotransmissores (Burnstock, 1986), é possível que ambos neurotransmissores, ATP e L-Glutamato, estejam envolvidos no processamento da resposta bradicárdica gerada pela microinjeção de ATP no NA.

Um fato relevante a ser notado, entretanto, é a ausência de atenuação da resposta bradicárdica gerada pelo L-Glutamato no tempo de 7 minutos após o bloqueio com PPADS. Poderia se questionar, com base neste dado, se a atenuação observada nos outros tempos não poderia ser devido a um efeito taquifiláxico em resposta as repetidas injeções de L-Glutamato. Todavia, apesar de no protocolo controle, com microinjeções de salina, termos observado uma atenuação tardia, o padrão de respostas observadas difere do protocolo envolvendo o bloqueio com o PPADS. Portanto, a atenuação da bradicardia glutamatérgica pelo PPADS não parece ser em decorrência de um efeito taquifiláxico. Além disso, é importante ressaltar que, no tempo de 7

minutos após bloqueio com PPADS, a resposta pressora do L-Glutamato teve um significativo aumento, o que poderia estar mascarando uma possível atenuação da resposta bradicárdica neste mesmo tempo. De fato, estudos de Yao e Lawrence (2005) mostraram que a resposta hipotensora à microinjeção de L-Glutamato no locus coeruleus era modificada para uma intensa resposta pressora após o bloqueio com PPADS. De modo semelhante, estudos de Ergene e colaboradores (1994) mostraram resposta hipotensora e pressora ao ATP no NTS de ratos anestesiados. Nesses estudos, seguindo o bloqueio dos receptores P2 no NTS com suramin, o catabolismo do ATP à adenosina poderia ser responsável pela mediação da resposta pressora observada após o bloqueio. Deste modo, em nosso estudo é possível que a exacerbação da resposta pressora glutamatérgica após o bloqueio com PPADS possa se dever a um envolvimento de receptores de adenosina no NA ou no LTF adjacente em decorrência da degradação do ATP à adenosina. Sendo assim, nossos estudos corroboram a hipótese de uma interação entre os sistemas purinérgico e glutamatérgico na mediação das respostas bradicárdicas no NA.

O mecanismo envolvido na interação entre receptores purinérgicos e glutamatérgicos tem sido alvo de investigação por diversos pesquisadores. Estudo de Jameson e colaboradores (2008) demonstrou que o possível mecanismo da liberação pré-sináptica de L-Glutamato se dá por receptores P2X, os quais são canais iônicos que medeiam ações rápidas do ATP (Torres *et al.*, 1999a; 1999b). No estudo de Jameson e colaboradores (2008) foi utilizado um bloqueador de canal de cálcio voltagem-dependente, o CdCl₂, demonstrando que o aumento da liberação glutamatérgica não é dependente de canais de cálcio voltagem-dependentes. Com base nesses resultados, foi sugerido que o aumento da liberação de L-Glutamato é resultante da entrada de cálcio pré-sináptica diretamente via receptores P2X; haja vista que os receptores P2X podem facilitar a liberação do L-Glutamato diretamente mediando a entrada de cálcio pré-sináptica (Khakh e Henderson, 1998) ou, alternativamente, podem despolarizar o terminal pré-sináptico para abrir canais de cálcio voltagem-dependentes que então geram a liberação do L-Glutamato (Gu e MacDermott, 1997). O aumento na neurotransmissão glutamatérgica resultante da ação do ATP sobre os receptores P2X mostrado no estudo de

Jameson e colaboradores (2008) é similar à liberação do L-Glutamato no NTS (Jin *et al.*, 2004), bem como no nervo terminal hipocampal (Rodrigues *et al.*, 2005). Todavia, apesar das evidências que os receptores P2X são os responsáveis por mediar a modulação da neurotransmissão glutamatérgica no NA, não podemos desconsiderar a possibilidade do envolvimento dos receptores P2Y, cuja transdução do sinal intracelular é mediada via segundos mensageiros (Strobaek *et al.*, 1996).

3. Efeitos da microinjeção de antagonista de receptores P2 sobre o reflexo Bezold-Jarisch no NA

O bloqueio purinérgico promovido pela microinjeção bilateral do PPADS gerou atenuação das respostas do reflexo Bezold-Jarisch sugerindo o envolvimento dos receptores purinérgicos na mediação deste reflexo. Esta atenuação das respostas reflexas não parece ser em decorrência da alteração dos níveis basais pelo bloqueio com PPADS. Como podemos observar o bloqueio bilateral com PPADS no NA promoveu apenas discretas respostas pressoras e bradicárdicas, as quais retornaram aos níveis basais antes das injeções subsequentes. A resposta bradicárdica do reflexo Bezold-Jarisch foi significativamente atenuada nos tempos de 7, 12 e 17 minutos após bloqueio com PPADS, com recuperação em 27 minutos. Esta atenuação da bradicardia reflexa foi parcial, sugerindo que a distribuição dos receptores purinérgicos que participam do reflexo Bezold-Jarisch no NA pode estender-se além da área bloqueada pela microinjeção. Adicionalmente, há que se considerar que, uma vez que o PPADS não constitui um bloqueador universal, é possível que os receptores purinérgicos não bloqueados estejam mantendo as respostas reflexas remanescentes. Além disso, outra possibilidade para a resposta bradicárdica reflexa remanescente poderia ser a existência de outros receptores e neurotransmissores modulando o reflexo Bezold-Jarisch no NA.

Outros estudos também mostraram a participação do sistema purinérgico na mediação de reflexos cardiovasculares em outros núcleos, como o NTS. Antunes e colaboradores (2005) mostraram que a microinjeção de ATP em diferentes sub-regiões do NTS (intermediário e caudal) de ratos acordados produziu respostas pressora e bradicárdica similares às observadas em resposta à ativação quimiorreflexa. Outro estudo de Braga e colaboradores (2007) também mostrou participação do sistema purinérgico na mediação das respostas quimiorreflexas. Nesse estudo, microinjeções combinadas de PPADS, antagonista não-seletivo de receptor P2, e ácido kinurênico, antagonista de receptores de aminoácidos excitatórios, no NTS de ratos acordados e na preparação tronco cerebral-coração isolado produziram uma

redução significativa nas respostas pressora e bradicárdica quimiorreflexas, sugerindo uma interação dos sistemas purinérgico e glutamatérgico no processamento dos componentes simpático e parassimpático do quimiorreflexo ao nível do NTS. Estes estudos corroboram o envolvimento das purinas na neurotransmissão de reflexos cardiovasculares em núcleos relacionados com o controle cardiovascular.

A atenuação discreta da resposta depressora do reflexo Bezold-Jarisch gerada pelo bloqueio purinérgico com o PPADS pode ser secundária ao efeito observado sobre a FC. Estudos prévios mostraram que a resposta depressora do reflexo Bezold-Jarisch parece ser secundária à intensa excitação cardiovagal e não devido a uma inibição simpática. Chianca e Machado (1996) demonstraram que o antagonismo seletivo de receptores NMDA com o ácido fosfonoalérgico (AP-5) no NTS de ratos acordados produziu um bloqueio dose-dependente das respostas bradicárdica e hipotensora do reflexo Bezold-Jarisch. Contudo, o bloqueio colinérgico com metil-atropina aboliu completamente as respostas bradicárdica e hipotensora, indicando que a queda na PA foi essencialmente devido a uma intensa redução na FC, a qual poderia momentaneamente reduzir o débito cardíaco e conseqüentemente a PA. Estes achados do bloqueio da bradicardia e hipotensão pela metil-atropina estão de acordo com estudos prévios de Willete e colaboradores (1982), os quais também mostraram que a atropina bloqueou as respostas bradicárdica e hipotensora. Adicionalmente, estudos de Verberne e Guyenet (1992) e Sevoz e colaboradores (1996) realizados em ratos anestesiados mostraram que a ativação do reflexo Bezold-Jarisch com fenilbiguanida produziu uma intensa bradicardia e uma redução na atividade do nervo simpático, a qual não parecia ser suficiente para produzir uma significativa queda na PAM, corroborando a hipótese de que a queda na PAM parece ser realmente em decorrência da queda do débito cardíaco. Entretanto, em experimentos anteriores de Chianca e Machado (1996) com ratos sob anestesia de uretana, a metil-atropina aboliu a resposta bradicárdica, mas não bloqueou a resposta hipotensora à ativação do reflexo Bezold-Jarisch. Esta diferença na resposta autonômica à ativação do reflexo Bezold-Jarisch entre animais acordados e anestesiados indica que a

anestesia produz uma importante mudança no processamento deste sistema aferente nas diferentes sinapses envolvidas nesta via neural.

Nossos resultados apontam para uma importante participação do sistema purinérgico do NA na mediação das respostas do reflexo Bezold-Jarisch. Essa modulação parece envolver a participação de receptores purinérgicos P2. Todavia, não podemos descartar que os efeitos modulatórios das purinas sobre este reflexo envolvam uma modulação do sistema glutamatérgico ao nível do NA. Os subtipos de receptores P2 envolvidos na modulação purinérgica, bem como o mecanismo de interação entre os sistemas purinérgico e glutamatérgico na mediação das respostas do reflexo Bezold-Jarisch permanecem por ser investigados.

CONCLUSÕES

- As microinjeções unilaterais de ATP nas doses de 0,31; 2,5; 3,5; 5,0 e 6,0 nmol/50 nL no NA promoveram respostas bradicárdicas com um padrão dose-dependente e também respostas pressoras.
- O bloqueio α_1 -adrenérgico com prazosin não alterou significativamente a resposta bradicárdica, mas aboliu a resposta pressora gerada pela microinjeção de ATP (3,5 nmol/50 nL).
- O bloqueio muscarínico com metil-atropina aboliu a resposta bradicárdica gerada pela microinjeção de ATP (3,5 nmol/50 nL).
- O bloqueio ipsilateral do NA com PPADS (500 pmol/100 nL) promoveu uma atenuação significativa da resposta bradicárdica gerada pela microinjeção de ATP (3,5 nmol/50 nL).
- O bloqueio ipsilateral do NA com PPADS (500 pmol/100 nL) promoveu uma atenuação significativa da resposta bradicárdica gerada pela microinjeção de L-Glutamato (5,0 nmol/50 nL).
- As microinjeções bilaterais de PPADS (500 pmol/100 nL) promoveram discretas alterações de curta duração dos valores basais de PA e FC.
- O bloqueio bilateral do NA com PPADS (500 pmol/100 nL) atenuou significativamente as respostas hipotensora e bradicárdica do reflexo Bezold-Jarisch.

Os resultados do presente estudo sugerem que os receptores purinérgicos do tipo P2 no NA parecem estar envolvidos na mediação das respostas cardiovagais ao ATP e que possivelmente participam da neurotransmissão/neuromodulação glutamatérgica em ratos anestesiados. Além disso, nossos resultados também sugerem que estes receptores parecem ter participação na mediação das respostas cardiovasculares do reflexo Bezold-Jarisch. No entanto, os subtipos específicos de receptores purinérgicos envolvidos bem como a participação do sistema purinérgico em outros reflexos cardiovasculares ao nível do NA permanecem por ser elucidados.

REFERÊNCIAS

Abbracchio, M. P.; Burnstock, G.; Boeynaems, J. M.; Barnard, E. A.; Boyer, J. L.; Kennedy, C.; Knight, G. E.; Fumagalli, M.; Gachet, C.; Jacobson, K. A.; Weisman, G. A. International Union of Pharmacology. **Update and subclassification of the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy.** *Pharmacological Reviews*, 58: 281-341, 2006.

Abbracchio, M. P.; Burnstock, G. **Purinergic signaling: pathophysiological roles.** *Japanese Journal of Pharmacology*, 78: 113-145, 1998.

Agarwal, S. K.; Calaresu, F. R. **Enkephalins, substance P and acetylcholine microinjected into the nucleus ambiguus elicit vagal bradycardia in rats.** *Brain Research*, 563: 203-208, 1991.

Ahluwalia, J. M.; Langhorst, P.; Krienke, B.; Koepchen, H. P. **Nucleus of the solitary tract and the J-reflex.** *Pflugers Archiv: European Journal of Physiology*, 368: 157-159, 1977.

Aicher, S. A.; Saravay, R. H.; Cravo, S. *et al.* **Monosynaptic projections from the nucleus tractus solitarii to C1 adrenergic neurons in the rostral ventrolateral medulla: Comparison with input from the caudal ventrolateral medulla.** *The Journal of Comparative Neurology*, 373: 62-5, 1996.

Antunes, V. R.; Bonagamba, L. G. H.; Machado, B. H. **Hemodynamic and respiratory responses to microinjection of ATP into the intermediate and caudal NTS of awake rats.** *Brain Research*, 1032: 85-93, 2005.

Araújo, M. T.; Barker, L. A.; Cabral, A. M.; Vasquez, E. C. **Inhibition of nitric oxide synthase causes profound enhancement of the Bezold-Jarisch reflex.** *American Journal of Hypertension*, 11: 66-72, 1998.

Ashour, F.; Deuchars, J. **Electron microscopic localisation of P2X₄ receptor subunit immunoreactivity to pre- and post-synaptic neuronal elements and glial processes in the dorsal vagal complex of the rat.** *Brain Research*, 1026 (1):44-55, 2004.

Barman, S. M.; Phillips, S. W.; Gebber, G. L. **Medullary lateral tegmental field mediates the cardiovascular but not respiratory component of the Bezold-Jarisch reflex in the cat.** *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 289: R1693-R1702, 2005.

Barraco, R. A.; O`Leary, D. S.; Ergene, E.; Scislo, T. J. **Activation of purinergic receptor subtypes in the nucleus tractus solitarius elicits specific regional vascular response patterns.** *The Journal of Autonomic Nervous System*, 59: 113-124, 1996.

Bell, L. B.; O`Hagan, K. P.; Clifford, P. S. **Cardiac but not pulmonary receptors mediate depressor response to IV phenylbiguanide in conscious rabbits.** *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 264: R1050-R1057, 1993.

Bhagwat, S. S.; Williams, M. **P2 purine and pyrimidine receptors: emerging superfamilies of G-protein-coupled and ligand-gated ion channels receptors.** *European Journal of medicinal Chemistry*, 32: 183-193, 1997.

Bianchi, B. R.; Lynch, K. J.; Touma, E.; Niforatos, W.; Burgard, E. C.; Alexander, K. M.; Park, H. S.; Yu, H.; Metzger, R.; Kowaluk, E.; Jarvis, M. F.; Biesen, T. Van. **Pharmacological characterization of recombinant human and rat P2X receptor subtypes.** *European Journal of Pharmacology*, 376: 127-138, 1999.

Bieger, D.; Hopkins, D. A. **Viscerotopic representation of the upper alimentary tract in the medulla oblongata in the rat: the nucleus ambiguus.** *The Journal of Comparative Neurology*, 262:546-562, 1987.

Braga, V. A.; Soriano, R. N.; Braccialli, A. L.; De Paula, P. M.; Bonagamba, L. G. H.; Paton, J. F. R.; Machado, B. H. **Involvement of L-glutamate and ATP in the neurotransmission of the sympathoexcitatory component of the chemoreflex in the commissural NTS of awake rats and in the working heart brainstem preparation.** *The Journal of Physiology*, 2007.

Brandão, C. A. L. **Efeitos cardiovasculares das microinjeções de L-Glutamato no núcleo ambíguo de ratos anestesiados.** 2000. Tese de doutorado – Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2000.

Burnstock, G. **Purines and cotransmitters in adrenergic and cholinergic neurons.** *Progress in Brain Research*, 68: 193-203, 1986.

Burnstock, G. **Purinergic nerves.** *Pharmacol Rev*, 24: 509-581, 1972.

Chai, C. Y.; Lin, R. U.; Pan, C. M.; Lee, E. U. Y.; Kuo, J. S.; Lin, A. M. Y. **Pressor responses from electrical or glutamate stimulations of the dorsal or ventrolateral medulla.** *American Journal of Physiology*, 255: R709-R717, 1988.

Chan, S. H.; Ong, B. T.; Wong, P. T. **Suppression of arterial pressure, heart rate and cardiac contractility following microinjection of kainic acid into the nucleus ambiguus of the rat.** *Neuroscience Letters*, 47: 57-62, 1984.

Chein, H. I. **Interaction between the baroreceptor and Bezold-Jarisch reflexes.** *American Journal of Physiology*, 237(6): 655-61, 1979.

Chianca, D. A.; Bonagamba, L. G.; Machado, B. H. **Neurotransmission of the Bezold-Jarisch reflex in the nucleus tractus solitarii of sino-aortic deafferentated rats.** *Brain Research*, 756(1-2): 46-51, 1997.

Chianca, D. A.; Machado, B. H. **Microinjection of NMDA antagonist into the NTS of conscious rats blocks the Bezold-Jarisch reflex.** *Brain Research*, 718: 185-188, 1996.

Chianca, D. A.; Machado, B. H. **The sensitivity of the Bezold-Jarisch reflex is increased in rats with sinoaortic deafferentation.** *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 27: 775-781, 1994.

Chitravanshi, V. C.; Calaresu, F. R. **Dopamine microinjected into the nucleus ambiguus elicits vagal bradycardia in spinal rats.** *Brain Research*, 583(1-2): 308-11, 1992.

Chitravanshi, V. C.; Agarwal, S. K.; Calaresu, F. R. **Microinjection of glycine into the nucleus ambiguus elicits tachycardia in spinal rats.** *Brain Research*, 566: 290-294, 1991.

Cochrane, K. L.; Nathan, M. A. **Cardiovascular effects of lesions of the rostral ventrolateral medulla and the nucleus reticularis parvocellularis in rats.** *Journal of the Autonomic Nervous System*, 43: 69-82, 1993.

Coleridge, J. C. G.; Coleridge, H. M.; Kidd, C. **Cardiac receptors in dogs, within particular reference to two types of afferent ending in the ventricular wall.** *Journal of Physiology (Lond)*, 174: 323-339, 1964.

Communi, D.; Robaye, B.; Boeynaems, J. M. **Pharmacological characterization of the human P2Y₁₁ receptor.** *British Journal of Pharmacology*, 128: 1199-1206, 1999.

Corbett, E. K. A.; Batten, T. F. C.; Kaye, J. C.; Deuchars, J.; McWilliam, P. N. **Labelling of rat vagal preganglionic neurons by carbocyanine dye DiI applied to the heart.** *Neuroreport*, 10: 1177-1181, 1999.

Cusak, N. J. **P2 receptor: subclassification and structure-activity relationships.** *Drug Development Research*, 28: 244-252, 1993.

Dale, N.; Gourine, A. V.; Llaudet, E.; Bulmer, D.; Thomas, T.; Spyer, K. M. **Rapid adenosine release in the nucleus tractus solitarius during defence response in rats: real-time measurement in vivo.** *The Journal of Physiology*, 544: 149-160, 2002.

Daly, M. D.; Kirkman, E. **Cardiovascular responses to stimulation of pulmonary C fibres in the cat: their modulation by changes in respiration.** *The Journal of Physiology*, 402: 43-63, 1988.

Dawes, G. S. **Studies on veratrum alkaloids.** *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 89: 325-342, 1947.

De Burgh; Daly, M.; Kirkman, E.; Wood, L. M. **Cardiovascular responses to stimulation of cardiac receptors in the cat and their modification by changes in respiration.** *The Journal of Physiology*, 407: 349-362, 1988.

De Paula, P. M.; Antunes, V. R.; Bonagamba, L. G. H.; Machado, B. H. **Cardiovascular responses to microinjection of ATP into the nucleus tractus solitarius of awake rats.** *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 287: R1164-R1171, 2004.

De Paula, P. M.; Machado, B. H. **Antagonism of adenosine A1 receptors in the NTS does not affect the chemoreflex in awake rats.** *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 281: R2072-R2078, 2001.

DiBona, G. F. **Neural control of renal function: cardiovascular implications.** *Hypertension*, 13: 539-548, 1989.

Di Virgilio, F.; Falzoni, S.; Mutini, C.; Sanz J. M.; Chiozzi, P. **Purinergic P2X₇ receptor: a pivotal role in inflammation and immunomodulation.** *Drug Development Research*, 45: 207-213, 1998.

Donald, D. E.; Shepherd, J. T. **Reflexes from the heart and lungs: physiological curiosities or important regulatory mechanisms.** *Cardiovascular Research*, 12(8): 446-69, 1978.

Donnelly-Roberts, D. L.; Jarvis, M. F. **Discovery of P2X₇ receptor-selective antagonists offers new insights into P2X₇ receptor function and indicates a role in a chronic pain states.** *British Journal of Pharmacology*, 151: 571-579, 2007.

Edwards, F. A.; Gibb, A. J.; Colquhoun, D. **ATP receptor-mediated synaptic currents in the central nervous system.** *Nature*, 359: 144-147, 1992.

Ergene, E.; Dunbar, J. C.; O'Leary, D. S.; Barraco, R. A. **Activation of P₂-purinoceptors in the nucleus tractus solitarius mediate depressor responses.** *Neuroscience Letters*, 174: 188-192, 1994.

Evans, R. J.; Surprenant, A.; North, R. A. **P2X receptors: cloned and expressed.** In: Turner, J. T.; Weisman, G. A.; Fedan, J. S. (eds). *The P₂ nucleotide receptors*. Humana, Totowa, pp. 43-61, 1998.

Evans, R. G.; Ludbrook, J.; Michalicek, J. **Use of nicotine, bradykinin and veratridine to elicit cardiovascular chemoreflexes in unanaesthetized rabbits.** *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology*, 18: 245-254, 1991.

Evans, R. G.; Ludbrook, J.; Michalicek, J. **Characteristics of cardiovascular reflexes originating from 5-HT₃ receptors in the heart and lungs of unanaesthetized rabbits.** *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology*, 17: 665-679, 1990.

Ferrari, A. U.; Daffonchio, A.; Sala, C.; Gerosa, S.; Mancina, G. **Atrial natriuretic factor and arterial baroreceptor reflexes in unanesthetized rats.** *Hypertension*, 15(2): 162-7, 1990.

Fong, A. Y.; Krstew, E. V.; Barden, J.; Lawrence, J. **Immunoreactive localization of P2Y₁ receptors within the rat and human nodose ganglia**

and rat brainstem: comparison with [α 33P]deoxyadenosine 5'-triphosphate autoradiography. *Neuroscience*, 113(4): 809-823, 2002.

Ford, T. W.; Bennett, J. A.; Kidd, C.; McWilliam, P. N. **Neurones in the dorsal motor vagal nucleus of the cat with non-myelinated axons projecting to the heart and lungs.** *Experimental Physiology*, 75: 459-473, 1990.

Fredholm, B. B.; Abbracchio, M. P.; Burnstock, G.; Dubyak, G. R.; Harden, T. K.; Jacobson, K. A.; Schwabe, U.; Williams, M. **Towards a revised nomenclature for P1 and P2 receptors.** *Trends in Pharmacological Sciences*, 18: 79-82, 1997.

Gatti, P. J.; Johnson, T. A.; Massari, V. J. **Can neurons in the nucleus ambiguus selectively regulate cardiac rate and atrio-ventricular conduction?** *Journal of the Autonomic Nervous System*, 57: 123-127, 1996.

Gebber, G. L. **Central determinants of sympathetic nerve discharge.** In: Loewy, A. D.; Spyer, K. M. (Org.), *Central Regulation of Autonomic Functions*, Oxford University Press, Inc., New York, p. 126-144, 1990.

Gever, J. R.; Cockayne, D. A.; Dillon, M. P.; Burnstock, G.; Ford, A. P. **Pharmacology of P2X channels.** *Pflugers Archiv: European journal of physiology*, 452: 513-537, 2006.

Gieroba, Z. J.; MacKenzie, L.; Willoughby, J. O.; Blessing, W. W. **Fos-determined distribution of neurons activated during the Bezold-Jarisch reflex in the medulla oblongata in conscious rabbits and rats.** *Brain Research*, 683: 43-50, 1995.

Gilbey, M. P.; Jordan, D.; Richter, D. W.; Spyer, K. M. **Synaptic mechanisms involved in the inspiratory modulation of vagal cardio-inhibitory neurones in the cat.** *The Journal of Physiology*, 356: 65-78, 1984a.

Gilbey, M. P.; Jordan, D.; Spyer, K. M.; Wood, L. M. **The inhibitory actions of GABA on cardiac vagal motoneurons in the cat.** *The Journal of Physiology*, 361: 49, 1984b.

Griffioen, K. J.; Gorini, C.; Jameson, H.; Mendelowitz, D. **Purinergic P2X receptors mediate excitatory transmission to cardiac vagal neurons in the nucleus ambiguus after hypoxia.** *Journal of the American Heart Association*, 50: 78-81, 2007.

Gu, J. G.; MacDermott, A. B. **Activation of ATP P2X receptors elicits glutamate release from sensory neuron synapses.** *Nature*, 389: 749-753, 1997.

Guyenet, P. G. **Role of the ventral medulla oblongata in blood pressure regulation.** In: Loewy, A. D.; Spyer, K. M. (Eds.), *Central Regulation of Autonomic Functions*, Oxford University Press, New York, pp. 145-167, 1990.

Harden, T. K.; Nicholas, R. A.; Schachter J. B.; Lazarowski E. R.; Boyer, J. L. **Pharmacological selectivities of molecularly defined subtypes of P2Y receptors.** In: Turner, J. T.; Weisman, G. A.; Fedan, J. S (eds). *The P2 nucleotide receptors*. Humana, Totowa, pp. 109-134, 1998.

Hopkins, D. A.; Armour, J. A. **Medullary cells of origin of physiologically identified cardiac nerves in the dog.** *Brain Research Bulletin*, 8: 359-365, 1982.

Horiuchi, J.; Potts, P. D.; Tagawa, T.; Dampney, R. A. L. **Effects of activation and blockade of P2X receptors in the ventrolateral medulla on arterial pressure and sympathetic activity.** *Journal of Autonomic Nervous System*, 76: 118-126, 1999.

Hsieh, J. H.; Chen, R. F.; Wu, J. J.; Yen, C. T.; Chai, C. Y. **Vagal innervation of the gastrointestinal tract arises from dorsal motor nucleus while that of the heart largely from nucleus ambiguus in the cat.** *Journal of the Autonomic Nervous System*, 70: 38-50, 1998.

Humphrey, P. P. A.; Buell, G.; Kennedy, I.; Khakh, B. S.; Michel, A. D.; Surprenant, A.; Trezise, D. J. **New insights on P2X purinoceptors.** *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 352: 585-596, 1995.

Izzo, P. N.; Deuchars, J.; Spyer, K. M. **Localization of cardiac vagal preganglionic motoneurons in the rat: immunocytochemical evidence of synaptic inputs containing 5-hydroxytryptamine.** *The Journal of Comparative Neurology*, 327(4):572-83, 1993.

Jacobson, K. A.; Camaioni, E.; Rhee, A. M. Van. **Structure activity relationships of P2 receptor agonists and antagonists.** In: Turner, J. T.; Weisman, G. A.; Fedan, J. S. (eds). *The P2 nucleotide receptors*. Humana, Totowa, pp. 81-107, 1998.

Jameson, H. S.; Pinol, R. A.; Kamendi, H.; Mendelowitz, D. **ATP facilitates glutamatergic neurotransmission to cardiac vagal neurons in the nucleus ambiguus.** *Brain Research*, 1201: 88-92, 2008.

Jin, Y. H.; Bailey, T. W.; Li, B. Y.; Schild, J. H.; Andresen, M. C. **Purinergic and vanilloid receptor activation releases glutamate from separate cranial afferent terminals in nucleus tractus solitarius.** *The Journal of Neuroscience*, 24: 4709-4717, 2004.

Jones, J. F. X.; Wang, Y.; Jordan, D. **Activity of C fibre cardiac vagal efferents in anaesthetized cats and rats.** *The Journal of Physiology*, 507: 869-880, 1998.

Jordan, D.; Spyer, K. M.; Withington-Wray, D.; Wood, L. M. **Histochemical and electrophysiological identification of cardiac and pulmonary preganglionic neurons in the cat.** *The Journal of Physiology*, 372: 87P, 1986.

Jordan, D.; Khalid, M. E. M.; Schneiderman, N.; Spyer, K. M. **The location and properties of preganglionic vagal cardiomotor neurons in the rabbit.** *Pflugers Archiv: European Journal of Physiology*, 395: 244-250, 1982.

Kalia, M. **Brainstem localization of vagal preganglionic neurons.** *Journal of the Autonomic Nervous System*, 3: 451-481, 1981.

Kalia, M.; Mesulam, M. **Brainstem projections of sensory and motor components of the vagus complex in the cat.** *The Journal of Comparative Neurology*, 193: 435-508, 1980.

Kappagoda, C. T.; Linden, R. J.; Snow, H. M. **The effect of stretching the superior vena cava-right atrial junction on right atrial receptors in the dog.** *Journal of Physiology*, 227: 875-887, 1972.

Kato, F.; Shigetomi. **Distinct modulation of evoked and spontaneous EPSCs by purinoceptors in the nucleus tractus solitarii of the rat.** *Journal of Physiology*, 530 (3): 469-486, 2001.

Khakh, B. S.; Henderson, G. **ATP receptor-mediated enhancement of fast excitatory neurotransmitter release in the brain.** *Molecular Pharmacology*, 54: 372-378, 1998.

Kitchen, A. M.; Collins, H. L.; DiCarlo, S. E.; Scislo, T. J.; O'Leary, D. S. **Mechanisms mediating NTS P2x receptor-evoked hypotension: cardiac output vs. total peripheral resistance.** *American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology*, 281(5):H2198-203, 2001.

Korkola, M. L.; Weaver, L. C. **Role of dorsal medullary reticular formation in maintenance of vasomotor tone in rats.** *Journal of the Autonomic Nervous System*, 46: 161-169, 1993.

Krayer, O. **The history of the Bezold-Jarisch effect.** *Naunyn-Schmiedeberg's Archiv fur Experimentelle Patologie und Pharmakologie*, 240: 361-368, 1961.

Lambrecht, G.; Rettinger, J.; Baumert, H. G.; Czeche, S.; Damer, S.; Ganso, M.; Hildebrandt, C.; Niebel, B.; Spatz-Kumbel, G.; Schmalzing, G.; Mutschler, E. **The novel pyridoxal-5`-phosphate derivative PPNDS potently antagonizes activation of P2X₁ receptors.** *European Journal of Pharmacology*, 387: R19-R21, 2000.

Lambrecht, G. **Design and pharmacology of selective P2-purinoceptor antagonists.** *Journal of Autonomic Pharmacology*, 16: 341-344, 1996.

Lambrecht, G.; Ardanuy, U.; Baumert, H. G.; Bo, X.; Hoyle, C. H. V.; Nickel, P.; Pfaff, O.; Ralevic, V.; Windscheif, U.; Ziganshin, A. U.; Ziyal, R.; Mutschler, E.; Burnstock, G. **Design and pharmacological characterization of selective P2-purinoceptor antagonists.** In: Giardina, D.; Piergentili, A.; Pignini, M. (eds) *Perspective in receptor research*. Elsevier, Amsterdam, pp 337-350, 1996.

Lê, K. T.; Babinski, K.; Séguéla, P. **Central P2X₄ and P2X₆ channel subunits coassemble into a novel heteromeric ATP receptor.** *The Journal of Neuroscience*, 18: 7152-7159, 1998.

Lewis, C.; Neidhart, S.; Holy, C.; North, R. A.; Buell, G.; Surprenant, A. **Coexpression of the P2X₂ and P2X₃ receptor subunits can account for ATP-gated currents in sensory neurons.** *Nature*, 377: 432-435, 1995.

Lin, A. M. Y.; Wang, Y.; Kuo, J. S.; Chai, C. Y. **Homocysteic acid elicits pressor responses from ventrolateral medulla and dorsomedial medulla.** *Brain Research Bulletin*, 22: 627-631, 1989.

Loewy, A. D.; Spyer, K. M. **Vagal preganglionic neurons.** In: Central Regulation of Autonomic Functions. Edited by Loewy, A. D.; Spyer, K. M., Oxford University Press, Inc, New York, pp 68-87, 1990.

Machado, B. H.; Brody, M. J. **The nucleus ambiguus region participates in arterial pressure regulation.** *Neuroscience Letters*, 135(1): 91-4, 1992.

Machado, B. H.; Brody, M. J. **Mechanisms of pressor response produced by stimulation of nucleus ambiguus.** *American Journal of Physiology*, 259 (Regulatory Integrative Comp. Physiol. 28): R955-R962, 1990.

Machado, B. H.; Brody, M. J. **Effect of nucleus ambiguus lesion on the development of neurogenic hypertension.** *Hypertension Dallas* 11, Suppl. I: I-135-I-138, 1988a.

Machado, B. H.; Brody, M. J. **Role of nucleus ambiguus in regulation of heart rate and arterial pressure.** *Hypertension Dallas* 11: 602-607, 1988b.

Mackenzie, A. B.; Surprenant A.; North R. A. **Functional and molecular diversity of purinergic ion channel receptors.** *Annals of the New York Academy of Sciences*, 868: 716-729, 1999.

Maqbool, A.; Batten, T. F. C.; McWilliam, P. N. **Ultrastructural relationships between GABAergic terminals and cardiac vagal preganglionic motoneurons and vagal afferents in the cat: a combined HRP tracing and immunogold labelling study.** *European Journal of Neuroscience*, 3: 501-513, 1991.

Marchenko, V.; Sapru, H. N. **Cardiovascular responses to the stimulation of the lateral tegmental field and adjacent medullary reticular formation in the rat.** *Brain Research*, 977: 247-260, 2003.

Mark, A. L. **The Bezold-Jarisch reflex revisited: Clinical implications of inhibitory reflexes originating in the heart.** *Journal of American College of Cardiology*, 1: 90-102, 1983.

Massari, V. J.; Dickerson, L. W.; Gray, A. L.; Lauenstein, J. M.; Blinder, K. J.; Newsome, J. T.; Rodak, D. J.; Fleming, T. J.; Gatti, P. J.; Gillis, R. A. **Neural control of left ventricular contractility in the dog heart: synaptic interactions of negative inotropic vagal preganglionic neurons in the**

nucleus ambiguous with tyrosine hydroxylase immunoreactive terminals. *Brain Research*, 802: 205-220, 1998.

Massari, V. J.; Johnson, T. A.; Gillis, R. A.; Gatti, P. J. **What are the roles of substance P and neurokinin-1 receptors in the control of negative chronotropic or negative dromotropic vagal motoneurons? A physiological and ultrastructural analysis.** *Brain Research*, 715: 197-207, 1996.

Massari, V. J.; Johnson, T. A.; Gatti, P. J. **Cardiotopic organization of the nucleus ambiguous? An anatomical and physiological analysis of neurons regulating atrioventricular conduction.** *Brain Research*, 679: 227-240, 1995.

Massari, V. J.; Johnson, T. A.; Llewellyn-Smith, I. J.; Gatti, P. J. **Substance P nerve terminals synapse upon negative chronotropic vagal motoneurons.** *Brain Research*, 660: 275-287, 1994.

McAllen, R. M.; Spyer, K. M. **The baroreceptor input to cardiac vagal motoneurons.** *The Journal of Physiology*, 282: 365-374, 1978a.

McAllen, R. M.; Spyer, K. M. **Two types of vagal preganglionic motoneurons projecting to the heart and lungs.** *The Journal of Physiology*, 282: 353-364, 1978b.

McAllen, R. M.; Spyer, K. M. **The location of cardiac vagal preganglionic motoneurons in the medulla of the cat.** *The Journal of Physiology*, 258: 187-204, 1976.

Meyrelles, S. S.; Mauad, H.; Mathias, S. C.; Cabral, A. M.; Vasquez, E. C. **Effects of myocardial hypertrophy on neural reflexes controlling cardiovascular function.** *Journal of the Autonomic Nervous System*, 73(2-3): 135-42, 1998.

Meyrelles, S. S.; Mill, J. G.; Cabral, A. M.; Vasquez, E. C. **Cardiac baroreflex properties in myocardial infarcted rats.** *Journal of the Autonomic Nervous System*, 60(3): 163-8, 1996.

Meyrelles, S. S.; Cabral, A. M.; Vasquez, E. C. **Impairment of the Bezold-Jarisch reflex in conscious rats with myocardial hypertrophy.** *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 27: 1065-1069, 1994.

Miles, G. B.; Parkis, M. A.; Lipski, J.; Funk, G. D. **Modulation of phrenic motoneurons excitability by ATP: consequences for respiratory-related output in vitro.** *Journal of Applied Physiology*, 92: 1899-1910, 2002.

Milner, T. A.; Morrison, S. F.; Abate, C.; Reis, D. J. **Phenylethanolamine N-methyltransferase-containing terminals synapse directly on sympathetic preganglionic neurons in the rat.** *Brain Research*, 448: 205-22, 1988.

Muers, M. F.; Sleight, P. **The reflex cardiovascular depression, caused by occlusion of the coronary sinus in the dog.** *Journal of Physiology (Lond)*, 221: 259-282, 1972.

Murugaian, J.; Sundaram, K.; Krieger, A.; Sapru, H. **Electrolytic lesions in the depressor area of the ventrolateral medulla of the rat abolish depressor responses to the aortic nerve stimulation.** *Brain Research*, 499: 371-377, 1989.

Neff, R. A.; Mihalevich, M.; Mendelowitz, D. **Stimulation of NTS activates NMDA and non-NMDA receptors in rat cardiac vagal neurons in the nucleus ambiguus.** *Brain Research*, 792(2): 277-82, 1998.

North, R. A. **Molecular physiology of P2X receptors.** *Physiological Reviews*, 82: 1013-1067, 2002.

North, R. A.; Barnard, E. A. **Nucleotide receptors.** *Current Opinion in Neurobiology*, 7: 346-357, 1997.

Nosaka, S.; Yasunaga, K.; Tamai, S. **Vagal cardiac preganglionic neurons: distribution, cell types and reflex discharges.** *American Journal of Physiology*, 243: R92-R98, 1982.

Nosaka, S.; Yamamoto, T.; Yasunaga, K. **Localization of vagal cardioinhibitory preganglionic neurons with rat brainstem.** *The Journal of Comparative Neurology*, 186: 79-92, 1979.

Nosaka, S.; Kamaike, T.; Yasunaga, K. **Central vagal organization in rats: An electrophysiological study.** *Experimental Neurology*, 60: 405-419, 1978.

Paintal, A. S. **Vagal sensory receptors and their reflex effects.** *Physiological Reviews*, 53: 159-227, 1973.

Paintal, A. S. **A study of ventricular pressure receptors and their role in the Bezold-Jarisch reflex.** *Quarterly Journal of Experimental Physiology*, 40: 348-363, 1955.

Paxinos, G.; Watson, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates.** Academic press, New York, 1998.

Pedrosa D. F. **Participação dos receptores nicotínicos na neurotransmissão da resposta cárdio-vagal do barorreflexo e do reflexo Bezold-Jarisch no núcleo ambíguo de ratos anestesiados.** 2007. Dissertação de mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2007.

Peotta, V. A.; Vasquez, E. C.; Meyrelles, S. S. **Cardiovascular neural reflexes in L-NAME-induced hypertension in mice.** *Hypertension*, 38: 555-9, 2001.

Perez-Gomez, F.; Garcia-Aguado, A. **Origino f ventricular reflexes caused by coronary arteriography.** *British Heart Journal*, 39: 967-973, 1977.

Persson, P. B. **History of arterial baroreceptor reflexes.** In: Baroreceptor Reflexes. Edited by: Persson P. B. and Kirchheim, Spronger-Verlag, pp 1-8, 1991.

Persson, P.; Ehmke, H.; Kirchheim, H.; Seller, H. **Effect of sino-aortic denervation in comparison to cardiopulmonary deafferentiation on long-term blood pressure in conscious dogs.** *Pflugers Archiv: European Journal of Physiology*, 441(2): 160-6, 1988.

Phillis, J. W.; Scislo, T. J.; O'Leary, D. S. **Purines and the nucleus tractus solitarius: effects on cardiovascular and respiratory function.** *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology*, 24: 738-742, 1997.

Plecha, D. M.; Randall, W. C.; Geis, G. S.; Wurster, R. D. **Localization of vagal preganglionic somata controlling sinoatrial and atrioventricular nodes.** *American Journal of Physiology*, 255: R703-R708, 1988.

Ralevic, V.; Thomas, T.; Burnstock, G.; Spyer, K. M. **Characterization of P2 receptors modulating neural activity in rat rostral ventrolateral medulla.** *Neuroscience*, 94(3): 867-878, 1999.

Ralevic, V.; Burnstock, G. **Receptors for purines and pyrimidines.** *Pharmacological Reviews*, 50: 413-492, 1998.

Raymundo, H.; Scher, A. M.; O'Leary, D. S.; Sampson, P. D. **Cardiovascular control by arterial and cardiopulmonary baroreceptors in awake dogs with atrioventricular block.** *American Journal of Physiology*, 257: 2048-58, 1989.

Richter, D. W.; Ballanyi, K.; Ramirez, J. M. **Respiratory rhythm generation.** In *Neural Control of the Respiratory Muscles*, ed Miller, A. D.; Bianchi, A. L.; Bishop, B. P., pp 119-130. CRC Press, Boca Raton, FL, USA, 1997.

Robertson, S. J. **Tissue distribution and functional contribution of P2X receptors in the CNS.** *Drug Development Research*, 45: 336-341, 1998.

Rodrigues, R. J.; Almeida, T.; Richardson, P. J.; Oliveira, C. R.; Cunha, R. A. **Dual presynaptic control by ATP of glutamate release via facilitatory P2X₁, P2X_{2/3}, and P2X₃ and inhibitory P2Y₁, P2Y₂, and/or P2Y₄ receptors in the rat hippocampus.** *The Journal of Neuroscience*, 25: 6286-6295, 2005.

Ross, C. A.; Ruggiero, D. A.; Joh, T. H.; Parks, D. H.; Reis, D. J. **Rostral ventrolateral medulla: Selective projections to the thoracic autonomic cell column from the region containing C1 neurons.** *The Journal of Comparative Neurology*, 228: 168-85, 1984.

Sampaio, K. N. **Estudo do papel da substância cinzenta periaquedutal na regulação tônica e reflexa da pressão arterial e dos neurônios pré e pós-ganglionares vagais cardíacos no controle de frequência cardíaca e da condução atrioventricular em ratos.** 2001. Tese de doutorado – Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2001.

Scislo, T. J.; Kitchen, A. M.; Augustyniak, R. A.; O'Leary, D. S. **Differential patterns of sympathetic responses to selective stimulation of nucleus tractus solitarius purinergic receptor subtypes.** *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 28(1-2):120-4, Review, 2001.

Scislo, T. J.; O'leary, D. S. **Differential control of renal vs. adrenal sympathetic nerve activity by NTS A2a and P2X purinoceptors.** *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 275: H2130-H2139, 1998.

Scislo, T. J.; Ergene, E.; O'Leary, D. S. **Impaired arterial baroreflex regulation of heart rate after blockade of P2-purinoceptors in nucleus tractus solitarius.** *Brain Research Bulletin*, 47: 63-67, 1998.

Scislo, T. J.; Augustyniak, R. A.; Barraco, R. A.; Woodbury, D. J.; O'Leary, D. S. **Activation of P2X-purinoceptors in the nucleus tractus solitarius elicits differential inhibition of lumbar and renal sympathetic nerve activity.** *Journal of the Autonomic Nervous System*, 62: 103-110, 1997.

Sevoz, S.; Nosjean, A.; Callera, J. C.; Machado, B. H.; Hamon, M.; Laguzzi, R. **Stimulation of serotonin receptors in the nucleus tractus solitarius inhibits the cardiac Bezold-Jarisch reflex response.** *American Journal of Physiology*, 271: H80-7, 1996.

Shigetomi, E.; Kato, F. **Action potential-independent release of glutamate by Ca²⁺ entry through presynaptic P2X receptors elicits postsynaptic firing in the brainstem autonomic network.** *The Journal of Neuroscience*, 24: 3125-3135, 2004.

Sillinsky, E. M.; Kugelgen, I. Von.; Smith, A.; Westfall, D. P. **Functions of extracellular nucleotides in peripheral and central neuronal tissues.** In: Turner, J. T.; Weisman, G. A.; Fedan, J. S. (eds) *The P2 nucleotide receptors.* Humana, Totowa, pp 259-290, 1998.

Soto, F.; Garcia-Guzman M.; Stuhmer W. **Cloned ligand-gated channels activated by extracellular ATP (P2X receptors).** *The Journal of Membrane Biology*, 160: 91-100, 1997.

Spyer, K. M. **The central nervous organization of reflex circulatory control.** In: *Central Regulation of Autonomic Functions.* Edited by: Loewy A. D. and Spyer K. M., Oxford University Press, pp 168-188, 1990.

Spyer, K. M. **Baroreceptor control of vagal preganglionic activity.** In: *Integrative Functions of the Autonomic Nervous System.* Edited by Brooks, C. M.; Koizumi, K.; Sato, A. University of Tokyo Press, pp 283-292, 1979.

St Lambert, J. H.; Thomas, T.; Burnstock, G.; Spyer, K. M. **A source of adenosine involved in cardiovascular responses to defense area stimulation.** *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 272: R195-R200, 1997.

Strobaek, D.; Olesen, S. P.; Christophersen, P.; Dissing, S. **P2-purinoceptor-mediated formation of inositol phosphates and intracellular Ca^{+2} transients in human coronary artery smooth muscle cells.** *British Journal of Pharmacology*, 118: 1645-1652, 1996.

Sun, M. K.; Young, B. S.; Hackett, J. T.; Guyenet, P. G. **Reticulospinal pacemaker neurons of the rat rostral ventrolateral medulla with putative sympathoexcitatory function: An intracellular study *in vitro*.** *Brain Research*, 442: 229-39, 1988.

Sved, A. F.; Gordon, F. J. **Amino acids as central neurotransmitters in the baroreceptor reflex pathway.** *News in Physiological Sciences*, 9: 243-46, 1994.

Taylor, E. W.; Jordan, D.; Coote, J. H. **Central control of the cardio vascular and respiratory systems and their interactions in vertebrates.** *Physiological Reviews*, 79: 855-916, 1999.

Thomas, T.; Spyer, K. M. **ATP as a mediator of mammalian central CO_2 chemoreception.** *Journal of Physiology*, 523.2: 441-447, 2000.

Thomas, T.; Ralevic, V.; Gadd, C. A.; Spyer, K. M. **Central CO_2 chemoreception: a mechanism involving P2 purinoceptors localized in the ventrolateral medulla of the anaesthetized rat.** *Journal of Physiology*, 517: 899-905, 1999.

Thorén, P. **Role of cardiac vagal C-fibers in cardiovascular control.** *Reviews of Physiology Biochemistry and Pharmacology*, 86: 1-94, 1979.

Torres, G. E.; Egan, T. M.; Voigt, M. M. **Hetero-oligomeric assembly of P2X receptor subunits . Specificities exist with regard to possible partners.** *The Journal of Biological Chemistry*, 274: 6653-6659, 1999a.

Torres, G. E.; Egan, T. M.; Voigt, M. M. **Identification of a domain involved in ATP-gated ionotropic receptor subunit assembly.** *The Journal of Biological Chemistry*, 274: 22359-22365, 1999b.

Urbanski, R. W.; Sapru, H. N. **Putative neurotransmitters involved in medullary cardiovascular regulation.** *Journal of the Autonomic Nervous System*, 25: 181-193, 1988a.

Vardhan, A.; Kachroo, A.; Sapru, H. N. **Excitatory amino acid receptors in the nucleus tractus solitarius mediate the responses to the stimulation of cardio-pulmonary vagal afferent C fiber endings.** *Brain Research*, 618: 23-31, 1993.

Vayssettes-Courchay, C.; Bouysset, F.; Laubie, M.; Verbeuren, T. J. **Central integration of the Bezold-Jarisch reflex in the cat.** *Brain Research*, 744(2): 272-8, 1997.

Verberne, A. J.; Saita, M.; Sartor, D. M. **Chemical stimulation of vagal afferent neurons and sympathetic vasomotor tone.** *Brain Research Reviews*, 41: 288-305, 2003.

Verberne, A. J.; Guyenet, P. G. **Medullary pathway of the Bezold-Jarisch reflex in the rat.** *American Journal of Physiology*, 263(6 Pt 2): R1195-202, 1992.

Verberne, A. J. M.; Beart, P. M.; Louis, W. J. **Excitatory amino acid receptors in the caudal ventrolateral medulla mediate a vagal cardiopulmonary reflex in the rat.** *Experimental Brain Research*, 78: 185-192, 1989.

Von Euler, C. **Brain stem mechanisms for generation and control of breathing pattern.** In Anonymous (Ed.) *Handbook of Physiology*, American physiological Society, Washington, DC, pp 1-67, 1979.

Vorkhratsky, A. **Physiology and pathophysiology of the calcium store in the endoplasmic reticulum of neurons.** *Physiological Reviews*, 85: 201-279, 2005.

Willette, R. N.; Punnen, S.; Krieger, A. J.; Sapru, H. N. **Interdependence of rostral and caudal ventrolateral medullary areas in the control of blood pressure.** *Brain Research*, 321(1): 169-74, 1984.

Willete, R. N.; Gatti, P.; Gertner, S. B.; Sapru, H. N. **Pulmonary vagal afferent stimulants in conscious rats: opioids and phenylbiguanide.** *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 17: 19-23, 1982.

Yao, S. T.; Lawrence, A. J. **Purinergic modulation of cardiovascular function in the rat locus coeruleus.** *British Journal of Pharmacology*, 202(2): 121-3, 2005.

Yao, S. T.; Barden, J. A.; Finkelstein, D. I.; Bennett, M. R.; Lawrence, A. J. **Comparative study on the distribution patterns of P2X1-P2X6 receptor immunoreactivity in the brainstem of the rat and the common marmoset (*Callithrix jacchus*): Association with catecholamine cell groups.** *The Journal of Comparative Neurology*, 427: 485-507, 2000.

Yardley, C. P.; Andrade, J. M.; Weaver, L. C. **Evaluation of cardiovascular control by neurons in the dorsal medulla of rats.** *Journal of the Autonomic Nervous System*, 29: 1-11, 1989.

Yu, D.; Gordon, F. J. **Anatomical evidence for a bi-neuronal pathway connecting the nucleus tractus solitarius to caudal ventrolateral medulla to rostral ventrolateral medulla in the rat.** *Neuroscience Letters*, 205: 21-4, 1996.

Zanchetti, A.; Mancia, G. **Cardiovascular reflexes and hypertension.** *Hypertension*, 18 (supl. III): III-13 – III-21, 1991.

Zimmermann, H. **Extracellular purine metabolism.** *Drug Development Research*, 39: 337-352, 1996.

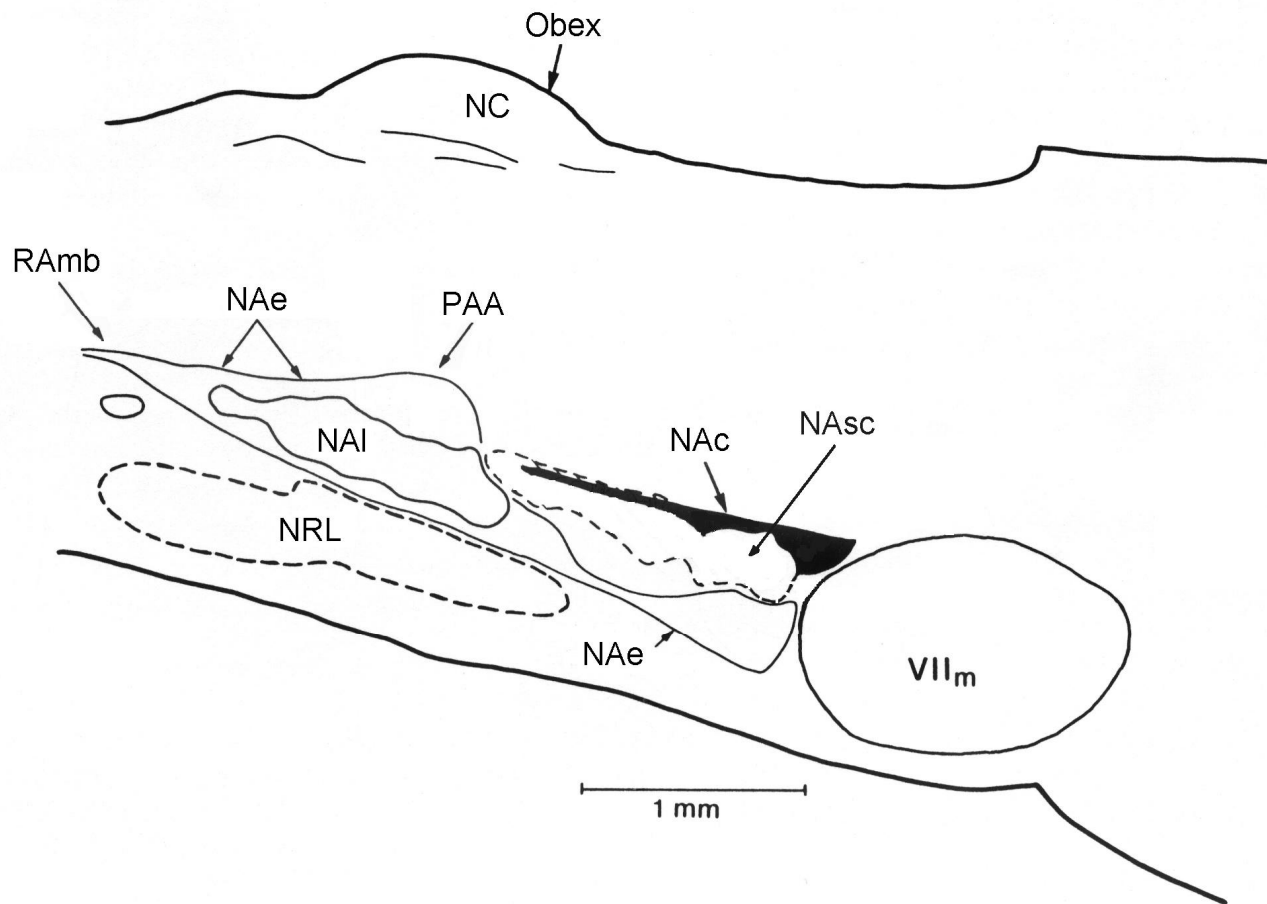
Zucker, I. H. **Left ventricular receptors: physiological controllers or pathological curiosities.** *Basic Research in Cardiology*, 81: 539-557, 1989.

APÊNDICE

Mudanças na PAM e FC promovidas pela microinjeção de L-Glutamato (5,0 nmol/50 nL) no NA de ratos.

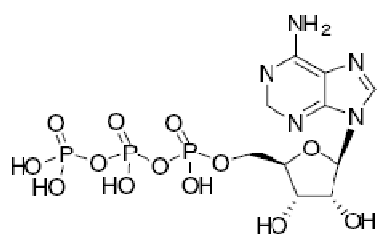
MICROINJEÇÕES DE L-GLUTAMATO NO NA			
Protocolos	N	Δ PAM (mmHg)	Δ FC (bpm)
1	37	18,8 ± 2,9	-166,6 ± 9,4
2	6	28,8 ± 3,4	-124,1 ± 10,7
3	5	5,8 ± 13,9	-178,1 ± 10,8
4	5	25,9 ± 4,3	-164,7 ± 12,0
5	9	16,6 ± 10,0	-141,6 ± 13,9
6	7	24,8 ± 3,3	-154,0 ± 11,0
7	9	5,8 ± 6,6	-149,5 ± 7,4
8	9	19,2 ± 4,7	-146,8 ± 12,3

ANEXOS

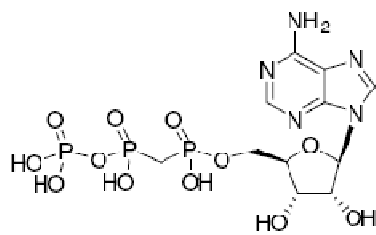


Esquema representativo das subdivisões no núcleo ambíguo (NA) no tronco cerebral do rato. NAc - núcleo ambíguo compacto; NAe - núcleo ambíguo, formação externa; NAI - núcleo ambíguo, formação reticulada (*loose formation*); NAsc - núcleo ambíguo semi-compacto; NC - núcleo cuneatus; NRL - núcleo reticular lateral; PAA - núcleo paraambigualis; RAmb - núcleo retroambíguo; VII_m - núcleo facial medial. (Modificado de Bieger E Hopkins, 1987).

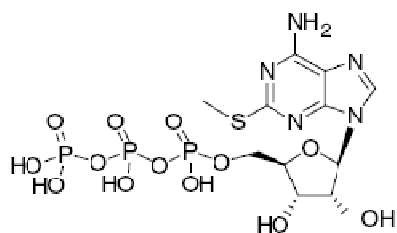
Alguns agonistas de receptor P2



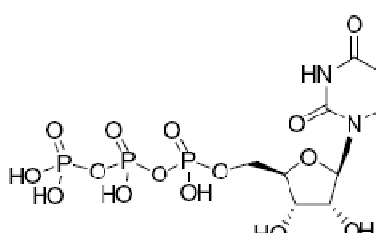
ATP



$\alpha\beta$ -meATP

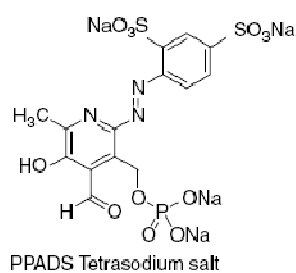


2-meSATP

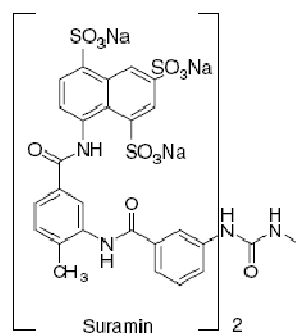


UTP

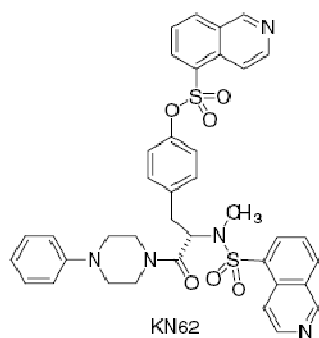
Alguns antagonistas de receptor P2



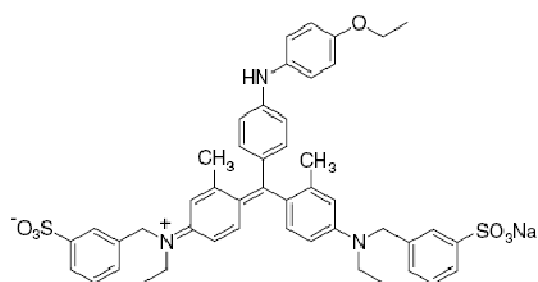
PPADS Tetrasodium salt



Suramin 2



KN62



Brilliant Blue G

Estruturas de alguns agonistas e antagonistas de receptores purinérgicos P2 (Modificado de Donnelly-Roberts e Jarvis, 2007).