

DIFERENTES ABORDAGENS EXPERIMENTAIS NO ESTUDO DA MODULAÇÃO DA ATIVIDADE SIMPÁTICA NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL DE RATOS

DIFFERENT EXPERIMENTAL APPROACHES TO STUDY THE SYMPATHETIC MODULATION IN THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM OF RATS

Benedito H Machado¹, Josiane C Cruz², Gisela P Pajolla³, Daniel B Zoccal², Valdir A Braga², Daniela Accorsi-Mendonça³

¹Docente. Departamento de Fisiologia. ²Pós-Graduandos do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia. ³Pós-Doutorandas do Departamento de Fisiologia. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP.

CORRESPONDÊNCIA: Benedito H. Machado. Departamento de Fisiologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP, CEP 14049-900, Ribeirão Preto, SP, Brasil. Fone: 55-16-3602-3015; FAX: 55-16-3633-0017; e-mail: bhmachad@fmrp.usp.br.

Machado BH, Cruz JC, Pajolla GP, Zoccal DB, Braga VA, Accorsi-Mendonça D. Diferentes abordagens experimentais no estudo da modulação da atividade simpática no sistema nervoso central de ratos. Medicina (Ribeirão Preto) 2006; 39 (1): 101-109.

RESUMO: Essa revisão tem como objetivo apresentar a experiência do nosso laboratório, acumulada ao longo dos últimos anos no estudo da neurotransmissão do componente simpato-excitatório do quimiorreflexo no núcleo do trato solitário (NTS) de ratos. Essa abordagem experimental tem sido utilizada como um modelo para o melhor entendimento dos mecanismos neuroquímicos envolvidos na geração e modulação da atividade simpática, a qual tem importantes repercussões para o sistema cardiovascular tanto em condições fisiológicas quanto em condições fisiopatológicas como a hipertensão arterial. O foco específico dessa revisão está centrado na neurotransmissão do componente simpato-excitatório do quimiorreflexo no núcleo do trato solitário (NTS) e apresentamos vários métodos e abordagens experimentais que estão sendo utilizados com vistas ao melhor entendimento desse complexo sistema de neurotransmissão. Com essa combinação de métodos, que vão desde um neurônio do NTS até o rato acordado e com livre movimentação, queremos ilustrar as múltiplas possibilidades de abordagens experimentais contemporâneas, as quais estão nos proporcionando as condições materiais para estender os horizontes dessa importante área do conhecimento.

Descritores: Quimiorreflexo. NTS. Hipóxia. Sistema Nervoso Autônomo. L-glutamato. ATP. Pressão Arterial.

1 - INTRODUÇÃO

O completo entendimento dos mecanismos centrais envolvidos na geração e modulação da atividade autonômica simpática para o coração e os vasos arteriais, continua sendo uma das fronteiras do conhecimento ainda por ser explorada e conquistada. Considerando a importância dos problemas que afetam o

sistema cardiovascular e em especial a hipertensão arterial de origem neural, temos justificativas para os fisiologistas se ocuparem de projetos de pesquisa na busca dessa fronteira. O nosso laboratório vem se dedicando ao estudo da modulação da atividade eferente simpática no sistema nervoso central. Nesse contexto, o nosso foco de investigação se concentra na neurotransmissão das aferências dos quimiorrecep-

tores periféricos no núcleo do trato solitário (NTS), uma estrutura de localização dorsal no tronco cerebral que recebe as informações aferentes sensoriais, incluindo aquelas do barorreflexo, do reflexo cardiopulmonar e do quimiorreflexo^{1,2,3}.

A justificativa para se estudar a neurotransmissão do quimiorreflexo no NTS é relativamente simples: ainda que esse reflexo seja normalmente ativado apenas em condições de hipóxia, isso resulta em respostas ventilatórias e autonômicas importantes, com especial destaque para uma grande elevação da pressão arterial resultante do aumento da atividade eferente simpática^{4,5}. Dessa forma, o modelo experimental para a ativação dos quimiorreceptores periféricos por hipóxia hipóxica (diminuição da PO₂) ou hipóxia citotóxica [injeção intravenosa de baixas concentrações de cianeto de potássio (KCN)] nos parecem escolhas apropriadas para a excitação de diferentes áreas do sistema nervoso central envolvidas com a geração e modulação da atividade simpática⁶. Nesse cenário, as primeiras sinapses das aferências dos quimiorreceptores periféricos ocorrem no NTS e os neurotransmissores e neuromoduladores envolvidos no processamento dos componentes autonômicos e respiratórios do quimiorreflexo ainda não foram estabelecidos.

Para o estudo adequado das aferências do quimiorreflexo temos utilizado diferentes abordagens experimentais, sendo a principal delas os estudos farmacológicos, por meio das microinjeções no NTS de ratos não-anestesiados. Essa abordagem, inicialmente descrita por Michelini e Bonagamba⁷ nos permitiu uma séria de avanços para o melhor entendimento dos neurotransmissores e dos seus diferentes subtipos de receptores envolvidos no processamento dos componentes autonômicos simpático e parassimpático, como também do componente ventilatório em resposta à ativação do quimiorreflexo. Além dessa abordagem envolvendo o animal não-anestesiado e com livre movimentação, temos utilizado outras abordagens complementares como a preparação coração tronco-cerebral isolados, a imunohistoquímica de receptores do L-glutamato e do ATP, a eletrofisiologia (patch-clamp) de neurônios do NTS em fatias do tronco cerebral, e a hipóxia intermitente para uma ativação freqüente e a longo prazo do quimiorreflexo. Os itens subseqüentes se referem a cada uma dessas abordagens experimentais e destacam os principais resultados obtidos, bem como as vantagens e desvantagens de cada um desses procedimentos experimentais.

2- MICROINJEÇÕES DE ANTAGONISTAS DE RECEPTORES DE AMINOÁCIDOS EXCITATÓRIOS NO NTS DE RATOS NÃO ANESTESIADOS

A ativação do quimiorreflexo com a injeção intravenosa de KCN no rato acordado foi descrita de forma elegante por Franchini e Krieger⁴. Esses autores descreveram as respostas cardiovasculares e respiratórias à ativação do quimiorreflexo com KCN no rato acordado e mostraram que sob os efeitos da anestesia a magnitude dessas respostas era significativamente menor. A injeção de KCN nas doses entre 80 e 120 µg/kg promove, no rato acordado, uma elevação significativa da pressão arterial, a qual é essencialmente dependente da atividade eferente simpática, pois a mesma foi bloqueada com o tratamento prévio com o prazosin, um antagonista α -1 adrenérgico⁵ e não foi alterada pelo antagonismo dos receptores da vasopressina⁸. Além disso, a ativação do quimiorreflexo promove uma intensa resposta de bradicardia, a qual não é secundária a ativação dos barorreceptores decorrente da elevação da pressão arterial, pois mesmo após o bloqueio da resposta pressora com o prazosin, a resposta de bradicardia não se alterou⁵. Esses resultados mostraram que a ativação do quimiorreflexo promove duas respostas autonômicas independentes, isto é, uma resposta simpato-excitatória e uma resposta de excitação parassimpática.

Os nossos experimentos iniciais tiveram como objetivo avaliar o envolvimento dos receptores de aminoácidos excitatórios na neurotransmissão dos componentes autonômicos simpático e parassimpático do quimiorreflexo no NTS de ratos não-anestesiados. Nesse sentido, o trabalho de Haibara et al.⁵ mostrou que o componente parassimpático (bradicardia) foi bloqueado de forma dose-dependente pelo AP-5, um antagonista seletivo dos receptores NMDA, quando microinjetado no NTS intermediário bilateralmente. No entanto, esse estudo mostrou que a resposta pressora do quimiorreflexo não foi alterada pelo antagonismo dos receptores NMDA. Na etapa seguinte o objetivo foi promover o bloqueio dos receptores não-NMDA com a finalidade de bloquear a resposta pressora do quimiorreflexo, a qual seria provavelmente mediada por esses subtipos de receptores⁹. Nesse sentido foram realizadas microinjeções do DNQX, um antagonista seletivo dos receptores não-NMDA, no NTS de ratos não anestesiados e surpreendentemente a resposta pressora não foi bloqueada. A microinje-

ção do ácido quinurênico, um antagonista não-seletivo dos receptores de aminoácidos excitatórios, também não bloqueou a resposta pressora (simpato-excitatória) do quimiorreflexo. Ainda que esse conjunto de resultados pudesse, num primeiro momento, sugerir que o L-glutamato e os receptores de aminoácidos excitatórios não participariam da neurotransmissão do componente simpatoexcitatório do quimiorreflexo no NTS, essas evidências não foram conclusivas, pois tanto a microinjeção do DNQX quanto a do ácido quinurênico no NTS promoveram elevações significativas da pressão arterial basal, provavelmente por bloquear a via simpato-inibitória do barorreflexo. Dessa forma, a redução na magnitude da resposta pressora à ativação do quimiorreflexo observada após a microinjeção desses antagonistas no NTS poderia ser secundária a elevação da pressão arterial basal e não necessariamente decorrente do bloqueio das vias neurais envolvidas com o componente simpato-excitatório do quimiorreflexo no NTS.

Para solucionar o impasse experimental gerado por essas manipulações dos receptores não-NMDA no NTS, provavelmente decorrente do bloqueio da via simpato-inibitória do barorreflexo, e conseqüente elevação da pressão arterial, passamos a desenvolver um novo protocolo experimental no qual a ativação do quimiorreflexo foi feita antes e após a microinjeção de ácido quinurênico no NTS. Após a microinjeção do ácido quinurênico foi feita a normalização da pressão arterial por meio da infusão intravenosa de nitroprusiato de sódio e a seguir, quando a pressão arterial basal se encontrava nos níveis basais, o quimiorreflexo foi novamente ativado. Nesses experimentos verificamos de forma clara que o bloqueio dos receptores de aminoácidos excitatórios no NTS não promoveu nenhuma alteração na magnitude da resposta pressora à ativação do quimiorreflexo¹⁰. Dessa forma, o conjunto dos nossos resultados sobre a neurotransmissão do componente simpato-excitatório do quimiorreflexo no NTS indica que o antagonismo dos receptores do L-glutamato no NTS não bloqueia a resposta simpato-excitatória do quimiorreflexo. Esses achados abriram novas e interessantes possibilidades sobre as características da neurotransmissão do componente simpato-excitatório do quimiorreflexo no NTS e a partir dos mesmos passamos a considerar a possível participação de outros neurotransmissores nesse processamento, com especial atenção para o ATP e os receptores P₂, uma vez que estudos de Yao et al.¹¹ documentaram a presença de receptores P₂ do ATP no NTS de ratos.

Os nossos estudos correspondentes as microinjeções de ATP no NTS de ratos não-anestesiados mostraram que essa purina promoveu aumento na pressão arterial e bradicardia semelhante às respostas à ativação do quimiorreflexo, o que nos permitiu sugerir que o ATP poderia participar na neurotransmissão desse reflexo no NTS¹². Em estudo subsequente envolvendo registro da ventilação, por meio da pletismografia de corpo inteiro, verificamos que a microinjeção do ATP no NTS intermediário, sub-região correspondente às sinapses do barorreflexo, promoveu o aumento da pressão arterial, bradicardia e apnéia. No entanto, quando o ATP foi microinjetado no NTS caudal, sub-região correspondente às sinapses do quimiorreflexo, verificamos um grande aumento da pressão arterial associado a uma resposta de taquipnéia, o que efetivamente contribuiu ainda mais para a nossa hipótese sobre o possível envolvimento do ATP e dos seus receptores no processamento da resposta simpato-excitatória e ventilatória do quimiorreflexo no NTS caudal¹³. Portanto, esse conjunto de resultados relativos ao ATP atuando como um possível neurotransmissor ou co-transmissor da aferências dos quimiorreceptores periféricos no NTS caudal nos permitiram considerar o envolvimento do ATP no processamento do quimiorreflexo no NTS caudal e atualmente estamos utilizando várias abordagens experimentais para confirmar essa hipótese. No entanto, temos que admitir que o uso de animais acordados com livre movimentação oferece uma série de limitações para registros de atividade neural, para a manipulação de diferentes sub-regiões do sistema nervoso central simultaneamente e mesmo para o controle de variáveis fisiológicas como a pressão arterial e a ventilação em respostas aos diferentes procedimentos experimentais. Dessa forma, temos utilizado diferentes abordagens experimentais complementares ao animal acordado, a fim de testar a hipótese relativa à participação do ATP como um neurotransmissor/neuromodulador ou co-transmissor das vias neurais do quimiorreflexo no NTS caudal.

3- MICROINJEÇÕES NO NTS NA PREPARAÇÃO CORAÇÃO-TRONCO CEREBRAL ISOLADOS

Nos resultados descritos acima, envolvendo a neurotransmissão do componente simpato-excitatório do quimiorreflexo no NTS, quantificamos as alterações na pressão arterial como um índice indireto das variações na atividade eferente simpática. No entan-

to, uma das limitações da avaliação do componente simpato-excitatório do quimiorreflexo por meio das alterações na pressão arterial é o fato de que manipulações no sistema nervoso central, por meio da microinjeção de antagonistas como o ácido quinurênico no NTS podem influenciar outros sistemas de regulação como o barorreflexo e conseqüentemente alterar a pressão arterial basal, tornando difícil a análise e a interpretação dos resultados. Nesse sentido, recentemente introduzimos no nosso laboratório a preparação coração-tronco cerebral isolados, a qual foi desenvolvida pelo professor Julian F.R. Paton, na Universidade de Bristol, Inglaterra¹⁴.

A preparação coração-tronco cerebral isolados consiste de uma preparação *in situ*, na qual os experimentos são realizados na ausência dos efeitos da anestesia. As etapas para a obtenção dessa preparação e as suas principais características são as seguintes:

- a) o animal é inicialmente anestesiado com um anestésico de inalação e logo a seguir descerebrado,
- b) é feita uma transecção subdiafragmática, retirado todo o sangue e por meio da artéria aorta se inicia a perfusão artificial com uma solução de fluido cerebrospinal artificial propulsada por meio de uma bomba peristáltica, cuja velocidade (fluxo) determinará o nível da pressão de perfusão,
- c) a preparação possui um padrão respiratório motor “eupnéico”,
- d) todos os reflexos cardiovasculares estão preservados,
- e) permite os registros da frequência cardíaca, da atividade do nervo frênico e principalmente o registro direto da atividade eferente simpática torácica.

Além disso, a preparação coração-tronco cerebral isolados permite a obtenção de um elevado índice de histologias positivas nos experimentos com microinjeções no NTS, uma vez que a superfície dorsal do tronco cerebral é exposta e facilmente acessível com as micropipetas de vidro, acopladas ao estereotáxico e conectadas a uma bomba de pressão para a injeção de drogas no NTS.

Tendo em vista os resultados obtidos em ratos acordados com a microinjeção do ATP no NTS descritos no item anterior^{12,13}, passamos a utilizar a preparação-coração tronco cerebral isolados para explorar o possível envolvimento do ATP na neurotransmissão do quimiorreflexo no NTS. Nesse sentido é importante destacar que a ativação do quimiorreflexo com KCN na preparação coração-tronco cerebral iso-

lados promove aumento da atividade simpática, bradicardia e aumento da atividade do nervo frênico, o que contribui para que essa preparação seja um modelo experimental adequado para esse tipo de estudo. Os resultados obtidos com a preparação coração-tronco cerebral isolados, mostraram que a microinjeção de ATP no NTS intermediário, sub-região correspondente às sinapses do barorreflexo, promoveu respostas de bradicardia, apnéia e inibição simpática de forma dependente da dose; essas respostas são típicas daquelas observadas quando da ativação de neurônios envolvidos no controle barorreflexo. Por outro lado, a microinjeção do ATP no NTS caudal, sub-região correspondente às sinapses do quimiorreflexo, promoveu respostas de bradicardia e taquipnéia dependentes da dose, mas não promoveu qualquer alteração na atividade simpática, sugerindo que os neurônios do NTS que enviam projeções para o RVLM, envolvidos na resposta simpato-excitatória do quimiorreflexo, não são excitados pelo ATP. Vale lembrar que a preparação coração-tronco cerebral isolados é um modelo experimental que envolve a decerebração ao nível dos colículos, e conseqüentemente as conexões entre o NTS e o núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) estão ausentes. Dessa forma, podemos sugerir que o ATP poderia promover a excitação de neurônios do NTS que enviam projeções para o PVN, o qual é parte integrante das vias neurais do quimiorreflexo¹⁵. O aumento da frequência de despolarização do nervo frênico (taquipnéia) observada no estudo de Antunes et al.¹⁶ deu suporte adicional para a hipótese de que o ATP atuando no NTS caudal excitaria neurônios envolvidos no controle da resposta respiratória do quimiorreflexo¹³.

Com relação ao envolvimento do L-glutamato e dos seus receptores na neurotransmissão do quimiorreflexo no NTS na preparação coração-tronco cerebral isolados, verificamos que a microinjeção de diferentes antagonistas dos receptores de aminoácidos excitatórios, como o ácido quinurênico (antagonista não seletivo dos receptores ionotrópicos do glutamato) ou o MCPG (antagonista não seletivo dos receptores metabotrópicos do glutamato), no NTS caudal não alterou a magnitude das respostas simpato-excitatória e do nervo frênico promovidas pela ativação dos quimiorreceptores periféricos, sugerindo que o L-glutamato e os seus receptores não parecem estar envolvidos na neurotransmissão do componente simpato-excitatório do quimiorreflexo no NTS caudal, pelo menos no que diz respeito aos neurônios do NTS que enviam projeções para os neurônios do RVLM¹⁷. Esses re-

sultados estão de acordo com estudos descritos no item anterior com ratos não-anestesiados. Atualmente estamos explorando a possível interação entre o L-glutamato e o ATP no processamento das informações aferentes dos quimiorreceptores periféricos no NTS e as perspectivas para o melhor entendimento desse complexo sistema de neurotransmissão do componente simpato-excitatório do quimiorreflexo no NTS são excelentes.

A preparação coração-tronco cerebral isolados como destacado anteriormente oferece uma série de vantagens. No entanto ela tem, como todos os procedimentos experimentais, as suas limitações entre as quais destacamos:

- a) o animal é decerebrado o que impossibilita os estudos de conexões prosencefálicas com as estruturas do tronco cerebral;
- b) a preparação é mantida numa temperatura de aproximadamente 32° C, diferente daquela do animal intacto;
- c) a preparação é perfundida com uma solução artificial e não mais com sangue;
- d) a pressão de perfusão da preparação é baixa (~60 mmHg) e determinada pela velocidade da bomba de perfusão;
- e) os barorreceptores artérias nestas condições encontram-se desativados. Apesar dessas limitações a preparação mantém ventilação espontânea e todos os reflexos cardiovasculares estão preservados. Em geral as preparações são viáveis por períodos de até 3 horas de duração.

4- ELETROFISIOLOGIA *PATCH-CLAMP* DE NEURÔNIOS DO NTS EM FATIAS DO TRONCO CEREBRAL

Embora a utilização das técnicas de microinjeções no NTS de animais não-anestesiados e na preparação coração-tronco cerebral isolados tenham trazido grandes contribuições para o estudo da neurotransmissão do quimiorreflexo, os resultados obtidos a partir dessa abordagem não foram suficientes para identificar o neurotransmissor envolvido no processamento do componente simpato-excitatório (resposta pressora) do quimiorreflexo. Para isso é necessária a utilização de técnicas refinadas para a avaliação da neurotransmissão no NTS. Com essa finalidade introduzimos no nosso laboratório a técnica eletrofisiológica de *patch-clamp* em fatias do tronco cerebral, a qual está nos permitindo estudar em detalhes os me-

canismos eletrofisiológicos da membrana celular e também aspectos funcionais da transmissão sináptica em neurônios do NTS.

Embora as células do NTS apresentem um diâmetro pequeno, a utilização da técnica de *patch-clamp* nessas células já tem sido bastante utilizada por outros laboratórios especializados na eletrofisiologia de neurônios do NTS^{18,22}. Esses estudos permitem o registro de correntes iônicas macro e/ou microscópicas que fluem pela membrana celular através de canais iônicos, como também a detecção de modificações no potencial da membrana em resposta ao fluxo desses íons. Assim, com a implantação dessa técnica em nosso laboratório temos como objetivo principal avaliar os diferentes aspectos da neurotransmissão nos neurônios integrantes das vias neurais do quimiorreflexo no NTS. Nosso foco principal corresponde à identificação dos neurônios do NTS que enviam projeções para o RVLM, os quais poderiam fazer parte das projeções simpato-excitatórias do quimiorreflexo. A prévia marcação com o traçador retrógrado DiI (corante fluorescente) desses neurônios do NTS que enviam projeções para o RVLM, permite que os mesmos sejam identificados sob microscopia de contraste e então realizados os estudos eletrofisiológicos dos mesmos. Nesses experimentos podemos, na configuração *voltage-clamp* (-70 mV), fazer o registro eletrofisiológico de correntes pós-sinápticas espontâneas excitatórias (sEPSCs) ou excitatórias estimuladas (eEPSCs) pelo estímulo elétrico do Trato Solitário. Posteriormente avaliamos também se os receptores do L-glutamato e/ou do ATP participam da sinapse excitatória entre esses neurônios, por meio da perfusão da fatia com antagonistas seletivos para esses receptores e registro das sEPSCs e eEPSCs. O possível bloqueio dessas correntes sinápticas pelos antagonistas dos receptores de L-glutamato e/ou ATP nos permitirão identificar se esses neurotransmissores estão envolvidos na sinapse entre os neurônios do NTS e RVLM, supostamente envolvidos na resposta simpato-excitatória do quimiorreflexo. Com esses procedimentos experimentais esperamos poder caracterizar os neurotransmissores e neuromoduladores envolvidos no processamento do componente simpato-excitatório do quimiorreflexo no NTS.

Embora a técnica de *patch-clamp* permita o registro da atividade neuronal ela, como as demais técnicas experimentais, apresenta as suas limitações, entre as quais podemos destacar:

- a) é uma abordagem experimental *in vitro*;

- b) permite a cada experimento o registro de um único neurônio, o que implica necessariamente no registro de um elevado número de neurônios para que os achados sejam representativos da atividade dos neurônios daquele núcleo em estudo;
- c) alguns dos circuitos neuronais podem ser seccionados durante a obtenção da fatia, o que pode eventualmente comprometer a integração sináptica em análise. Portanto, mais uma vez vale ressaltar que apenas a combinação de vários procedimentos técnicos e experimentais nos permitirão um melhor entendimento dessa complexa neurotransmissão/neuromodulação nos neurônios do NTS.

5- HIPÓXIA INTERMITENTE

A hipóxia intermitente (HI) é uma condição experimental que consiste em submeter os animais a episódios de hipóxia intercalados por períodos de normóxia, os quais se repetem por um longo período de tempo. Esse modelo experimental, inicialmente desenvolvido por Fletcher et al.²³, tem sido utilizado para promover em ratos as situações de hipóxia semelhantes àquelas observadas nos pacientes acometidos pela apnéia obstrutiva do sono (AOS). O interesse em mimetizar essa condição fisiopatológica em modelos animais decorreu de observações sobre a evolução clínica desses pacientes ao longo de anos, nos quais foi verificada uma grande incidência de problemas cardiovasculares, com destaque para o desenvolvimento da hipertensão arterial²⁴.

Os estudos de Fletcher et al.²³ verificaram que ratos expostos a uma redução da PO₂ de 21% a 5% a cada 30 segundos, 8 horas por dia, durante 5 semanas, apresentavam um aumento significativo da pressão arterial média, assim como observado nos pacientes com AOS. Estudos de Fletcher et al.²⁵ também mostraram que quando os animais eram submetidos a desnervação dos quimiorreceptores periféricos localizados nos corpúsculos carotídeos, os mesmos não apresentavam o aumento da pressão arterial média em resposta a HI, indicando que as alterações na pressão arterial eram decorrentes da estimulação dos quimiorreceptores periféricos a cada episódio de hipóxia.

Vários estudos sugeriram que esse aumento da pressão arterial observado nos ratos submetidos à HI seria decorrente de uma hiperatividade simpática^{26,27}, assim como foi mostrado nos pacientes com AOS²⁸. Portanto, partindo da premissa de que ratos submetidos à HI poderiam apresentar um aumento da atividade simpática basal, passamos a utilizar esse modelo

experimental para o estudo dos mecanismos neurais envolvidos com a gênese e a modulação da atividade simpática. Tendo em vista que não havia evidências diretas de que a atividade simpática estivesse realmente aumentada após a HI, utilizamos a análise espectral para avaliar a variabilidade do componente simpático sobre o sistema cardiovascular. Além disso, também realizamos a avaliação do tônus simpático vasomotor após a HI por meio da administração do bloqueador ganglionar hexametônio ou do antagonista dos receptores α 1-adrenérgicos prazosin. O conjunto dos resultados obtidos indicou que a atividade simpática de ratos submetidos à HI não parece estar aumentada²⁹, contrariando as sugestões feitas anteriormente por outros autores. Além disso, estudos do nosso laboratório, utilizando esse modelo experimental indicaram que o aumento de pressão arterial observado após a HI seria decorrente de alterações hormonais, as quais poderiam influenciar o controle do tônus vascular²⁹.

Dessa forma, o modelo experimental da HI, no nosso entendimento, não parece se caracterizar por uma hiperatividade simpática. No entanto, mesmo não apresentando um aumento da atividade simpática basal, esse modelo nos parece adequado para o estudo dos mecanismos centrais envolvidos com a geração e modulação da atividade simpática, pois já foi demonstrado que ratos submetidos à HI, quando expostos a um novo episódio de hipóxia, apresentam as respostas simpato-excitatória³⁰ e ventilatória³¹ exacerbadas. Considerando que o NTS é a região na qual ocorrem as sinapses das aferências dos quimiorreceptores, e que nesse núcleo diferentes neurotransmissores estão envolvidos com o processamento das respostas autonômicas e ventilatórias, é provável que ocorram alterações na neurotransmissão do quimiorreflexo no NTS após a HI, as quais poderiam explicar as respostas exacerbadas quando os animais são submetidos a uma nova situação de hipóxia. Portanto, o entendimento dessas possíveis alterações no NTS poderá nos auxiliar na determinação dos neurotransmissores envolvidos nas diferentes respostas do quimiorreflexo, especialmente do componente simpato-excitatório, o qual é o principal foco de investigação do nosso laboratório.

6- IMUNOHISTOQUÍMICA DE RECEPTORES NO NTS E EXPRESSÃO DA PROTEÍNA FOS

O NTS é dividido, no seu aspecto rostro-caudal, em três sub-núcleos: NTS rostral, NTS comissural intermediário e NTS comissural caudal³². Estudos

anatômicos³³ e funcionais^{34,35} mostraram a participação do NTS comissural nas vias neurais do quimiorreflexo. Com a finalidade de identificar mais precisamente as diferentes sub-regiões do NTS comissural intermediário e do NTS comissural caudal envolvidas no processamento das informações aferentes dos quimiorreceptores periféricos, estamos utilizando técnicas de imunohistoquímica. A ativação intermitente do quimiorreflexo por períodos de 30 minutos pode promover a expressão da proteína Fos, a qual corresponde a uma proteína de transcrição e que faz parte da família dos *immediate early gene*, cuja expressão inicia-se poucos minutos após a excitação neuronal. Portanto, a expressão da proteína Fos, revelada por meio de procedimentos de imunohistoquímica, pode ser utilizada como um indicador da atividade neuronal^{36/39}. Nos nossos estudos verificamos que o estímulo intermitente do quimiorreflexo com KCN (i.v.) por 30 minutos ativa neurônios nos aspectos laterais tanto do NTS comissural intermediário quanto do NTS comissural caudal⁴⁰. A localização específica desses neurônios em sub-regiões do NTS nos permitirá uma melhor caracterização eletrofisiológica e neuroquímica dos neurônios do NTS envolvidos na neurotransmissão do quimiorreflexo no NTS.

Além de ser utilizada na revelação da expressão da proteína FOS, temos utilizado os procedimentos de imunohistoquímica para a marcação de subunidades específicas de receptores de aminoácidos excitatórios (AAE) com vistas ao melhor entendimento dos complexos mecanismos neuroquímicos no NTS envolvidos na neurotransmissão do quimiorreflexo. Nesses estudos temos utilizado a técnica de imunofluorescência para a análise das diferentes subunidades dos receptores de AAE e dos receptores P₂ do ATP no NTS de ratos submetidos à hipóxia intermitente (HI), na qual o quimiorreflexo, como descrito anteriormente, é ativado de forma intermitente ao longo de várias semanas. Optamos pela técnica de imunofluorescência por ser um método mais sensível que os métodos enzimáticos na revelação da imunorreatividade aos diferentes subtipos de receptores⁴¹. Os métodos enzimáticos apresentam uma maior difusão da imunomarcação, pois os neurônios apresentam muitas enzimas endógenas que precisam ser bloqueadas e a realização deste bloqueio pode afetar a morfologia do tecido, o que não acontece com o método de imunofluorescência. Além disso, a imunofluorescência é um método estequiométrico, pois o anticorpo secundário já vem com o marcador fluorescente. Portanto, uma molécula de anti-

corpo secundário com o marcador fluorescente irá se ligar ao antígeno, enquanto que no método enzimático a reação de revelação do antígeno que ocorre não é estequiométrica, isto é, não há controle da quantidade de DAB (diaminobenzidina) que irá reagir com a enzima (peroxidase) que está presente na molécula do anticorpo secundário. Dessa forma, na imunomarcação com métodos enzimáticos não há correlação entre intensidade óptica e a concentração de antígeno. Adicionalmente, uma outra vantagem da imunofluorescência é que este método permite uma melhor definição na localização de diferentes antígenos numa mesma célula ou tecido por meio da utilização de fluorocromos de cores diferentes⁴².

Uma das limitações desses métodos de imunomarcação se refere ao fato dos mesmos não serem quantitativos, o que dificulta a identificação de eventuais alterações na densidade de um determinado subtipo de receptor numa região específica do sistema nervoso central, como no caso do NTS. Portanto, além dos estudos qualitativos por meio da imunofluorescência das diferentes subunidades dos receptores de aminoácidos excitatórios e dos receptores P₂ do ATP no NTS de ratos submetidos à HI, estamos utilizando os procedimentos semi-quantitativos por meio da técnica de Western-blot, a qual se caracteriza pela separação, por meio da eletroforese, das proteínas de um homogenato de células ou tecidos, que após serem transferidas para uma membrana de nitrocelulose podem ser imunodetectadas e quantificadas. Com essa abordagem experimental queremos avaliar se a HI promove alterações na densidade dos receptores glutamatérgicos e purinérgicos no NTS, uma vez que evidências experimentais sugerem que estes dois sistemas de neurotransmissão possam estar atuando conjuntamente no processamento do componente simpato-excitatório do quimiorreflexo no NTS.

7- PERSPECTIVAS

Os estudos concluídos ou em andamento no nosso laboratório relacionados a neurotransmissão do componente simpato-excitatório do quimiorreflexo no NTS de ratos indicam que o L-glutamato e os receptores de aminoácidos excitatórios não parece ser o único sistema de neurotransmissão do quimiorreflexo e apontam para uma possível participação do ATP e dos receptores P₂ nesse processamento. Os mecanismos e as possíveis interações entre os sistemas glutamatérgicos e purinérgicos nessa importante neuro-

transmissão continua sendo objeto de estudos, com particular interesse na possível co-transmissão pelo L-glutamato e o ATP. Para isso, diferentes abordagens experimentais como a eletrofisiologia e a imunohistoquímica serão indispensáveis para o melhor conhecimento da neuroquímica dessa neurotransmissão. Caso esses mecanismos glutamatérgicos e purinérgicos estejam efetivamente envolvidos na neurotransmissão desse componente simpato-excitatório no NTS, estaremos abrindo um campo de investigação importante relacionado aos mecanismos neurais de disfunções autonômicas como a hiperatividade simpática,

responsável, pelo menos em parte, pela geração e manutenção da hipertensão arterial. Nesse sentido, o uso de diferentes abordagens experimentais, desde um neurônio isolado do NTS até o rato acordado e com livre movimentação, será indispensável para que essa fronteira do conhecimento seja conquistada.

AGRADECIMENTOS

Os estudos do nosso laboratório citados na presente revisão tiveram o apoio financeiro da FAPESP, CNPQ, PRONEX e CAPES.

Machado BH, Cruz JC, Pajolla GP, Zoccal DB, Braga VA, Accorsi-Mendonça D. Different experimental approaches to study the sympathetic modulation in the central nervous system of rats. *Medicina (Ribeirão Preto)* 2006; 39 (1): 101-109.

ABSTRACT: The main purpose of the present review is to present the experience of our laboratory on the last few years on studies related to the neurotransmission of the sympatho-excitatory component of the chemoreflex in the nucleus tractus solitarius (NTS) of rats. The experimental approach of the chemoreflex activation has been used as a model for the understanding of the neurochemical mechanisms involved in the generation and modulation of the sympathetic activity, which have influence on the cardiovascular system on physiological and pathophysiological circumstances such as arterial hypertension. The specific focus of this review is the neurotransmission of the sympatho-excitatory component of the chemoreflex in the NTS but also we present several methods and experimental approaches used currently in our laboratory in order to understand this complex neurotransmission system. Using this combination of methods from the NTS neurons to the awake rat, we wish to discuss the use of several contemporary techniques, which are allowing us to expand the frontiers of this important scientific area.

Keywords: Chemoreflex. NTS. Hypoxia. Autonomic Nervous System. L-glutamate. ATP. Pressure Blood.

REFERÊNCIAS

- 1 - Machado BH. Neurotransmission of the cardiovascular reflexes in the nucleus tractus solitarius of awake rats. In: Chapleau MW, Abboud F, eds. *Neuro-cardiovascular regulation-from molecules to man*. Ann N Y Acad Sci 2001; 940: 179-96.
- 2 - Machado BH, De Paula PM, Callera JC. Regulação reflexa da circulação. In: Tibiriçá E, ed. *Fisiopatologia em Medicina Cardiovascular*. Rio de Janeiro: Revinter; 2001. p. 27-52.
- 3 - Machado BH. Chemoreflex and sympathoexcitation. In: Dun NJ, Machado BH, Pilowsky PM, eds. *Neural mechanisms of cardiovascular regulation*. Boston: Kluwer Academic Publishers; 2004. p. 31-58.
- 4 - Franchini KG, Krieger EM. Cardiovascular responses of conscious rats to carotid body chemoreceptors stimulation by intravenous KCN. *J Auton Nerv System* 1993; 42: 63-70.
- 5 - Haibara AS; Colombari E; Chianca Jr DA; Bonagamba LGH; Machado BH. NMDA receptors in NTS are involved in bradycardic but not in pressor response of chemoreflex. *Am J Physiol* 1995; 269: H1421-7.
- 6 - Barros RC; Bonagamba LGH; Okamoto-Canesin R; De Oliveira M; Branco LGS, Machado BH. Cardiovascular responses to chemoreflex activation with potassium cyanide or hypoxic hypoxia in awake rats. *Auton Neurosci* 2002; 97: 110-5.
- 7 - Michelini LC, Bonagamba LGH. Baroreceptor reflex modulation by vasopressin microinjected into the nucleus tractus solitarius of conscious rats. *Hypertension* 1988; 11 (Suppl. 1): I-75-I-79.
- 8 - Fernandes LG, Antunes VR, Bonagamba LGH, Machado BH. Pressor response to chemoreflex activation in awake rats: role of vasopressin and adrenal medulla. *Physiol Behav* 2005; 84: 39-44.
- 9 - Haibara AS, Bonagamba LGH, Machado BH. Sympathoexcitatory neurotransmission of the chemoreflex in the NTS of awake rats. *Am J Physiol* 1999; 276: H1215-22.

- 10 - Machado BH, Bonagamba LGH. Antagonism of glutamate receptors in the intermediate and caudal NTS of awake rats produced no changes in the hypertensive response to chemoreflex activation. *Auton Neurosci* 2005; 117: 25-32.
- 11 - Yao ST, Barden JA, Finkelstein DI, Bennet MR, Lawrence AJ. Comparative study on the distribution patterns of P2X(1)-P2X(6) receptor immunoreactivity in the brainstem of the rat and the common marmoset (*Callithrix jacchus*): Association with catecholamines cell groups. *J Comp Neurol* 2000; 427: 485-507.
- 12 - De Paula PM, Antunes VR, Bonagamba LGH, Machado BH. Cardiovascular responses to microinjection of ATP into the nucleus tractus solitarius of awake rats. *Am J Physiol Regul Integ Comp Physiol* 2004; 287: R1164-71.
- 13 - Antunes VR, Bonagamba LGH, Machado BH. Hemodynamic and respiratory responses to microinjection of ATP into the intermediate and caudal NTS of awake rats. *Brain Res* 2005; 1032: 85-93.
- 14 - Paton JFR. A working heart-brainstem preparation of the mouse. *J Neurosci Methods* 1996; 65, 63-8.
- 15 - Oliván MV, Bonagamba LGH, Machado BH. Involvement of the paraventricular nucleus of the hypothalamus in the pressor response to chemoreflex activation in awake rats. *Brain Res* 2001; 895(1/2):167-72.
- 16 - Antunes VR, Braga VA, Machado BH. Autonomic and respiratory responses to microinjection of ATP into the intermediate or caudal nucleus tractus solitarius in the working heart-brainstem preparation of the rat. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2005; 32: 467-72.
- 17 - Braga VA, Machado BH. Chemoreflex sympathoexcitation is not altered by the antagonism of glutamate receptors in the commissural NTS in the working heart-brainstem preparation of rat. *Exp Physiol*. Em publicação 2006.
- 18 - Ueno S, Ishibashi H, Akaike N. Perforated-patch method reveals extracellular ATP-induced K⁺ conductance in dissociated rat nucleus solitarius neurons. *Brain Res* 1992; 597(1):176-9.
- 19 - Andresen MC, Yang M. Dynamics of sensory afferent synaptic transmission in aortic baroreceptor regions on nucleus tractus solitarius. *J Neurophysiol* 1995; 74:1518-28.
- 20 - Aylwin ML, Horowitz JM, Bonham AC. NMDA receptors contribute to primary visceral afferent transmission in the nucleus of the solitary tract. *J Neurophysiol* 1997; 77:2539-48.
- 21 - Kato F, Shigetomi E. Distinct modulation of evoked and spontaneous EPSCs by purinoceptors in the nucleus tractus solitarius of the rat. *J Physiol* 2001; 530(Pt 3): 469-86.
- 22 - Endoh T. Characterization of modulatory effects of postsynaptic metabotropic glutamate receptors on calcium currents in rat nucleus tractus solitarius. *Brain Res* 2004; 1024(1/2): 212-24.
- 23 - Fletcher EC, Lesske J, Quiam W, Miller CC, Unger T. Repetitive episode hypoxia causes diurnal elevation of systemic blood pressure in rats. *Hypertension* 1992; 19: 555-61.
- 24 - Hla K, Young T, Bidwell M, Palta M, Skatrud J, Dempsey J. Sleep apnea and hypertension: a population-based study. *Ann Intern Med* 1994; 120: 382-8.
- 25 - Fletcher EC, Lesske J, Behm R, Miller CC, Stauss H, Unger T. Carotid chemoreceptors, systemic blood pressure, and chronic episodic hypoxia mimicking sleep apnea. *J Appl Physiol* 1992; 72: 1978-84.
- 26 - Sica AL, Greenberg HE, Ruggiero, Scharf SM. Chronic intermittent hypoxia: a model of sympathetic activation in the rat. *Resp Physiol* 2000; 121: 173-84.
- 27 - Fletcher EC. Physiological consequences of intermittent hypoxia: systemic blood pressure. *J Appl Physiol* 2001; 90:1600-5.
- 28 - Somers VK, Dyken ME, Clary MP, Abboud FM. Sympathetic neural mechanisms in obstructive sleep apnea. *J Clin Invest* 1995; 96:1897-904.
- 29 - Zoccal DB. Função cardiovascular de ratos submetidos à HCl. [Dissertação de Mestrado em Fisiologia], Ribeirão Preto: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP; 2006.
- 30 - Greenberg HE, Sica A, Batson D, Scharf SM. Chronic intermittent hypoxia increases sympathetic responsiveness to hypoxia and hypercapnia. *J Appl Physiol* 1999; 86:298-305.
- 31 - McGuire M, Zhang Y, White DP, Ling L. Chronic intermittent hypoxia enhances ventilatory long-term facilitation in awake rats. *J Appl Physiol* 2003; 95: 1499-1508.
- 32 - Spyer KM. The central nervous organization of reflex circulatory control. In: Loewy AC, Spyer KM, eds. *Central regulation of autonomic functions*. New York: Oxford, 1990. p. 168-88.
- 33 - Finley JC, Katz DM. The central organization of carotid body afferent projections to the brainstem of the rat. *Brain Res* 1992; 572(1/2):108-16.
- 34 - Vardhan A, Kachroo A, Sapru HN. Excitatory amino acid receptors in commissural nucleus of the NTS mediate carotid chemoreceptor responses. *Am J Physiol* 1993; 264(1 Pt 2):R41-50.
- 35 - Zhang W, Mifflin SW. Excitatory amino acid receptors within NTS mediate arterial chemoreceptor reflexes in rats. *Am J Physiol* 1993; 265(2 Pt 2):H770-3.
- 36 - Berquim P, Bodineau L, Gros F, Larnicol N. Brainstem and hypothalamic areas involved in respiratory chemoreflex: a Fos study in adults rats. *Brain Res* 2000; 857: 30-40.
- 37 - Chan RK, Jarvina EV, Sawchenko P E. Effects of selective sinoaortic denervations on phenylephrine-induced activation responses in the nucleus of the solitary tracts. *Neuroscience* 2000; 101:165-78.
- 38 - Greenberg H E, Sica AL, Ruggiero DA. Expression of c-fos in the rat brainstem after chronic intermittent hypoxia. *Brain Res* 1999; 816:638-45.
- 39 - Hirooka Y, Polson JW, Potts PD, Dampney RAL. Hypoxia-induced Fos expression in neurons projecting to the pressor region in the rostral ventrolateral medulla. *Neuroscience* 1997; 80:1209-24.
- 40 - Cruz JC. Expressão da proteína c-FOS em neurônios do núcleo do trato solitário e do núcleo paraventricular do hipotálamo em resposta à estimulação do quimiorreflexo em ratos não anestesiados. [Dissertação de Mestrado em Fisiologia], Ribeirão Preto: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP; 2004.
- 41 - Mao S-Y. Conjugation of fluorochromes to antibodies. In: Javois LC ed. *Methods in molecular biology - Immunocytochemical methods and protocols*. 2nd ed. Totowa (NJ): Humana Press INC.; 1999. p.35-8.
- 42 - Krenacs T, Krenacs L, Raffeld M. Multiple antigen immunostaining procedures. In: Javois LC ed. *Methods in molecular biology - Immunocytochemical methods and protocols*. 2nd ed. Totowa (NJ): Humana Press INC.; 1999. p. 223-234.