

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO**  
**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**  
**INSTITUTO DE BIOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

**AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DOS CANAIS  $K_{ATP}$  HIPOTALÂMICOS  
NA ATIVIDADE AUTONÔMICA CARDÍACA**

**BRUNO PAES LEME FERREIRA**

2015



PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

INSTITUTO DE BIOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DOS CANAIS  $K_{ATP}$  HIPOTALÂMICOS  
NA ATIVIDADE AUTONÔMICA CARDÍACA

BRUNO PAES LEME FERREIRA

*Sob a orientação de*

**Prof. Dr. Luciano Gonçalves Fernandes**

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no curso de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

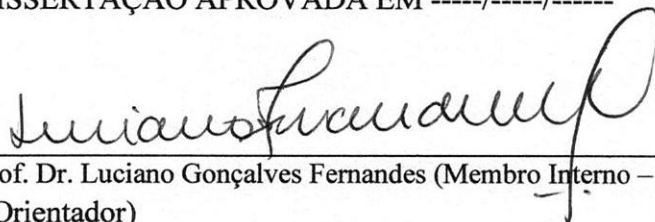
Seropédica, RJ  
Julho de 2015

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE BIOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**


**BRUNO PAES LEME FERREIRA**

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Fisiológicas**, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas. Área de Concentração em Fisiologia e Farmacologia.

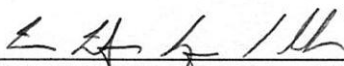
DISSERTAÇÃO APROVADA EM 30/07/2015



Prof. Dr. Luciano Gonçalves Fernandes (Membro Interno – UFRRJ)  
(Orientador)



Prof. Dr. André de Souza Mecawi (Membro Interno – UFRRJ)



Prof. Dr. Luís Felipe Souza da Silva (Membro Externo – UFS)

573.86

F383a

T

Ferreira, Bruno Paes Leme, 1990-  
Avaliação da participação dos  
canais  $K_{ATP}$  hipotalâmicos na  
atividade autonômica cardíaca /  
Bruno Paes Leme Ferreira - 2015.  
54 f.: il.

Orientador: Luciano Gonçalves  
Fernandes.

Dissertação (mestrado) -  
Universidade Federal Rural do Rio  
de Janeiro, Curso de Pós-Graduação  
em Ciências Fisiológicas.

Bibliografia: f. 38-48.

1. Sistema nervoso central -  
Teses. 2. Neurônios - Teses. 3.  
Neurofisiologia - Teses. 4.  
Neurofarmacologia - Teses. 5. Redes  
neurais (Neurobiologia) - Teses. 6.  
Rato como animal de laboratório -  
Teses. I. Fernandes, Luciano  
Gonçalves, 1976-. II. Universidade  
Federal Rural do Rio de Janeiro.  
Curso de Pós-Graduação em Ciências  
Fisiológicas. III. Título.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por tudo o que eu vivi e aprendi neste período, e o quanto que tudo que se sucedeu contribui para meu crescimento e me será guardado com carinho.

Agradeço a meus pais, Robson e Eliane, a quem dedico esta dissertação. Por toda dedicação em todos estes anos, por terem sempre investido em minha formação, mesmo em meio a todas as adversidades. Vocês são meu exemplo de vida e que esta dissertação seja apenas mais um passo para provar que a dedicação que vocês tiveram nesta arte de criar filhos não foi em vão. Espero poder proporcionar muito mais momentos de alegria para vocês, e que possa seguir seu exemplo de sucesso em tudo que vocês alcançaram até hoje e sei que ainda vão alcançar!

Também agradeço muito, muito, muito mesmo à minha companheira, à minha princesa, à minha melhor amiga, Vanessa, que, mesmo em meio ao turbilhão que foi toda a graduação, o ingresso no mestrado e seus primeiros meses, não desistiu de mim, e ainda nos casamos nesse meio tempo! Sou muito grato a Deus por você existir e por eu poder apender mais sobre esta nova etapa da vida ao seu lado, na saúde ou na doença, na riqueza ou na pobreza... Você se mostrou meu porto seguro nos momentos em que parecia que os afazeres acadêmicos estavam para sequestrar minha sanidade. Muito obrigado por me aturar.

E claro que não poderia deixar de agradecer a toda minha família: Fábio, meu irmão, que dividiu quarto comigo desde que nasceu, até na graduação, e que pode agora finalmente ter um quarto só pra ele! Aos meus avós queridos que tanto amo, Jorge e Lúcia. Não tenho como deixar de lembrar que, se hoje estou aqui, tudo começou com aquele casal de origem muito humilde, que acreditou em um futuro melhor para seus filhos e netos, e hoje podem vê-los formando na graduação, pós-graduação, casando... Aos meus tios, Rubens e Helenita, e seus filhos e meus queridos primos, Gustavo e Carina, muito obrigado por todo apoio. À minha tia Elisângela, seu esposo, Marcelo e minha prima Larissa, muito obrigado pelo incentivo à carreira acadêmica e por tudo que vocês representam. Aos meus sogros, Jorge e Umbelina, muito obrigado por me receberem tão bem na família de vocês e me permitirem casar com sua filha tão linda e incrível (ah, e muito obrigado por criá-la tão bem, é claro!). Amo muito todos vocês!

Agradeço também a meu orientador, por ter confiado a mim este projeto do qual muito me orgulho, e por tudo o que me ensinou. Ser seu orientado sem dúvida contribuiu muito para minha formação e sou grato por isso.

Ao grande mestre Luis, deixo meus mais sinceros agradecimentos, já que todo pós-graduando do DCFis deve a ele sua gratidão, pois sem toda a luta que este homem teve durante todos seus anos de experiência no departamento, não teríamos este programa de pós-graduação funcionando hoje! Fora que ele realmente é um grande amigo, com o qual podia discutir qualquer aspecto referente ou não à fisiologia. Ao André também deixo meus agradecimentos, uma vez que, sem sua ajuda seria impossível de terminar este projeto.

Também agradeço a todos os professores do Departamento de Ciências Fisiológicas e do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas que contribuíram com minha formação, desde as aulas de biofísica, onde tive o primeiro contato, até as derradeiras aulas das 'FiFas', Jairo, Norma, Michele, Fábio, Magda, Alba, Welington, Emerson, Frederico, Bruno e às substitutas que passaram por aqui, Marta, Aline e Ana Paula.

Não poderia deixar de agradecer a todos os alunos de pós-graduação que passaram pelo departamento no período em que eu desenvolvia este projeto e que deixaram suas contribuições para esta dissertação: Fabrícia, que desde que em entrei na iniciação científica começou me tutorando na estereotaxia e foi sempre uma amiga em que podia contar; Raquel Nascimento, que, além de grande amiga, sempre me ajudou muito e foi indispensável para a realização dos cortes histológicos; Rafael e Anderson, que me auxiliaram nos eletrocardiogramas; Roberto, que sempre nos ajuda tanto; Iracema; Fernanda 'Fonkas' Khon; Raquel Teixeira; Claudinho; Nayana; Cristine; Natália; Júlia; Poliana; Carla Duque.

Aos meus companheiros da primeira turma do PPGCF e das disciplinas de Fisiologia e Farmacologia Integradas (carinhosamente apelidadas FiFas), que tanto penaram nestas disciplinas, sofrendo juntos em seminários infundáveis, que acabaram gerando laços que certamente perdurarão, não é, Carlinha, Raoni, Fernando, Phelipe, Roberto e Mariana? E para aqueles que entraram depois e que foram tão importantes, como Livia, Gabriela, Joyce e Débora. E claro, a todos os ICs que contribuíram com os experimentos e nas discussões.

Um adendo especial que quero fazer é a um quarteto que formamos especialmente na reta final do mestrado contando comigo, Raoni, Livia e Verônica, onde podemos nos ajudar mutuamente em nossos respectivos experimentos e foram momentos daqueles que

transcendem o básico da pós-graduação e se torna uma verdadeira amizade. Sou muito grato por ter podido contar com vocês!

Para a realização deste projeto também recebi ajuda de fora do departamento, como a Professora Aparecida (DBA-IB) e da técnica Ilza, que muito gentilmente me auxiliaram na histologia, e também ao auxílio recebido de fora da Rural e gostaria de deixar registrado meus agradecimentos ao Professor Fernando Adulkader (ICB-USP), que me cedeu algumas das drogas utilizadas e me auxiliou nos protocolos para sua dissolução; ao grande Professor José Antunes-Rodrigues (FMRP-USP) e de seu laboratório, que me deram suporte para a realização de alguns procedimentos na iniciação científica e que muito me ajudaram no meu crescimento acadêmico; e neste mesmo viés, ao professor Wamberto Varanda (FMRP-USP) e a toda equipe de seu laboratório, Pedro, Melina, Júnia, André e Fernando, que tão bem me receberam durante o Curso de Verão 2013 e cujos ensinamentos na ciência da eletrofisiologia (não, eletrofisiologia não é só uma técnica) me servirão para os futuros passos do meu projeto.

Quero também deixar meus agradecimentos à Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, que realmente é uma mãe (meio displicente, às vezes, mas uma mãe), e é onde eu pude obter meu bacharel em medicina veterinária e minha pós-graduação. E às agências de fomento, especialmente à FAPERJ, de onde eu recebi bolsa (fazer um mestrado sem receber um auxílio seria muito pesado, sem dúvidas), deixo minha gratidão.

Enfim, minha gratidão a todos os que citei e àqueles que passaram por minha vida nestes dois anos de muita luta, mas que agora vê o fruto de todo este esforço realizado. Muito obrigado!

## RESUMO

PAES-LEME, Bruno. **Avaliação da participação dos canais  $K_{ATP}$  na atividade autonômica cardiovascular**. 2015. XX p. Dissertação. Instituto de Biologia - Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. 2015

Os canais para potássio sensíveis a ATP ( $K_{ATP}$ ) são importantes proteínas de membrana capazes de acoplar o metabolismo celular com atividade neurosecretórias e eletrofisiológicas de acordo com o tipo celular em que ocorre. A presença destes canais em neurônios hipotalâmicos tem sido relacionada com mecanismos de glicosensibilidade, uma vez que a glicose é a principal fonte energética utilizada pelos neurônios. O núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) desempenha diversas funções fisiológicas, como o controle autonômico dos mais variados sistemas orgânicos, incluindo o sistema cardiovascular. Os neurônios do PVN expressam estes canais  $K_{ATP}$ , e já foram descritas populações de neurônios glicosensíveis neste núcleo. Entretanto, a participação destes canais no controle da atividade autonômica cardiovascular ainda não foi bem descrita. Assim, neste estudo investigamos se a manipulação farmacológica central dos canais  $K_{ATP}$  promoveria alterações autonômicas cardíacas. Para isso foram utilizados ratos machos Wistar (250-300g) submetidos à cirurgia de estereotaxia para implante de cânula-guia no terceiro ventrículo cerebral em região próxima ao PVN (1,8mm posterior ao Bregma e 8,2mm abaixo da calota craniana). Sete dias depois, os animais foram submetidos a um registro eletrocardiográfico (ECG) basal, seguido por microinjeção de veículo (Moleculsol 5%), glibenclamida (5mM, um bloqueador do canal) ou diazóxido (25 $\mu$ M, um ativador do canal). A análise da variabilidade da frequência cardíaca foi analisada pela Transformada Rápida de Fourier. A análise estatística foi realizada com ANOVA one-way. Todos os procedimentos foram submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFRRJ sob protocolo 002190/2014. Não houve diferenças significativas na frequência cardíaca (Controle: 296,9 $\pm$ 16,84 bpm vs 321,3 $\pm$ 12,95 bpm, respectivamente basal e experimental, n=10; glibenclamida: 339,3 $\pm$ 10,26 bpm vs. 326,3 $\pm$ 12,23 bpm, n=10; diazóxido: 310,8 $\pm$ 16,68 bpm vs 312,2 $\pm$ 10,75 bpm, n=12) ou nos componentes de alta frequência (Controle: 37,27 $\pm$ 3,79 n.u. vs 43,18 $\pm$ 4,534 n.u., n=11; glibenclamida: 47,08 $\pm$ 4,718 n.u. vs 40,92 $\pm$ 3,771 n.u., n=13; diazóxido: 49,31 $\pm$ 2,951 n.u. vs 46,62 $\pm$ 4,110 n.u., n=13) e baixa frequência (Controle: 62,73 $\pm$ 3,79 n.u. vs 56,82 $\pm$ 4,534 n.u., n=11; glibenclamida: 52,92 $\pm$ 4,718 n.u. vs 59,08 $\pm$ 3,771 n.u., n=13; diazóxido: 50,69 $\pm$ 10,64 n.u. vs 53,38 $\pm$ 4,11 n.u., n=13) do espectro de variabilidade da frequência cardíaca. Estes resultados estão de acordo com a literatura, onde experimentos com a manipulação farmacológica central *in vivo* dos canais  $K_{ATP}$  em condições basais não foi capaz de promover alterações nas variáveis cardiovasculares. Ainda, estudos eletrofisiológicos em neurônios do PVN mostraram que os mecanismos de glicosensibilidade destas células parecem ser independentes do bloqueio de canais  $K_{ATP}$ . Assim, nosso estudo sugere que a manipulação farmacológica central do canal  $K_{ATP}$  em condições basais não altera parâmetros autonômicos cardíacos agudamente.

Palavras Chave: Canais  $K_{ATP}$ , Hipotálamo, Variabilidade da Frequência Cardíaca



## ABSTRACT

PAES-LEME, Bruno. **Evaluation of involvement of the hypothalamic  $K_{ATP}$  channel in cardiovascular autonomic outflow.** 2015. XX p. Dissertation. Institute of Biology - Department of Physiological Science, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. 2015

ATP-sensitive potassium channels ( $K_{ATP}$ ) are important membrane proteins that can couple cellular metabolism to neurosecretory and electrophysiological activity according to the site of occurrence. The presence of  $K_{ATP}$  in hypothalamic neurons has been related to glucosensitive mechanisms, once glucose is the main energetic source used by neurons. Hypothalamic paraventricular nucleus (PVN) controls many different physiological functions, including autonomic control of the most diverse organic systems, and among them, the cardiovascular system. Besides, it has been shown that PVN neurons express the  $K_{ATP}$  channel, and neuronal glucosensitivity has also been described in this nucleus. However, the participation of those channels in cardiovascular control has not been described so far. Therefore, we aimed to investigate if the central pharmacological manipulation of  $K_{ATP}$  channel could play a role in the modulation of the cardiac autonomic outflow. For this purpose, male Wistar rats (250-300g) were submitted to stereotaxic surgery for guide cannula placement into the third ventricle (1,8mm caudal to Bregma and 8,2mm below the skull). Seven days later, animals underwent a electrocardiogram (ECG) record, before and after the central microinjection of vehicle (Molecusol 5%), glibenclamide (5mM, a  $K_{ATP}$  channel blocker) or diazoxide (25 $\mu$ M, a  $K_{ATP}$  channel opener). Heart rate variability of the ECG was analyzed by Fast Fourier Transform and statistical analysis was performed by One-Way ANOVA test. All procedures were and approved by the Ethical Committee in research of UFRRJ protocol: 002190/2014. We found no statistical difference in the heart rate (Control: 296,9 $\pm$ 16,84 bpm vs 321,3 $\pm$ 12,95 bpm, respectively basal and experimental, n=10; glibenclamide: 339,3 $\pm$ 10,26 bpm vs. 326,3 $\pm$ 12,23 bpm, n=10; diazoxide: 310,8 $\pm$ 16,68 bpm vs 312,2 $\pm$ 10,75 bpm, n=12) or spectral variability components, among the evaluated groups [high frequency (Control: 37,27 $\pm$ 3,79 n.u. vs 43,18 $\pm$ 4,534 n.u., n=11; glibenclamide: 47,08 $\pm$ 4,718 n.u. vs 40,92 $\pm$ 3,771 n.u., n=13; diazoxide: 49,31 $\pm$ 2,951 n.u. vs 46,62 $\pm$ 4,110 n.u., n=13) or low frequency (Control: 62,73 $\pm$ 3,79 n.u. vs 56,82 $\pm$ 4,534 n.u., n=11; glibenclamide: 52,92 $\pm$ 4,718 n.u. vs 59,08 $\pm$ 3,771 n.u., n=13; diazoxide: 50,69 $\pm$ 10,64 n.u. vs 53,38 $\pm$ 4,11 n.u., n=13)]. Those data are in agreement to the field of knowledge, where in vivo central manipulation of  $K_{ATP}$  channels in basal condition failed to evoke changes in mean arterial pressure. Moreover, electrophysiological studies in PVN neurons suggest that mechanisms of glucosensitivity in those cells are independent of  $K_{ATP}$  activity. All those information lead us to suggest that central pharmacological manipulation of  $K_{ATP}$  channels in basal condition do not alter cardiac autonomic parameters.

Keywords:  $K_{ATP}$  channel; Hypothalamus, Heart Rate Variability

## LISTA DE ABREVIACÕES

$\mu\text{L}$	microlitro
$\mu\text{m}$	micrômetro
2DG	2-Deoxiglicose
3V	Terceiro ventrículo
ADP	Adenosina difosfato
AgRP	Peptídeo relacionado ao gen agouti, do inglês <i>agouti-related peptide</i>
ANOVA	Análise de variância, do inglês <i>analysis of variance</i>
AP	Área postrema
ATP	Adenosina trifosfato
AVP	Arginina vasopressina
bpm	Batimentos por minuto
$\text{Ca}^{2+}$	Cálcio
CART	Transcrito regulado por cocaína e anfetamina, do inglês <i>cocaine and amphetamine regulated transcript</i>
CEUA	Comitê de ética no uso de animais
CIL	Coluna intermediolateral
CRH	Hormônio liberador de corticotropina, do inglês <i>corticotropin-releasing hormone</i>
CVLM	Bulbo caudoventrolateral, do inglês <i>caudoventrolateral medulla</i>
DC	Débito cardíaco
DMV	Núcleo dorsal motor do vago
ECG	Eletrocardiograma
FFT	Transformada rápida de Fourier, do inglês <i>Fourier fast transform</i>
g	Grama
GE	Neurônio glicoe excitável
GI	Neurônio glicoinibido
h	Hora
HF	Alta frequência, do inglês <i>high frequency</i>
HL	Hipotálamo lateral
Hz	Hertz
i.c.v.	Intracerebroventricular
IM	Intramuscular
$\text{K}^+$	Potássio
$\text{K}_{\text{ATP}}$	Canal para potássio sensível a ATP
kg	Quilograma
$\text{K}_{\text{ir}}$	Potassium inward rectifying channel
$\text{K}_{\text{m}}$	Constante de Michaelis-Menten
L	Litro
LCR	Líquido cefalorraquidiano
LF	Baixa frequência, do inglês <i>low frequency</i>
MCT-1	Transportador de monocarboxilato tipo 1, do inglês <i>monocarboxylat transporter 1</i>
mg	miligrama
$\text{Mg}^{2+}$	Magnésio
$\text{mitoK}_{\text{ATP}}$	Canal para potássio sensível a ATP mitocondrial
mM	milimolar

mm	_____	milímetro
n.u.	_____	Unidades normalizadas, do inglês <i>normalized unities</i>
NA	_____	Núcleo ambíguo
Na <sup>2+</sup>	_____	Sódio
NaCl	_____	Cloreto de Sódio
nM	_____	Nanomolar
NPY	_____	Neuropeptídeo Y
NTS	_____	Núcleo do trato solitário
OT	_____	Ocitocina
PA	_____	Pressão arterial
pH	_____	Potencial hidrogeniônico
p-NS	_____	Neurônio parvocelular neurosecretório
POMC	_____	Proopiomelanocortina
PVN	_____	Núcleo paraventricular, do inglês <i>paraventricular nucleus</i>
RVLM	_____	Bulbo rostroventrolateral, do inglês <i>rostromedullary lateral medulla</i>
RVS	_____	Resistência vascular periférica
SC	_____	Subcutâneo
SFO	_____	Órgão subfornical, do inglês <i>subfornical organ</i>
SGLT	_____	Transportador sódio-glicose, do inglês <i>sodium-glucose transport</i>
sK <sub>ATP</sub>	_____	Canal para potássio sensível a ATP superficial
SNA	_____	Sistema nervoso autônomo
SNC	_____	Sistema nervoso central
SUR	_____	Receptor de sulfonilurea, do inglês <i>sulfonylurea receptor</i>
TRH	_____	Hormônio liberador de tireotrofina, do inglês <i>thyrotropin-releasing hormone</i>
U.I.	_____	Unidade internacional
VFC	_____	Variabilidade da frequência cardíaca
VMH	_____	Hipotálamo ventromedial, do inglês <i>ventromedial hypothalamus</i>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 <b>Múltiplas vias que podem estar relacionadas com a modulação da atividade elétrica de neurônios hipotalâmicos pela glicose (Adaptado de Burdakov et al., 2005b).</b>	14
Figura 2 <b>Grau de identificação entre o transportador ligante de ATP e os membros da família Kir</b>	16
Figura 3 <b>Níveis de frequência cardíaca</b>	27
Figura 4 <b>Participação da banda de alta frequência (HF) no total do espectro</b>	28
Figura 5 <b>Participação da banda de baixa frequência (LF) no total do espectro</b>	29
Figura 6 <b>Relação entre as bandas de baixa e alta frequência (LF/HF) no total do espectro</b>	30

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	10
<b>2. OBJETIVOS</b>	19
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b>	20
3.1 Animais	20
3.2 Implante de cânula-guia direcionada ao terceiro ventrículo	20
3.3 Microinjeções no Terceiro Ventrículo	21
3.4 Histologia	22
3.5 Implante de eletrodo subcutâneo	23
3.6 Registro do eletrocardiograma	23
3.7 Análise da variabilidade da frequência cardíaca	23
3.8 Análise estatística dos resultados	24
<b>4. RESULTADOS</b>	25
<b>5. DISCUSSÃO</b>	31
<b>6. CONCLUSÃO</b>	37
<b>7. REFERÊNCIAS</b>	38
<b>8. APÊNDICES</b>	49

## Introdução

O sistema cardiovascular tem como principal função garantir que todos os órgãos e tecidos do organismo recebam suporte adequado de nutrientes e oxigênio e que seus metabólitos sejam recolhidos e devidamente excretados, visando a manutenção da homeostase. Para desempenhar tal função indispensável à vida, o sistema cardiovascular necessita de mecanismos de controle que mantenham as variáveis cardiovasculares e respiratórias em limites estreitos de variação. Um dos componentes que mais necessitam de atenção é a pressão arterial, que é de indispensável necessidade para a perfusão adequada dos tecidos. A pressão arterial (PA) é produto do débito cardíaco (DC), isto é, o volume de sangue que o coração ejeta por minuto, e a resistência vascular periférica (RVS), que, como o nome sugere, é a resistência encontrada pelo sangue que sai do coração nos vasos da circulação periférica que o conduzirão para todos os territórios vasculares do organismo.

Para a regulação da PA em níveis estreitos de variação, o organismo lança mão de diferentes mecanismos de controle, podendo estes ser locais, humorais ou neurais. O controle local inclui fatores miogênicos, metabólicos, parácrinos, autócrinos ou endoteliais. Já o controle humoral inclui hormônios de diferentes origens, que podem atuar diretamente no coração e nos vasos sanguíneos, como também podem afetar a circulação indiretamente, com o balanço hidroeletrolítico. Finalmente, o controle neural conta com a participação de alças reflexas que permitem uma rápida correção por parte do controle autonômico, e que inclui diversos níveis de regulação no sistema nervoso central (Duscheck *et al.*, 2008; Tinker *et al.*, 2014).

A base de controle principal do sistema nervoso autônomo (SNA) encontra-se sediada no tronco encefálico, que apresenta estruturas de grande importância no tocante a integração e eferência da atividade autonômica, das quais serão citadas algumas mais clássicas e diretamente relacionadas com o controle autonômico cardiovascular (Dampney, 1994). Os núcleos ambíguo (NA) e dorsal motor do vago (DMV) abrigam os corpos celulares dos neurônios pré-ganglionares parassimpáticos, que emitem seus axônios para formar o componente eferente do décimo par de nervos cranianos, o nervo vago. Estes neurônios chegam ao coração e fazem sinapses intramurais com os neurônios pós-ganglionares parassimpáticos, que irão inervar os nodos sinoatrial e atrioventricular, liberando principalmente acetilcolina. Assim, o NA e o DMV são responsáveis pelo tono vagal do

coração (Dampney, 1994). Diferente dos parassimpático, os corpos celulares dos neurônios pré-ganglionares simpáticos localizam-se na coluna intermediolateral (CIL) da medula espinhal nos seguimentos tóraco-lombar. Os neurônios pré-ganglionares simpáticos emitem seus axônios para gânglios que formam as cadeias pré- e paravertebral, onde fazem sinapses com os neurônios pós-ganglionares simpáticos, que se distribuem para os órgãos alvos. No coração, os neurônios pós-ganglionares simpáticos inervam as fibras cardíacas de trabalho, as do sistema de condução cardíaco; já nos vasos de resistência, inervam a musculatura vascular, causando respectivamente, efeito inotrópico e cronotrópico positivos e vaso constrição periférica e consequente aumento da resistência vascular periférica.

A geração do tono simpático direcionado ao sistema cardiovascular requer a participação e integração de uma maior variedade de estruturas para seu controle fino. O bulbo rostroventrolateral (RVLM) constitui a mais importante fonte de estimulação simpática do sistema cardiovascular (Lipski *et al*, 1995, Sun e Guyenet, 1990). Dele projetam-se neurônios pré-autonômicos simpáticos que vão chegar aos neurônios pré-ganglionares simpáticos secretando o neurotransmissor excitatório glutamato (Machado *et al*, 1997). O bulbo caudoventrolateral (CVLM) por sua vez, emite projeções GABAérgicas inibitórias para o RVLM que controlam sua taxa de ativação basal (Brown e Guyenet, 1985; Schreihofer e Guyenet, 2002). O núcleo do trato solitário (NTS) é uma estrutura alongada no tronco encefálico que recebe aferências de diversos órgãos do organismo, integrando estas informações e controlando as atividades dos já citados NA, NDV, RVLM e CVLM regendo a resposta autonômica. Assim, o NTS constitui um importante relê das informações do status homeostático do organismo e orquestrando uma resposta corretiva rápida, algo que pode ser observado em alças reflexas do sistema cardiovascular (Lipski *et al*, 1995; Accorsi-Mendonça *et al*, 2013).

Uma alça reflexa de grande importância para a regulação fina momento a momento da pressão arterial é o barorreflexo, onde alterações na pressão arterial são percebidas por mecanorreceptores arteriais (barorreceptores) localizados na camada adventícia em artérias estratégicas, como a crossa da aorta (pela qual passa todo o débito cardíaco) e a bifurcação das carótidas (por onde passa o sangue que supre a região da cabeça, incluindo o cérebro), gera respostas reflexas contrárias (Cowley *et al*, 1973; Thrasher, 2002). Quando ocorrem elevações na pressão arterial, há a ativação dos barorreceptores, levando a despolarização dos terminais sensoriais, gerando salvas de potenciais de ação que trafegam em direção ao sistema nervoso central, chegando ao NTS, ativando neurônios de segunda ordem que se projetam

para o NA e DMV, estimulando-os e aumentando o tono vagal. Ao mesmo tempo, neurônios de segunda ordem do NTS também se projetam ao CVLM, ativando-o, o que gera uma diminuição do tono simpático, o que, somado à ativação parassimpática evocada pelo mesmo estímulo, conduz a uma resposta de diminuição da frequência cardíaca e da força de contração, levando a uma diminuição do débito cardíaco e vasodilatação, atuando em esfíncteres pré-capilares (Reyes del Paso *et al.*, 2004; Hesse *et al.*, 2007; Duscheck *et al.*, 2004).

O hipotálamo é uma estrutura diencefálica formado por diferentes núcleos que desempenham funções diversas relacionadas a atividade vitais para os mamíferos, incluindo regulação do sistema cardiovascular, da ingestão alimentar, do metabolismo energético (Saper *et al.*, 2002), da termorregulação, dos ritmos biológicos circadianos (Buijs e Kalsbeek, 2001), do crescimento e desenvolvimento (Harvey, 2013), do ciclo sexual (Schwarzel-Fukuda *et al.*, 1989, Mafucci & Gore, 2009), entre outras funções. Cada uma dessas funções está “sediada” em núcleos específicos, mas que interagem entre si, tornando o hipotálamo um importante centro integrador destas funções. A investigação de como ocorrem algumas destas interfaces entre funções, a princípio não correlatas, pode ser importante para compreensão de alguns fenômenos encontrados em situações fisiológicas ou patológicas diversas.

Evidências apontam que o hipotálamo lateral (HL) emite projeções para o NTS e o RVLM (Hardy, 2001; Haselton e Guyenet, 1990) e uma região de grande importância neuroendócrina e autonômica do hipotálamo é o núcleo paraventricular (PVN). Localizado em região adjacente ao terceiro ventrículo, o PVN apresenta diferentes subpopulações de neurônios que exercem efeitos diversos: O PVN abriga os corpos de neurônios parvocelulares que se projetam para outras regiões do SNC e os corpos celulares dos neurônios magnocelulares produtores de vasopressina (AVP) e ocitocina (OT), que se projetam para a neurohipófise, onde são liberados para a circulação e vão exercer seus efeitos (Ferguson *et al.*, 2008). Ambos hormônios têm importante participação no sistema cardiovascular (Gutkowska *et al.*, 2000), seja diretamente, controlando a pressão arterial, como a vasopressina, como o próprio nome sugere, leva a vasoconstrição pela ativação de receptores V1 na musculatura lisa vascular (Jard, 1985), ou indiretamente, atuando sobre o balanço hidroeletrólítico, uma vez que a vasopressina leva a retenção hídrica e a ocitocina tem efeito natriurético (Antunes-Rodrigues *et al.*, 2003; Peterson, 2002).

Neurônios parvocelulares do PVN se projetam para o NTS, estabelecendo ligações diretas e recíprocas com o núcleo bulbar (Gardiner e Bennett, 1986). Além disso, o PVN

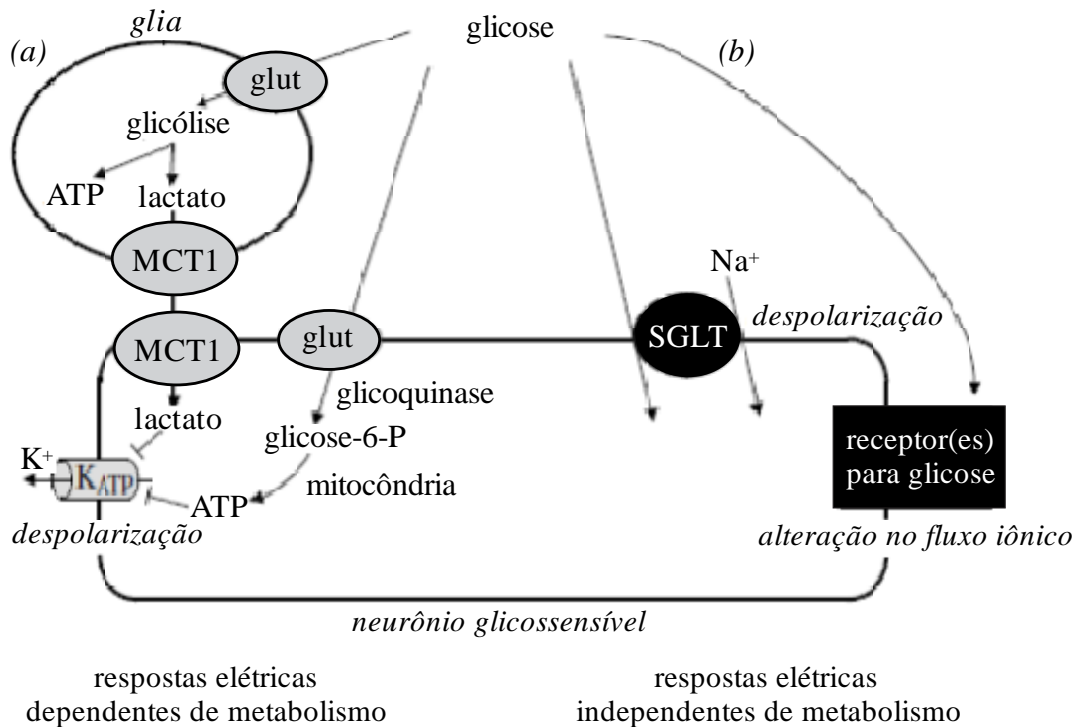


alberga corpos de neurônios pré-autonômicos simpáticos que se projetam do hipotálamo diretamente à CIL da medula espinhal (Dampney, 1994). Assim, o PVN é capaz de controlar a atividade autonômica em diferentes níveis e também pode ser afetado por vias reflexas cardiovasculares, como por exemplo, o barorreflexo, cuja ativação inibe a secreção de vasopressina pelo PVN, via conexões com o NTS (Berecek e Swords, 1990). Assim, como o barorreflexo é ativado momento a momento durante o aumento da pressão arterial sistólica na sístole ventricular, a secreção de AVP é constantemente inibida (Morris e Alexander, 1980). De forma inversa, o PVN também pode exercer controle sobre a atividade autonômica cardiovascular mediada pelo NTS ou diretamente à medula espinhal (Buijs e Heerikhuize, 1982; Pittman *et al.*, 1982).

O hipotálamo apresenta neurônios sensíveis aos níveis de glicose no líquido cefalorraquidiano (LCR), reflexo direto de suas concentrações plasmáticas, sendo seus níveis normais pouco menos de 30% do nível de glicose no sangue, o que corresponde a algo em torno de 2,5mM (Levin *et al.*, 2004). Os carboidratos ocupam papel central no metabolismo corporal global, sendo a glicose, o principal carboidrato utilizado como fonte energética e tem a sua concentração plasmática regulada em limites estreitos de variação (Leloup *et al.*, 2015). Quando ocorre uma queda na concentração plasmática de glicose e os mecanismos homeostáticos falham em regular os níveis deste carboidrato, ocorre queda no consumo de oxigênio pelo sistema nervoso central, concomitante à redução da atividade neural global (Patel *et al.*, 2003; Shulman *et al.*, 2009). Estes neurônios glicosensíveis podem ser divididos em neurônios glicoe excitáveis (GE) ou glicoinibidos (GI) (Burdakov, 2005, Levin *et al.* 2004) e são amplamente estudados no Hipotálamo Ventromedial (VMH) e hipotálamo lateral (HL), onde participam diretamente do controle da ingestão alimentar e do metabolismo (Evans *et al.*, 2004), mas a literatura carece de evidências de sua participação na função cardiovascular.

Existem algumas formas com as quais os neurônios glicossensíveis operam, que podem ser por vias metabólicas ou não, que estão resumidos na figura 1: a entrada eletrogênica de glicose, através da participação de proteínas como cotransportador sódio-glicose (SGLT, como em Elsas e Longo, 1992), onde a entrada de glicose no meio intracelular seria acompanhada pela entrada do íon sódio; receptores de glicose (Diez-Sampedro *et al.*, 2003), que são proteínas homólogas do SGLT/SLCA4 que convertem a elevação extracelular de glicose em despolarização dependente de sódio sem que haja entrada de glicose, cuja função em mecanismos de glicossensibilidade central ainda é uma hipótese, haja visto que estes “receptores de glicose” só foram descritos em neurônios periféricamente; astrócitos

hipotalâmicos como detectores de alterações de glicose, dependente da sinalização por  $K_{ATP}$  (Ainscow *et al.*, 2002, Pellerin e Maggistretti, 2004); por fim, o mecanismo mais clássico de sensibilidade à glicose, a presença de canais para potássio retificadores de entrada sensíveis a ATP.



**Figura 1** Múltiplas vias que podem estar relacionadas com a modulação da atividade elétrica de neurônios hipotalâmicos pela glicose (Adaptado de Burdakov *et al.*, 2005b). (a) Glicose, agindo substrato energético pode alterar atividade elétrica neuronal por influenciar o metabolismo energético no interior de neurônios ou células gliais. (b) Glicose, agindo como mensageiro extracelular podendo ativar receptores específicos para glicose que controlam fluxo de íon pela membrana, ou pode ser transportada por transportadores eletrogênica. Abreviações: ATP: adenosina trifosfato; Glicose-6-P; Glicose-6-fosfato; glut: *glucose transporter* (transportador de glicose); MCT1: transportador de lactato; SGLT: *sodium-glucose transporter* (transportador sódio-glicose).

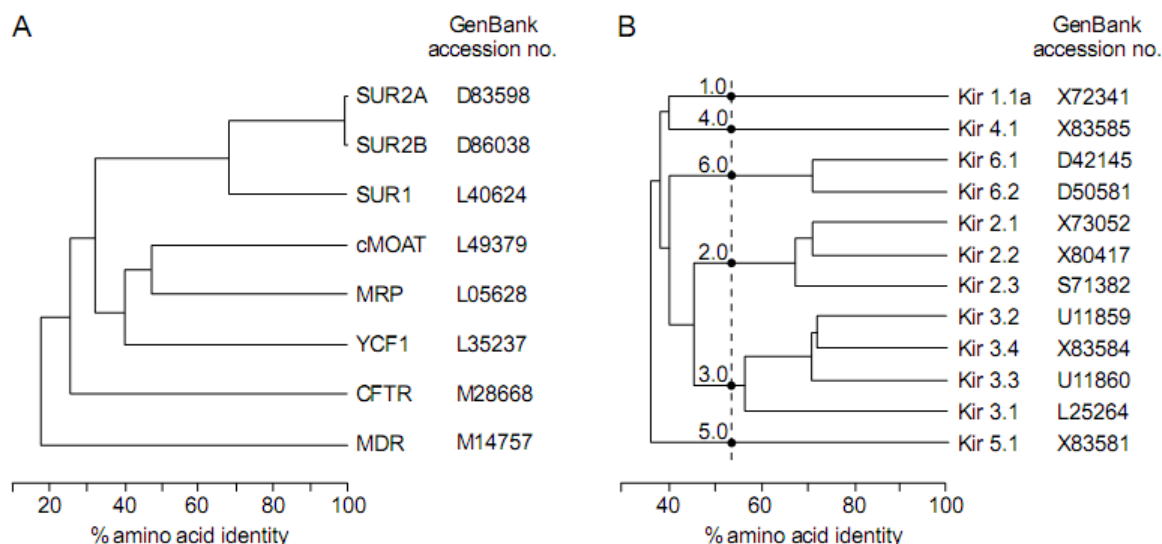
Canais  $K_{ATP}$  foram descritos por Noma (1983) primeiramente em musculatura estriada cardíaca, como um mecanismo de defesa ao baixo suprimento energético, como em situações de hipóxia. Desde então são comumente citados na literatura por acoplar metabolismo celular à atividade secretória e eletrofisiológica em muitos tecidos, funcionando, desta forma, como verdadeiros sensores metabólicos (Ashcroft e Proks, 2009). A partir de sua descoberta, os canais  $K_{ATP}$  foram rapidamente relacionados a importantes papéis em diversos órgãos e tecidos sob condições fisiológicas e patológicas, sendo expressos em regiões estratégicas como parte de mecanismos mais amplos e complexos para a regulação do metabolismo energético já tendo sido descritos em células epiteliais, músculo liso e esquelético cardíaco, em células  $\beta$ -pancreáticas e em neurônios (Ashcroft e Gribble, 1998).

O mecanismo mais estudado para compreensão de como o canal  $K_{ATP}$  pode interferir na atividade eletrofisiológica do neurônio é o modelo canônico de secreção de insulina pela célula  $\beta$ -pancreática, uma vez que a secreção de hormônios das ilhotas pancreáticas constitui a principal forma de regulação da concentração da glicemia (Rezek, 1976). Quando o suprimento de substrato é abundante, a insulina é secretada em resposta, estimulando o armazenamento celular deste carboidrato e inibindo a mobilização de substratos análogos endógenos. Por outro lado, quando o suprimento de nutrientes é baixo ou ausente, a secreção de insulina é diminuída e a mobilização dos estoques energéticos é aumentada pela secreção de glucagon (Schapiro e Ludewig, 1978; Unger, 1985). A glicose atua diretamente na secreção da insulina: a glicose é transportada através da membrana das células  $\beta$  das ilhotas pancreáticas pelo GLUT-2 (transportador de baixa afinidade pela glicose e alta taxa de transporte –  $K_m$  15 a 20 mM). Uma vez no interior da célula a glicose é rapidamente metabolizada pela glicoquinase formando glicose-6-fosfato. A posterior metabolização da glicose leva à produção de ATP que promove o fechamento de canais  $K_{ATP}$ . Assim, o acúmulo de cátions no interior da célula eleva o potencial de membrana até atingir o limiar para abertura dos canais sensíveis à voltagem tipo-L para  $Ca^{2+}$ . O aumento do  $Ca^{2+}$  citossólico culmina com a secreção dos grânulos contendo insulina para o interstício e, conseqüentemente, para a grande circulação (Thorens, 2008). De forma semelhante, a despolarização causada pelo fechamento destes canais frente à uma elevação da concentração de ATP citossólico é o mecanismo proposto para a função glicossensível de neurônios hipotalâmicos (Burdakov *et al.*, 2005).

As principais evidências para a participação dos canais  $K_{ATP}$  seguindo mecanismo de secreção semelhante aos das células  $\beta$ -pancreáticas é a presença de maquinaria celular semelhante nos neurônios glicossensíveis (Lynch, 2000). Além da presença da glicoquinase e da subunidade formadora do poro do canal (Kir6.2), neurônios glicosensíveis apresentam o transportador de glicose do tipo GLUT-3 que, com  $K_m$  1 a 3mM, é mais apropriado a baixas doses de glicose (Kang *et al.*, 2004).

O canal  $K_{ATP}$  é um complexo hetero-octamérico formado por dois tipos de subunidades proteicas. O poro do canal propriamente dito é formado por quatro subunidades Kir6.x (formadoras de canais para  $K^+$  retificadores de entrada, podendo ser Kir6.1 ou Kir6.2, como mostrado na Figura 2), cada uma associada a uma subunidade regulatória, o receptor de sulfonilureia [(SUR) (Nichols, 2006)]. As subunidades SUR podem ser SUR1, como nos canais encontrados nas células- $\beta$  pancreáticas e em neurônios hipotalâmicos (ambos de

origem embrionária ectodérmica), SUR2A, constituintes dos canais  $K_{ATP}$  cardíacos e, por fim, SUR2B, presentes em musculatura lisa vascular (Miki e Seino, 2005). Cada combinação confere propriedades eletrofisiológicas diferentes ao canal (Ashcroft e Gribble, 2001).



**Figura 2** Grau de identificação entre o transportador ligante de ATP (A) e os membros da família Kir (B). O comprimento das linhas horizontais indica porcentagem de aminoácidos idênticos (Ashcroft e Gribble, 1998).

As subunidades Kir6.2 (Figura 2) apresentam uma região de ligação ao ATP, que é capaz de causar o fechamento do canal. A atividade das sulfonilureias como a glibenclamida, a tolbutamida e a gliburida ocorre através da interação destas drogas com a subunidade SUR, levando à alteração conformacional do canal para sua forma fechada, atuando, desta forma, em sítios diferentes aos de atuação do ATP (Ashcroft e Gribble, 1998). Além disso, as sulfonilureias podem apresentar afinidades distintas pelos diferentes subtipos de subunidades SUR, como, por exemplo, a tolbutamida, que tem maior afinidade ao subtipo SUR1, enquanto a glibenclamida apresenta-se menos seletiva, atuando de forma semelhante nos diferentes tipos de canal (Ashcroft e Gribble, 2000). Drogas conhecidas como ativadoras dos canais  $K_{ATP}$ , como o Diazóxido, parecem exercer seu efeito também na subunidade SUR. Assim, não se sabe exatamente a função fisiológica das subunidades SUR, uma vez que não foram encontrados análogos endógenos destas substâncias que atuem nestes sítios de ligação, entretanto, sem estas subunidades, o canal não apresenta funcionalidade alguma, sendo necessária a expressão das duas subunidades para sua atividade plena (Mureau *et al*, 2005). É possível que as subunidades SUR sejam pontos para regulação da atividade do canal, uma vez que  $ADP^{Mg^{2+}}$  parece se acoplar à subunidade SUR colaborando para a manutenção do canal em seu estado aberto (Mannhold, 2003). Outras vias de sinalização intracelulares, como as

que são evocadas após a ativação de receptores para leptina (Spanswick *et al.*, 1997; Spanswick *et al.*, 2000) ou de receptores para adenosina (Li *et al.*, 2010), em determinadas células, também ocasionam a manutenção do canal  $K_{ATP}$  em seu estado aberto, levando à hiperpolarização.

Os canais  $K_{ATP}$  tem uma distribuição ampla no sistema nervoso central, formados pelas subunidades Kir6.2 SUR1, sendo encontrados em neurônios, interneurônios e células gliais. Entretanto, isso não significa que em todas estas regiões do SNC, os canais  $K_{ATP}$  tem participação como sensores metabólicos que vão interferir em vias relacionadas às mais diversas funções. Em muitos casos, a presença destes canais em neurônios serve como um mecanismo de defesa individual para a célula, principalmente em situações de isquemia ou baixa perfusão, na tentativa de diminuir sua atividade metabólica frente a estes desafios para manutenção de suas reservas energéticas e de sua integridade (Melnick *et al.*, 2011).

Ainda assim, algumas regiões apresentam uma grande densidade de canais  $K_{ATP}$ , das quais é muito importante ressaltar o hipotálamo, particularmente em neurônios sensíveis à glicose, representando um grande campo para pesquisa dos mecanismos homeostáticos envolvidos no metabolismo energético (Oomura *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2004). Dentre as áreas hipotalâmicas de maior concentração destes canais iônicos, destaca-se o já citado PVN localizado na região ventromedial do hipotálamo. Diversas evidências experimentais sugerem que a ativação dos neurônios do PVN (pela ativação de receptores POMC-CART e/ou inibição de receptores NPY-AgRP) induz anorexia (Schawrtz *et al.*, 2000). Camundongos geneticamente alterados que tiveram o gene responsável pela subunidade Kir6.2 deletado (Kir6.2<sup>-/-</sup>) apresentam hiperglicemia de jejum, e tem prejudicadas respostas contrarregulatórias, como a de glucagon, por alterar a atividade tanto de neurônios POMC-CART quanto NPY-AgRP, que atuam em conjunto com as células das ilhotas pancreáticas para manutenção da euglicemia nos animais (Gyte *et al.*, 2007; Miki *et al.*, 2001). Consistente com isso, a ativação do PVN também leva à secreção de diversos neurotransmissores anorexígenos como a ocitocina, o hormônio liberador da corticotrofina (CRH) e do hormônio liberador da tireotrofina (TRH). Outros estudos recentes relacionam a presença destes canais para potássio no hipotálamo com mecanismos de regulação do metabolismo. Spanswick e cols (1997) demonstrou que a leptina inibe neurônios do hipotálamo, especialmente dos núcleos paraventricular e arqueado, por meio da abertura de canais para  $K_{ATP}$ . Evans *et al.* (2004), com experimentos *in vivo*, mostrou que Canais  $K_{ATP}$  no VMH estão relacionados com respostas contrarregulatórias de adrenalina e glucagon. Diversas publicações mostram a

relação desses canais para potássio no hipotálamo, com distúrbios metabólicos tais como diabetes (Gyte *et al.*, 2007) e obesidade (Ashcroft *et al.*, 1996), reforçando seu papel no controle central da saciedade (Wang *et al.*, 2004). Os canais para  $K_{ATP}$  também são regulados pela ação da adenosina, liberado pelas células da glia especialmente diante de situações de hipóxia ou isquemia, em receptores específicos na membrana dos neurônios do hipotálamo. Isto leva ao fechamento dos canais para  $K_{ATP}$ , por vias bioquímicas intracelulares que ainda estão sendo investigadas e determinadas (Lee & Koh, 2009; Li *et al.*, 2010). Assim, podemos notar que na literatura há grande quantidade de informação sobre a participação dos canais  $K_{ATP}$  hipotalâmicos no metabolismo e muito mais pode ser encontrado quanto ao controle da ingestão alimentar. Entretanto, a participação destes canais no controle da atividade cardiovascular ainda é pouco estudado e pode ser um importante viés de investigação. Nishimura e cols (1995b) demonstraram que o bloqueio dos canais  $K_{ATP}$  a nível central em animais que sofreram ligação bilateral das carótidas evoca respostas cardiovasculares diretas, como a elevação da pressão arterial média e diminuição da frequência cardíaca, assim como respostas indiretas, como a uma elevação ainda maior da concentração de vasopressina plasmática do que a elevação habitualmente observada após a oclusão das carótidas. A elevação da pressão artérias foi não foi observada após tratamento sistêmico dos animais com o antagonista dos receptores de  $V_1$ , OPC-21268. Estes resultados não foram observados em animais falso-operados, mas foi observado comportamento cardiovascular semelhante em ratos espontaneamente hipertensos em condições basais e de hipóxia (1996), o que mostra que os canais  $K_{ATP}$  hipotalâmicos podem atuar como uma forma de proteção em alguns eventos patofisiológicos.

É sabido que tal alteração no status energético é capaz de alterar componentes autonômicos relacionados com o controle metabólico (Evans *et al.*, 2004), mas nada se tem a respeito da atividade cardiovascular. Assim, tomamos por hipótese que, em situações que acarretam a alteração da glicemia, a percepção da glicose por neurônios hipotalâmicos via canais  $K_{ATP}$  pode conduzir à alteração na atividade autonômica cardiovascular, visando o estabelecimento da pressão arterial e afluxo correto de sangue para manter as funções do SNC.

## **1. Objetivos**

Avaliar a participação dos canais  $K_{ATP}$  centrais na frequência cardíaca em ratos não anestesiados

Avaliar a participação dos canais  $K_{ATP}$  centrais na atividade autonômica cardiovascular em ratos não anestesiados

## **2. Material e Métodos**

### **3.1. Animais:**

Foram utilizados ratos Wistar, fornecidos pelo Biotério setorial do Departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, com peso padronizado entre 250-300g. Os animais foram mantidos em caixas de acrílico fosco coletivas (de 3 a 5 animais por caixa), mantidos em ambiente com temperatura controlada ( $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ ), com ciclo claro-escuro de 12 horas e água filtrada e ração comercial *ad libitum*. Todos os procedimentos foram submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro em protocolo de número 004/2014.

### **3.2. Implante de cânulas-guia dirigidas ao Terceiro Ventrículo:**

Com o auxílio de um aparelho estereotáxico (ASI Instruments, Warren, MI, EUA), foram implantadas cânulas-guia em direção ao Terceiro Ventrículo (3V), por meio das quais microinjeções foram realizadas. As cânulas de aço inoxidável, foram confeccionadas a partir de agulhas hipodérmicas (25 x 0,7 mm), possuindo comprimento de 15 mm, e foram fixadas no suporte da torre do estereotáxico. Após serem anestesiado com Quetamina (75mg/kg, via i.p.) e Xilazina (25mg/kg via i.p.), a região superior da cabeça do animal foi tricotomizada e então acomodada no aparelho estereotáxico e, por meio de duas barras auriculares, a cabeça do animal foi fixada. Foi realizada uma injeção subcutânea de 0,1mL de Lidocaína 1% para anestesia local. Após criteriosa assepsia, foi feita uma incisão abrangendo-se a pele e tecido celular subcutâneo, expondo a região superior do crânio exatamente subjacente à incisão, a qual foi tratada com solução fisiológica e água oxigenada, a fim de realizar completa limpeza da área. A torre do estereotáxico foi então posicionada em angulação zero e a cabeça do animal ajustada até que os pontos Bregma e Lâmbda estivessem localizados no mesmo plano



horizontal. Em seguida, foram realizadas as leituras dos parâmetros ântero-posteriore, lateral e dorso-ventral, tomando-se como referência o bregma. Com auxílio das informações de um atlas estereotáxico (Paxinos e Watson, 2007), foi determinado o ponto de introdução da cânula-guia (1,80mm posterior ao Bregma e 8,20mm abaixo da superfície óssea) e neste foram realizadas trepanações na calota craniana utilizando-se de broca odontológica esférica acoplada a um motor de baixa rotação. Através do orifício produzido pela trepanação, a cânula-guia foi introduzida, atentando-se para que a extremidade inferior da cânula esteja localizada 1 mm acima do limite dorsal da área a ser estudada. Na sequência, a cânula foi fixada utilizando-se de resina acrílica (metacrilato) que, por sua vez, foi fixada no crânio por dois diminutos parafusos de aço inoxidável. Em seguida à completa fixação das cânulas-guia, a torre do estereotáxico foi suspensa. Atentando-se para evitar a obstrução das cânulas-guia, foi introduzido um mandril de aço inoxidável (do mesmo comprimento da cânula-guia) no interior de cada cânula, sendo então, o animal retirado do estereotáxico e acomodado novamente em caixas com até cinco animais. Como medida profilática, foi administrado após a cirurgia, 0,2 mL de Pentabiótico veterinário IM [160.000 U.I./rato, via IM, (Fort-Dodge, Campinas, SP, Brasil)] e Cetoprofeno SC [3mg/kg, SC, (Vencofarma, Londrina, PR, Brasil)].

### **3.3. Microinjeções no Terceiro Ventrículo:**

As drogas foram diluídas em solução de Molecusol® (Beta-ciclodextrina) em salina isotônica (NaCl 0,9%) e microinjetadas no terceiro ventrículo utilizando-se de uma seringa Hamilton de 10 µL conectada a uma agulha gengival por meio de um tubo de polietileno PE-10. A cânula injetora utilizada foi de 1,0 a 1,5 mm maior que a cânula-guia com o intuito de que as microinjeções fossem realizadas exatamente no sítio pretendido. O volume microinjetado foi sempre de 2 µL e o pH da solução foi ajustado com bicarbonato de sódio para valores próximos do fisiológico (7,4).

Foram usadas as seguintes drogas: Diazóxido (15nM), um ativador, e Glibenclamida (5nM), um bloqueador dos canais  $K_{ATP}$ . O Diazóxido é uma droga que provoca a abertura do canal de  $K_{ATP}$  e, conseqüentemente, a hiperpolarização da célula, tendo especificidade pelo subtipo de canal Kir6.2 SUR1 (Ashcroft e Gribble, 2000), como presente nos neurônios glicosensíveis do hipotálamo. Já a Glibenclamida é uma sulfonilurea, bloqueador do canal  $K_{ATP}$ , ligando-se à subunidade SUR1, assim como também em canais SUR2A ou SUR2B, realizando efeito similar ao do ATP intracelular (Ashcroft e Gribble, 1998).

### **3.4. Histologia**

Ao término dos protocolos experimentais foram realizadas microinjeções do corante azul de Evans (em concentração de 2%) nos mesmos sítios de microinjeção no sistema nervoso central, tendo por finalidade determinar a região de microinjeção no terceiro ventrículo ou se houve lesão das regiões adjacentes. Os animais foram decapitados por guilhotina e o encéfalo coletado e armazenado em tubo do tipo Falcon com formal a 10% por sete dias para fixação das estruturas e depois transferido para solução de sacarose a 30% para desidratação até o momento dos cortes histológicos. A seguir a região foi incluída em um bloco de parafina e, com auxílio de um micrótomo, seccionado transversalmente em fatias de 40 $\mu$ m de espessura. Os cortes histológicos receberam coloração pelo método de hematoxilina e eosina com posterior visualização em microscópio óptico. Através da coloração histológica e da microscopia óptica avaliamos se o sítio de microinjeção pretendido foi realmente atingido e se não houve lesão das regiões adjacentes. Com efeito, apenas os animais que apresentam cortes histológicos, onde a microscopia óptica assegurou a integridade das regiões objetos deste estudo foi preservada, foram considerados na análise de resultados.

### **3.5. Implante de eletrodo subcutâneo**

No dia anterior ao registro eletrocardiográfico, os animais foram novamente anestesiados com Quetamina (75mg/kg, via IP) e Xilazina (25mg/kg via IP) para implante de eletrodo subcutâneo. O eletrodo foi feito a partir de um fio de metal de aço inoxidável implantado subcutâneo e torcido. Cada animal recebeu dois eletrodos, um em cada lado da caixa torácica, afim de permitir o registro da derivada I no eletrocardiograma.

### **3.6. Registro do eletrocardiograma:**

Os registros digitais eletrocardiográficos foram realizados no período da manhã entre as 7:00 e 12:00 horas no dia seguinte à implantação do eletrodo subcutâneo. Os animais foram acoplados ao amplificador de sinal (PowerLab 8/35; ADInstruments) através de seus eletrodos subcutâneos e o registro da atividade elétrica cardíaca foi realizado com o auxílio de um software (LabChart 7). Os animais foram registrados por 20 minutos para aquisição de registro basal, recebiam a microinjeção intracerebroventricular, após a qual seguiam para mais um registro de 20 minutos para aquisição dos tacogramas em condições experimentais.

### **3.7. Análise da variabilidade da frequência cardíaca**

Para a análise da variabilidade da frequência cardíaca (VFC) no domínio da frequência, foram usados os seguintes passos, de acordo com Altimiras (1999): 1 – Separação dos trechos dos registros de ECG. 2 – Separação dos trechos de ECG dos períodos controle correspondentes temporalmente aos trechos selecionados anteriormente. 3 – Utilização de filtros em cada uma das janelas de ECG, de forma a eliminar artefatos que possam interferir negativamente na realização dos tacogramas. Asseguramos a utilização dos filtros adequados para que não haja nenhuma alteração na identificação das ondas R. Esse procedimento reduz consideravelmente as flutuações decorrentes de artefatos de movimento. 4 – Realização dos

tacogramas. Utilizamos a interpolação linear para assegurarmos que os tacogramas tenham a mesma base temporal que os ECGs originais. 5 – Utilização de algoritmos matemáticos para a obtenção dos respectivos espectrogramas de frequência. No nosso caso, utilizamos a FFT (Transformada Rápida de Fourier). 6 - Nos espectrogramas utilizamos apenas as faixas de frequência correspondentes aos componentes de baixa frequência (LF) e de alta frequência (HF), representativos das modulações simpática e vagal, respectivamente. As faixas utilizadas foram: 0,2 a 0,75 Hz (LF) e 0,75 a 2,5 Hz (HF), de acordo com os trabalhos prévios (Task Force, 1996). A análise da frequência foi realizada em toda a extensão dos registros. Para a análise estatística, comparamos a relação entre os componentes de LF e HF de cada animal nos dois períodos. Esses componentes foram obtidos através do cálculo da energia média de cada banda no intervalo de tempo determinado.

### **3.8. Análise estatística dos resultados:**

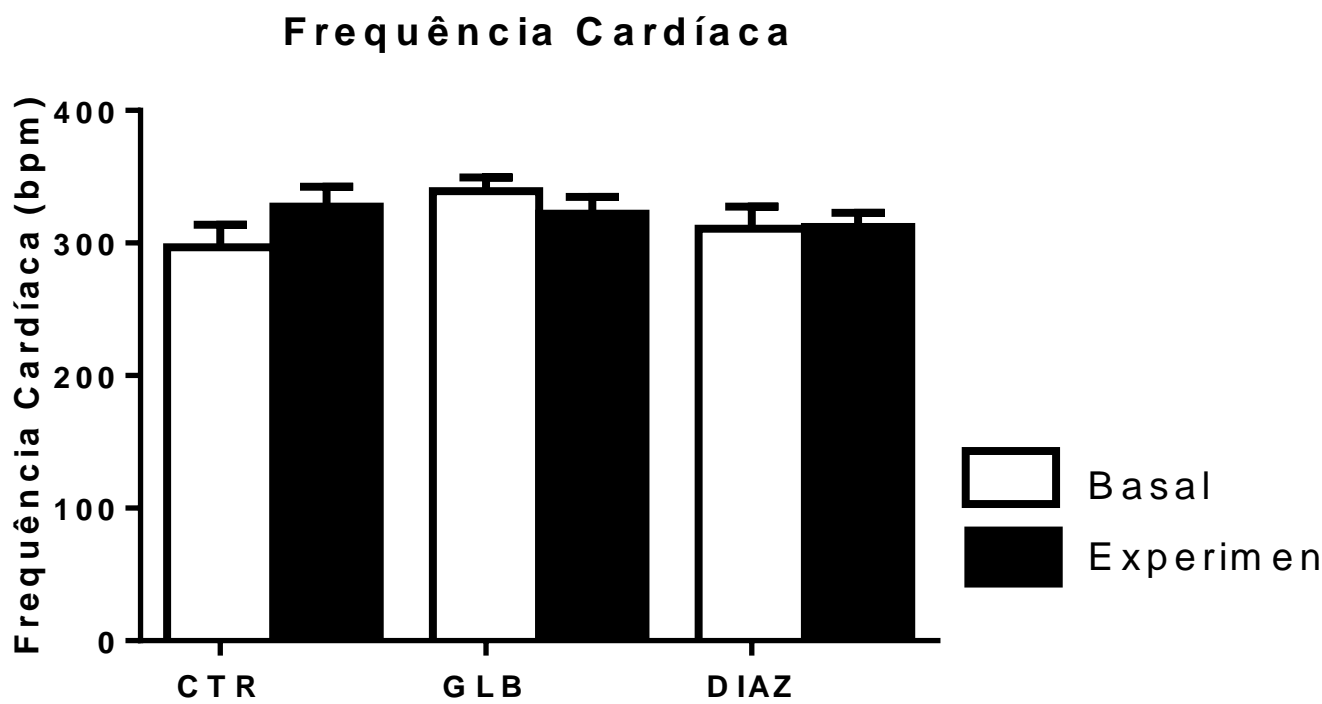
Os dados obtidos foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk para avaliar a distribuição dos dados. Os dados então eram submetidos à análise de variância ANOVA “one-way”. Resultados considerados significativos quando  $p < 0,05$ . Todos os resultados são mostrados em Média $\pm$ SEM.

### 3. Resultados

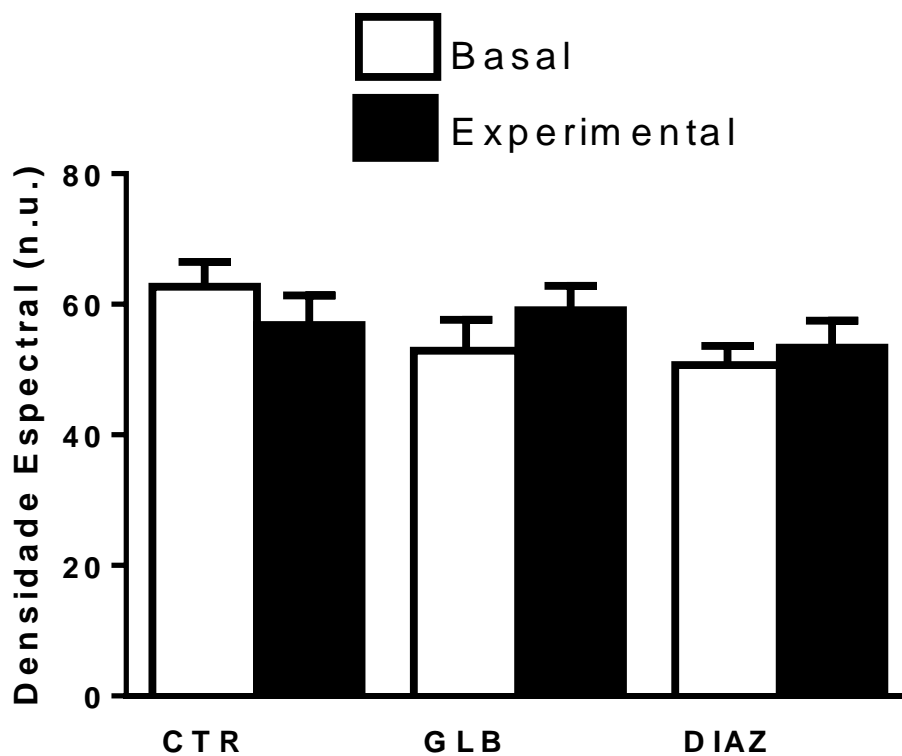
Os resultados apresentados na Figura 3 são referentes à média da frequência cardíaca dos registros eletrocardiográficos basais e experimentais entre os grupos controle ( $962,9 \pm 16,84$  bpm vs  $321,3 \pm 12,95$  bpm, respectivamente,  $n=10$ ;  $p>0,05$ ), glibenclamida ( $339,3 \pm 10,26$  bpm vs  $326,3 \pm 12,23$  bpm, respectivamente,  $n=10$ ;  $p>0,05$ ) e diazóxido ( $310,8 \pm 16,68$  bpm vs  $312,2 \pm 10,75$  bpm, respectivamente,  $n=12$ ;  $p>0,05$ ), onde o tratamento com nenhuma das drogas mostrou diferenças estatisticamente significativas entre si.

As figuras 4 a 6 mostram os resultados referentes à análise da variabilidade da frequência cardíaca no domínio da frequência. Na Figura 4 estão resumidos os dados da banda de baixa frequência (LF, do termo em inglês, *low frequency*), dos registros antes e após a microinjeção i.c.v. de cada grupo, seja controle ( $62,73 \pm 3,79$  n.u. vs  $56,82 \pm 4,534$  n.u., respectivamente,  $n=11$ ;  $p>0,05$ ), glibenclamida ( $52,92 \pm 4,718$  n.u. vs  $59,08 \pm 3,771$  n.u., respectivamente,  $n=13$ ;  $p>0,05$ ) ou diazóxido ( $50,69 \pm 10,64$  n.u. vs  $53,38 \pm 4,11$  n.u., respectivamente,  $n=13$ ;  $p>0,05$ ) onde o tratamento com nenhuma das drogas usadas foi capaz de evocar diferenças significativas. Na Figura 5 estão plotados os resultados da banda de alta frequência (HF, do termo em inglês, *high frequency*), novamente dos registros basais e experimentais, nos grupos controle ( $37,27 \pm 3,79$  n.u. vs  $43,18 \pm 4,534$  n.u., respectivamente,  $n=11$ ;  $p>0,05$ ), glibenclamida ( $47,08 \pm 4,718$  n.u. vs  $40,92 \pm 3,771$  n.u., respectivamente,  $n=13$ ;  $p>0,05$ ) e diazóxido ( $49,31 \pm 2,951$  n.u. vs  $46,62 \pm 4,110$  n.u., respectivamente,  $n=13$ ;  $p>0,05$ ). Tampouco os diferentes tratamentos farmacológicos com bloqueador e ativador resultou qualquer resultado estatisticamente significativo entre si e entre os animais tratados com veículo.

Da mesma forma, os resultados da relação LF/HF na análise da variabilidade da frequência cardíaca, apresentados na figura 6, mostram que a administração intracerebroventricular de veículo ( $2,014 \pm 0,3312$  vs  $1,607 \pm 0,2891$ , basal e experimental respectivamente,  $n=11$ ;  $p>0,05$ ), de glibenclamida ( $1,435 \pm 0,2695$  vs  $1,713 \pm 0,2516$ ,  $n=13$ ;  $p>0,05$ ) ou de diazóxido ( $1,133 \pm 0,1494$  vs  $1,416 \pm 0,2747$ ,  $n=13$ ;  $p>0,05$ ), não levou a qualquer alteração estatisticamente significativa antes e após o tratamento.

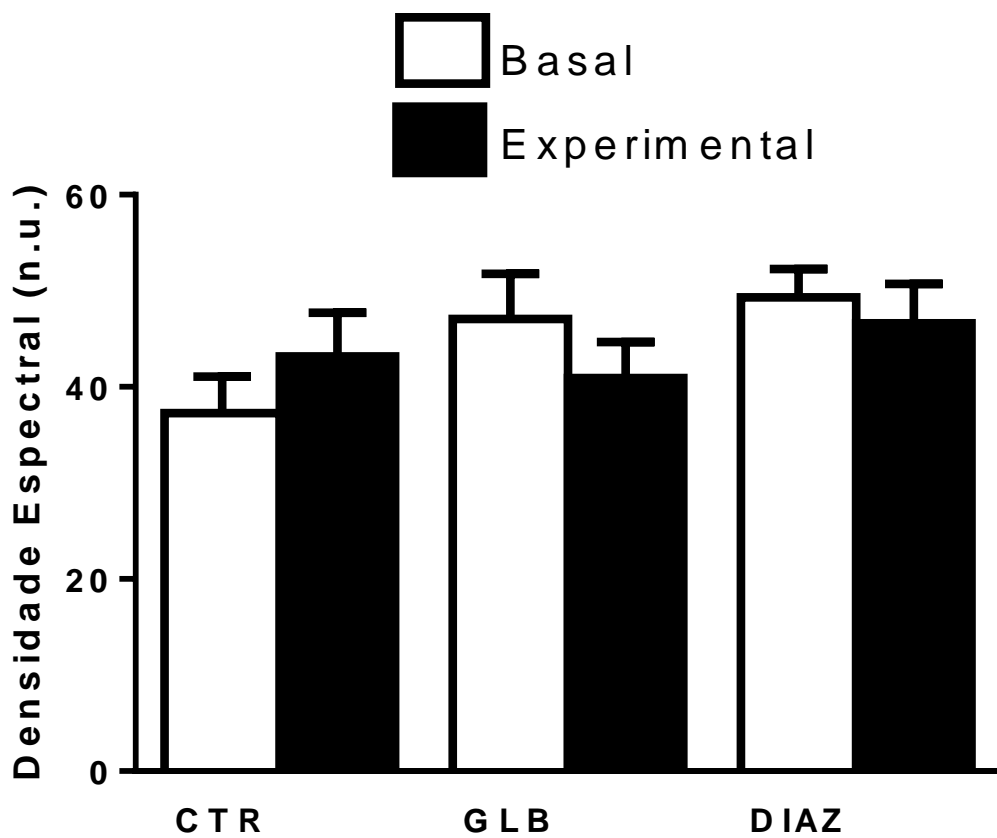


**Figura 3** Níveis de frequência cardíaca antes (Basal, barras brancas) e após (Experimental, barras pretas) nos grupos veículo (CTR, n=10), Glibenclamida (GLB, n=10) e Diazóxido (DIAZ, n=12). Dados expressos como média  $\pm$  SEM

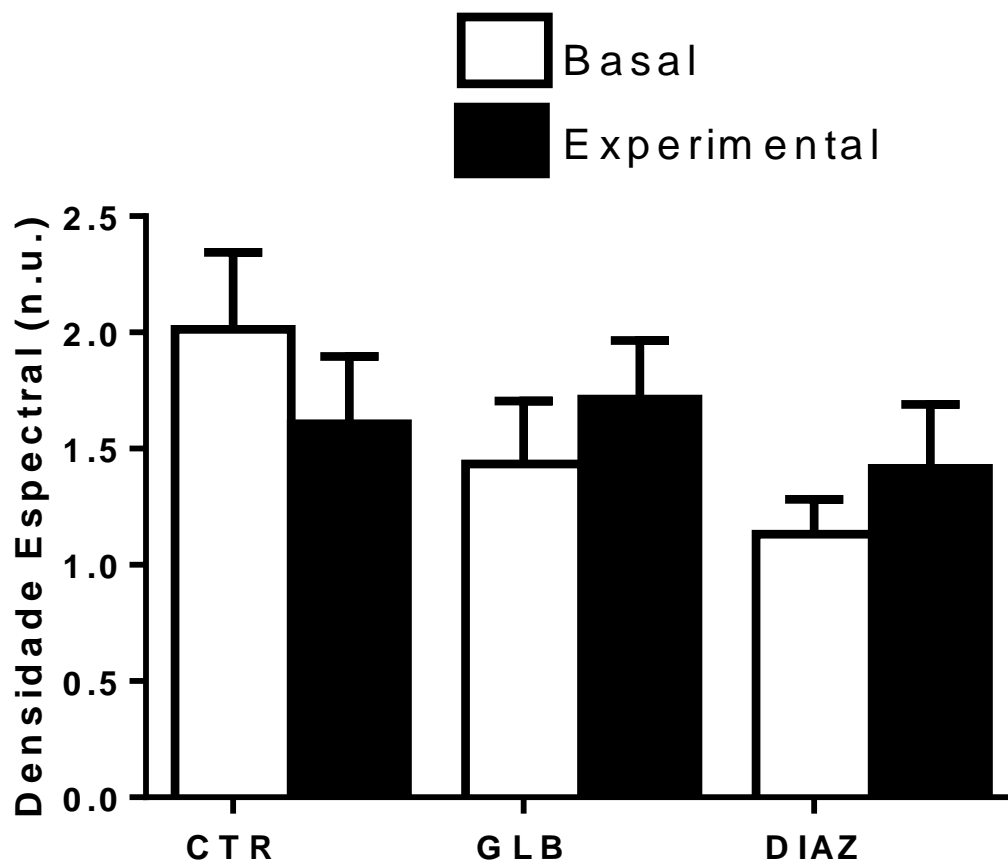


**Figura 4** Participação da variação de baixa frequência (LF) no total do espectro, antes (Basal, barras brancas) e após (Experimental, barras pretas) nos grupos veículo (CTR, n=11); Glibenclamida (GLB, n=13) e Diazóxido (DIAZ, n=13). Dados expressos como média  $\pm$  SEM





**Figura 5** Participação da variação de alta frequência (HF) no total do espectro, antes (Basal, barras brancas) e após (Experimental, barras pretas) nos grupos veículo (CTR, n=11); Glibenclamida (GLB, n=13) e Diazóxido (DIAZ, n=13). Dados expressos como média  $\pm$  SEM



**Figura 6** Relação entre as bandas de baixa e alta frequência (LF/HF) no total do espectro, antes (Basal, barras brancas) e após (Experimental, barras pretas) nos grupos veículo (CTR, n=11); Glibenclamida (GLB, n=13) e Diazóxido (DIAZ, n=13). Dados expressos como média  $\pm$  SEM

#### 4. Discussão

Estudos prévios relacionam pistas metabólicas com o controle da atividade cardiovascular. Condições de hipoglicemia, por exemplo, seja induzida por insulina ou por restrição alimentar é capaz de levar a respostas cardiovasculares contrarregulatórias (Fagius e Berne, 1989; Casto *et al.*, 1998; Chang *et al.*, 1999). Em experimentos com humanos, Fagius e Berne (1991) mostraram que hipoglicemia aguda induzida por administração sistêmica de insulina é capaz evocar uma leve alteração na pressão arterial caracterizada por um aumento da pressão pulsátil, seguindo a queda da glicose sanguínea, o que era confirmado por outros trabalhos, onde a administração de insulina e concomitante hipoglicemia era capaz de elevar a pressão arterial e a frequência cardíaca de forma aguda (Hilsted *et al.*, 1984). Este resultado de Fagius e Berne (1991) é semelhante ao que fora obtido pelo primeiro grupo com hipoglicemia induzida por 2-deoxi-glicose (2DG), um análogo não metabolizável da glicose (Fagius e Berne, 1989). Foy e Lucas (1976), investigaram em modelos animais o efeito de “moduladores autonômicos” frente à privação alimentar. Eles demonstraram que a privação alimentar por si só não era capaz de levar a alterações da pressão arterial média nem em condições basais, nem em indivíduos que receberam noradrenalina e isoproterenol endovenoso (agonista não-seletivo mas com preferência por receptores  $\alpha$ -adrenérgicos e agonista  $\beta$ -adrenérgico, respectivamente). Mas havia uma queda da pressão arterial na presença de acetilcolina (agonista dos receptores colinérgicos muscarínicos), significativamente mais acentuada nos animais privados de alimentos.

Estudos como de Casto e cols. (1998) tentaram relacionar outros fatores metabólicos com a atividade cardiovascular em animais. Primeiramente, eles observaram que a privação alimentar significativamente diminui a pressão arterial média, corroborando com outros

resultados, onde ainda relatam uma concomitante diminuição da frequência cardíaca (Chang *et al.*, 1999). Isso se deve a uma redução no suporte simpático da pressão sanguínea e aumento da sensibilidade do barorreflexo em ratos normotensos (Herlihy *et al.*, 1992) ou hipertensos (Overton *et al.*, 1997). Isso contradiz resultado observado em humanos, em relação ao efeito das alterações nas concentrações sanguíneas de glicose com o estudo da variabilidade da frequência cardíaca: no estudo de Vlcek e cols (2008) com hipoglicemia induzida por insulina em pacientes humanos, houve um aumento significativo da banda de baixa frequência (LF) da variabilidade da frequência cardíaca, apenas 30 minutos após a administração de insulina, associado a um aumento das concentrações plasmáticas de adrenalina e noradrenalina bem acentuados, indicando um aumento da atividade simpática nas condições do experimento em questão. Ainda em seu estudo, Casto e cols. (1998) mostraram que a administração central de leptina é capaz de levar a alterações na pressão arterial e na frequência cardíaca de forma dose dependente, e pode ter relação com a ativação de regiões hipotalâmicas como hipotálamo ventromedial, dorsomedial e PVN (Elmqvist *et al.*, 1997). Lembrando que a leptina é um hormônio peptídico produzido pelo tecido adiposo branco e é secretado em condições de saciedade (Campfield *et al.*, 1996), e a ativação de seus receptores provoca a abertura dos canais  $K_{ATP}$  (Spanswick *et al.*, 1997). Estes dados sugerem uma interface entre o controle energético-metabólico e o controle cardiovascular, haja visto a necessidade de um fino controle do aporte sanguíneo que chega ao coração.

Embora corresponda a cerca de apenas 2% do peso corporal, o cérebro é responsável por 25% do consumo de glicose corporal, necessitando um controle fino do aporte deste substrato energético (Magistretti *et al.*, 1995). O hipotálamo, especialmente o núcleo paraventricular, é uma importante região no controle autonômico e neurohumoral do organismo, envolvido em diversas funções incluindo o controle sobre o metabolismo energético e sobre o sistema cardiovascular (Woods *et al.*, 1998; Ferguson *et al.*, 2008; Watts

e Donovan, 2010). Diversos estudos apontam que o PVN pode ser ativado em condições de hipo ou hiperglicemia (Dunn-Meynell *et al.*, 1997a; Shiraishi *et al.*, 2000), atuando em diferentes tipos celulares deste núcleo. Em células parvocelulares neurosecretoras (p-NS), que estão relacionadas com os eixos hipotalâmicos hipofisários, foi-se mostrado que baixas concentrações de glicose são capazes de alterar os *inputs* sinápticos provenientes de outros núcleos (Song *et al.*, 2002; Routh, 2002), enquanto no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, classicamente relacionado com situações de estresse, hipoglicemia *in vivo* é capaz de ativar este eixo levando a um aumento de secreção do hormônio liberador de corticotrofina (CRH; Arai e Widmaier, 1991; Gorton *et al.*, 2007). Já em neurônios parvocelulares autonômicos (p-PA), foram observadas populações de neurônios glicoe excitáveis (GE) e glicoinibidos (GI), assim como presentes em diversos outros núcleos hipotalâmicos (Routh, 2002; Levin *et al.*, 2004; Burdakov *et al.*, 2005b), mas também um terceiro tipo de neurônios responsivos, que não sofrem alteração no potencial de repouso ( $V_{rest}$ ), mas tem apresentam alterações de condutância (Melnick *et al.*, 2011). E embora todos os neurônios GE aferentes vagais apresentem os canais  $K_{ATP}$ , apenas 26% são de fato despolarizados por glicose (Grabauskas *et al.*, 2010). Além disso, neurônios glicossensíveis do PVN demonstraram não sofrer efeito da modulação farmacológica com sulfonilureias, tampouco com ativadores do canal  $K_{ATP}$ , indicando possivelmente outra forma de glicossensibilidade não dependente da participação destes canais (Melnick *et al.*, 2011).

A capacidade glicossensora dos neurônios pode ser devido a vias metabólicas ou não metabólicas (Burdakov *et al.*, 2005b), resumidos na figura 1. As vias independentes de metabolismo incluem a participação de um receptor eletrogênico como o SGLT (Elsas e Longo, 1992) ou um hipotético receptor para glicose (Diez-Sampedro *et al.*, 2003); enquanto as vias dependentes de metabolismo, que são as vias dependentes do bloqueio dos canais  $K_{ATP}$ , seja a partir de vias que se completam no próprio corpo celular do neurônio, onde se faz

necessária a presença de maquinaria celular para metabolismo de glicose (Yang *et al.*, 1999; Burdakov *et al.*, 2005a), ou necessitam que a glicose seja previamente metabolizada por células gliais que, através de transportadores de cátions MCT1, transferem o lactato para o corpo celular do neurônio, que vai metabolizá-lo gerando ATP (Pellerin e Magistretti, 1994; Pellerin *et al.*, 2007). Neurônios GE do hipotálamo mediobasal (Yang *et al.*, 1999; Ainscow *et al.*, 2002) e neurônios hipotalâmicos orexigênicos (Parsons e Hirasawa, 2010) já foram descritos como sendo “sensíveis a lactato”. No caso dos neurônios glicossensíveis do PVN, como mostrado por Melnick (2011), por não apresentarem alteração pela manipulação farmacológica por bloqueadores e ativadores do canal  $K_{ATP}$ , as vias metabólicas parecem não responder como o PVN pode perceber as alterações da glicemia do fluido cerebrospinal.

O canal  $K_{ATP}$  consiste um importante mecanismo de proteção celular durante períodos de privação metabólica, sendo ativados em situações de hipóxia e isquemia (Hu *et al.*, 2003), protegendo coração, musculatura esquelética e o próprio SNC de lesões isquêmicas (Nichols e Lederer, 1991; Pang *et al.*, 1997; Yamada e Inagaki, 2002). A isquemia leva a um acúmulo de adenosina em cérebro, rins e coração (Mubagwa *et al.*, 1996; Mubagwa e Flameng, 2001; Nieber *et al.*, 1999; Reshef *et al.*, 1998; Shryock e Belardinelli, 1997), e a ativação de receptores A1 em neurônios do PVN, que, por vias celulares ainda a serem definidas, causam a abertura dos canais  $K_{ATP}$  (Lee e Koh, 2009; Li *et al.*, 2010). Ademais, o papel de proteção celular desempenhado pelo canal  $K_{ATP}$  pode estar relacionado com sua localização no corpo celular, seja na superfície ( $sK_{ATP}$ ), levando a despolarização da célula, como os canais localizados na membrana mitocondrial interna ( $mitoK_{ATP}$ ), levando a uma despolarização da organela, o que contribui para seus mecanismos protetores (Balanyi, 2004; Yamada e Inagaki, 2005). Os neurônios de mamíferos têm baixa tolerância à diminuição da glicemia (Hansen, 1985; Haddad e Jiang, 1993) e em diversos neurônios, a hipoglicemia pode levar a uma hiperpolarização aguda induzida por canais para  $K^+$  (Misgeld e Frotscher, 1982, Hansen,

1985; Haddad e Jiang, 1993), seja por canais para  $K^+$  dependentes de  $Ca^{2+}$  como em neurônios hipocampais (Leblond e Krnjevic, 1989; Nowicky e Duchen, 1989) ou por canais  $K_{ATP}$  de superfície (Mourre *et al.*, 1989; Luhman e Heinemann, 1992; Kulik *et al.*, 2002). Esta hiperpolarização diminui a atividade neuronal e o fluxo iônico transmembrana, atenuando a atividade de bombas de íon, o que consome 50% da energia do SNC (Hansen, 1985; Hochachika, 1986).

A ausência de alteração nos parâmetros analisados após a administração central de glibenclamida ou diazóxido condizem com o que as informações que a literatura traz. Ainda, em trabalhos já citados de Nishimura e cols, as alterações na pressão arterial e na secreção de vasopressina não foram observadas em condições basais, somente com desafios como ligação bilateral das carótidas (1995b) ou em ratos espontaneamente hipertensos submetidos a hipóxia (1995a) é que alguma alteração foi evocada, reforçando um possível papel neuroprotetor dos canais  $K_{ATP}$ , ao invés de um papel primariamente glicosensível.

Desta forma, a falta de resposta quanto à microinjeção intracerebroventricular de glibenclamida ou de diazóxido pode ser devido à falta de um desafio que pudesse evocar alguma condição de hipóxia ou hipoglicemia, tais como ligação bilateral das carótidas ou privação alimentar por 48h. O local de administração das soluções, ainda que fosse i.c.v., também pode ter sido um fator de interferência. Embora microinjeções intracerebroventricular sejam feitas visando uma distribuição por todo líquido cerebrospinal, chegando às regiões desprovidas de barreira hematoencefálica, como área postrema (AP) e órgão subfornical (SFO), que por sua vez mantém projeções para diversas áreas hipotalâmicas, como o próprio PVN (Fry e Ferguson, 2007). Estes órgãos circunventriculares já mostraram ter seus próprios mecanismos glicosensíveis (Funahshi e Adachi, 1993) e esta pode ser uma das formas pelas quais estes núcleos são influenciados pelas alterações glicêmicas do organismo. Entretanto, a estrutura molecular das drogas dificulta sua diluição em solução fisiológica isotônica (NaCl

0,9%), que é quando se faz necessária o auxílio de uma  $\beta$ -ciclodextrina para facilitação da dissolução da droga, no caso o composto comercial Molecusol ( $\beta$ -ciclodextrina) a 5%, não permitia uma diluição muito boa, podendo ter havido uma precipitação da droga no local de administração, que foi a razão de termos escolhido o terceiro ventrículo nas coordenadas que usamos, que era próxima ao PVN. Uma microinjeção diretamente no núcleo paraventricular seria mais fidedigno para que nós possamos relacionar estas ausências de alteração de fato ao PVN.



## 5. Conclusão

A manipulação farmacológica intracerebroventricular dos canais  $K_{ATP}$  não é capaz de alterar a atividade autonômica cardíaca nas condições basais em que este experimento foi realizado. Isto parece estar de acordo com a literatura, uma vez que ainda não foi atribuída a capacidade glicossensível dos neurônios do PVN ao canal  $K_{ATP}$ , apesar dos mesmos já terem sido revelados presentes neste núcleo e a quantidade de resultados ainda seja pouca. Ainda, não se pode descartar a participação deste canal no hipotálamo à atividade autonômica cardiovascular, visto que situações de desafio podem ser o estímulo necessário para que os canais  $K_{ATP}$  tenham sua função revelada.

## 7. Referências Bibliográficas

ACCORSI-MENDONÇA, D.; ZOCCAL, D.B.; BONAGAMBA, L.G.H.; MACHADO, B.H. **Glial cells modulate the synaptic transmission of NTS neurons sending projections to ventral medulla of Wistar rats.** *Physiological Reports* ISSN 2051-817X (2013) Vol. 1, Iss. 4. p1-13

AFFLECK, V.S.; COOTE, J.H.; PYNER, S. **The Projection and Synaptic Organisation of NTS Afferent Connections with Presympathetic Neurons, GABA and nNOS Neurons in the Paraventricular Nucleus of the Hypothalamus.** *Neuroscience* 219 (2012) 48–61

AINSCOW, E.K., MIRSHAMSI, S., TANG, T., ASHFORD, M.L. & RUTTER, G.A. 2002. **Dynamic imaging of free cytosolic ATP concentration during fuel sensing by rat hypothalamic neurones: evidence for ATP-independent control of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels.** *J. Physiol.* 544, 429–445.

ALTIMIRAS, J. **Understanding autonomic sympathovagal balance from short-term heart rate variations. Are we analyzing noise?** *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* 124 (1999) 447–460

ANTUNES-RODRIGUES, J.; CASTRO, M.; ELIAS, L.L.K.; VALENÇA, M.M.; MCCANN, S.M. **Neuroendocrine Control of Body Fluid Metabolism.** *Physiol Rev* (2003) S4: 189-208

ARAI, M. & WIDMAIER, E.P. (1991) **Activation of the pituitary–adrenocortical axis in day-old rats by insulin-induced hypoglycemia.** *Endocrinology*, 129, 1505–1512.

ASHCROFT, F.M. **Adenosine 5'-Triphosphate-Sensitive Potassium Channels.** *Ann. Rev. Neurosci.* (1988). 11: 97-118

ASHCROFT, F.M.; GRIBBLE F.M. **Correlating structure and function in ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels.** *Trends in Neurosciences* (1998). Vol 21, Issue 7, 288-294

ASHCROFT, F.M.; GRIBBLE, F.M. 2000. **New windows on the mechanism of action of K<sub>ATP</sub> channel openers.** *TiPS* (2000). Vol 21. 439-445

ASHCROFT, F.M.; GRIBBLE, F.M. **New Windows on the mechanism of action of K<sub>ATP</sub> channel openers.** *TiPS* (2001). Vol 21. 439-444

ASHCROFT, M.L.J. *et al.* **Potassium channel dysfunction in hypothalamic glucose-receptive neurones of obese rats.** *J of Physiol* (1996), v. 407.2, p.356-377

BALLANYI, K. **Protective role of neuronal K<sub>ATP</sub> channels in brain hypoxia** (2004). *The Journal of Experimental Biology* 207, 3201-3212

**BERECEK, K.H. & SWORDS, B.H. Central role of vasopressin in Cardiovascular Regulation and the pathogenesis of Hypertension.** (1990). Hypertension. Vol 16 No 3.

**BROWN, D.L.; GUYENET, P.G. Electrophysiological Study of Cardiovascular Neurons in the Rostral Ventrolateral Medulla in Rats.** Circulation Research/Vol. 56, No. 3 (1985): 359-368

**BUIJS, R.M.; VAN HEERIKHUIZE, J.J. Vasopressin and oxytocin release in the brain. A synaptic event.** (1982) Brain Res 1982; 252:71-76

**BUIJS, R.M.; HASELBEEK, A.K. Hypothalamic integration of central and peripheral clocks.** Nature Reviews: Neuroscience (2001). Vol 2. 521-526.

**BURDAKOV, D.; OLEG, G.; VERKHRATSKY, A. Physiological changes in glucose differentially modulate the excitability of hypothalamic melanin-concentration and orexin neurons *in situ*.** (2005a). The Journal of Neuroscience. 25(9):2429-2433.

**BURDAKOV D.; LUCKMAN, S.M.; VERKHRATSKY, A. Glucose-sensing neurons of the hypothalamus.** (2005b) Phil. Trans. R. Soc. B. 360, 2227-2235.

**CAMPFIELD, L.A.; SMITH, F.J.; BURN, P. The OB protein (leptin) pathway – a link between adipose tissue mass and central neural networks.** Horm. Metab. Res. (1996) 28 619–632.

**CAMPOS, R.R.; CARILLO, B.A.; OLIVEIRA-SALES, E.B.; SILVA, A.M.; SILVA, N.F.; FUTURO NETO, H.A.; BERGAMASCHI, C.T. Role of the caudal pressor area in the regulation of sympathetic vasomotor tone.** Braz J Med Biol Res 41(7) 2008: 557-562

**CASTO, R.M.; VANNESS, J.M.; OVERTON, J.M. Effects of central leptin administration on blood pressure in normotensive rats.** Neuroscience Letters 246 (1998) 29–32

**CHANG, K.C.; CHOW, C.Y.; PENG, I.P.; CHEN, T.J.; TSAI, A.F. Effects of Food Restriction on Mechanical Properties of Arterial System in Adult and Middle-Aged Rats.** Journal of Gerontology: Biological Sciences (1999), Val. 54A, No. 10, B441-B447

**COWLEY, A.W.; JEAN FRANCOIS LIARD; GUYTON, A.C. Role of the Baroreceptor Reflex in Daily Control of Arterial Blood Pressure and Other Variables in Dogs.** Circulation Research. Vol. XXXII, May 1973: 564-676

**DAMPNEY, R.A. Functional organization of central pathways regulating the cardiovascular system.** (1994) Physiol Rev 74: 323–364.

**DIEZ-SAMPEDRO, A., HIRAYAMA, B.A., OSSWALD, C., GORBOULEV, V., BAUMGARTEN, K., VOLK, C., WRIGHT, E.M. & KOEPESELL, H. A glucose sensor hiding in a family of transporters.** (2003) Proc. Natl Acad. Sci. USA 100, 11753–11758.

DUNN-MEYNELL, A.A., GOVEK, E.; LEVIN, B.E. **Intracarotid glucose selectively increases Fos-like immunoreactivity in paraventricular, ventromedial and dorsomedial nuclei neurons.** Brain Res. (1997), 748, 100–106.

DUSCHEK, S., DIETEL, A., SCHANDRY, R. & REYES DEL PASO, G.A. **Increased baroreflex sensitivity and reduced cardiovascular reactivity in chronic low blood pressure.** (2008) Hypertension Research, 31, 1873-1878

DUSCHEK, S.; DIETEL, A.; SCHANDRY, R.; REYES DEL PASO, G.A. **Increased Baroreflex Sensitivity and Reduced Cardiovascular Reactivity in Individuals with Chronic Low Blood Pressure.** Hypertens Res (2008) Vol. 31, No. 10

DUSCHEK, S., WÖRSCHING, J., & REYES DEL PASO, G. A. **Interactions between autonomic cardiovascular regulation and cortical activity: A CNV study.** (2013) Psychophysiology, 50, 388–397.

ELMQUIST, J.K.; AHIMA, R.S.; MARATOS-FLIER, E.; FLIER, J.S.; SAPER, C.B. **Leptin activates neurons in ventrobasal hypothalamus and brainstem.** Endocrinology, 138 (1997) 839–842

ELSAS, L.J.; LONGO, N. **Glucose transporters.** (1992) Annu. Rev. Med. 43, 377–393.

EVANS, M.L.; McCRIMMON R.J.; FLANAGAN, D.E.; KESHAVARZ, T.; FAN, X.; McNAY, E.C.; JACOB, R.J.; SHERWIN, R.S. **Hypothalamic ATP-sensitive K<sup>+</sup> Channels plays a key role in sensing hypoglycemia and triggering counterregulatory epinephrine and glucagon responses.** Diabetes (2004) v. 53, p. 2542-2551

FAGIUS, J.; BERNE, C. **Rapid Resetting of Human Baroreflex Working Range: Insights From Sympathetic Recordings During Acute Hypoglycaemia.** Journal of Physiology (1991), 442, pp. 91-101

FAGIUS, J.; BERNE, C. (1989). **Changes of sympathetic nerve activity induced by 2-deoxy-Dglucose infusion in humans.** American Journal of Physiology (1989) 256, E714-720.

FERGUSON, A.V.; LATCHFORD, K.J.; SAMSON, W.K. **The Paraventricular Nucleus of the Hypoalamus: a Potential Target for Integrative Treatment of Autonomic Dysfunction.** Expert Opin Ther Targets (2008). 12(6): 717-727

FOY, J.M.; LUCAS, P.D. **Effect of Experimental Diabetes, Food Deprivation and Genetic Obesity on the Sensitivity of Pithed Rats to Autonomic Agents.** Br. J. Pharmac. (1976), 57, 229-234

FRY, M.; FERGUSON, A.V. **The sensory circumventricular organs: brain targets for circulating signals controlling ingestive behavior.** Physiol. Behav. (2007), 91, 413–423.

FUNAHSHI, M.; ADACHI, A. **Glucose-responsive Neurons Exist Within the Area Postrema of the Rat: in vitro study on the isolated slice preparation.** Brain Research Bulletin (1993). Vol. 32, pp. 531-535.

GARDINER, S.M.; BENNETT, T. **Endogenous Vasopressin and Baroreflex Mechanisms.** Brain Res (1986). 396(4): 317-34.

GORTON, L.M., KHAN, A.M., BOHLAND, M.A., SANCHEZ-WATTS, G., DONOVAN, C.M.; WATTS, A.G. **A role for the forebrain in mediating time-of-day differences of glucocorticoids counterregulatory responses to hypoglycemia.** Endocrinology (2007) 148, 6026–6039

GRABAUSKAS, G., SONG, I., ZHOU, S.Y.; OWYANG, C. **Electrophysiological identification of glucose-sensing neurons in rat nodose ganglia.** J. Physiol. (2010), 588, 617–631

GUTKOWSKA, J.; JANKOWSKI, M. **Oxytocin Revisited: Its Role in cardiovascular Regulation.** Journal of Neuroendocrinology (2011). 24, 599-608.

GUTKOWSKA, J.; JANKOWSKI, M.; MUKADDAN-DAHER, S.; McCANN, S.M. **Oxytocin is a cardiovascular hormone.** Brazilian Journal of Medical and Biological Research (2000). 33: 625-633

GYTE, A.; PRITCHARD, L.E.; JONES, H.B.; BRENNAND, J.C.; WHITE, A. **Reduced expression of the  $K_{ATP}$  channel subunit, Kir6.2, is associated with decreased expression of neuropeptide-Y and agouti-related protein in the hypothalami of Zucker diabetic fatty rats.** J Neuroendocrinol (2007); 19(12):941-951.

HADDAD, G.G. AND JIANG, C. **O<sub>2</sub> deprivation in the central nervous system, on mechanisms of neuronal response, differential sensitivity and injury.** Progr. Neurobiol. (1993) 40, 277-318.

HANSEN, A.J. **Effect of anoxia on ion distribution in the brain.** Physiol. Rev. (1985) 65, 101-148.

HARDY, S.G.P. **Hypothalamic projections to cardiovascular centers of the medulla.** Brain Research 894 (2001) 233–240

HARVEY, S. **Growth Hormone and Growth?** General and Comparative Endocrinology 190 (2013) 3–9.

HASELTON, J.R.; GUYENET, P.G. **Ascending collaterals of medullary barosensitive neurons and C1 cells in rats.** American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology (1990) Vol. 258 no. 4

HERLIHY, J.T.; STACY, C.; BERTRAND, H.A. **Long-term calorie restriction enhances baroreflex responsiveness in Fischer 344 rats.** *Am J Physiol.* (1992);263

HESSE, C., CHARKOUDIAN, N., LIU, Z., JOYNER, M. J., & EISENACH, J.H. **Baroreflex sensitivity inversely correlates with ambulatory blood pressure in healthy normotensive humans.** *Hypertension* (2007), 50, 41–46.

HILSTED, J.; BONDE-PETERSEN, F.; NORGAARD, M.B.; GRENIMAN, M.; CHRISTENSEN, N. J.; PARVING, H.H.; SUZUKI, M. **Haemodynamic changes in insulin-induced hypoglycaemia in normal man.** *Diabetologia* (1984) 26, 328-332.

HOCHACHKA, P.W. **Defense strategies against hypoxia and hypothermia.** *Science* (1986) 231, 234-241

HU, K.; HUANG, C.S.; JAN, Y.N.; JAN, L.Y.. **ATP-Sensitive Potassium Channel Traffic Regulation by Adenosine and Protein Kinase C.** *Neuron* (2003), Vol. 38, 417–432.

JARD, S. **Vasopressin receptors.** *Front Horm Res* (1985); 13:89-104

KANG, L., ROUTH, V.H., KUZHIKANDATHIL, E.V., GASPERS, L.D.; LEVIN, B.E. **Physiological and molecular characteristics of rat hypothalamic ventromedial nucleus glucosensing neurons.** *Diabetes* (2004) 53, 549–559.

KULIK, A., BROCKHAUS, J., PEDARZANI, P. AND BALLANYI, K. **Chemical anoxia activates ATP-sensitive and blocks Ca<sup>2+</sup>-dependent K<sup>+</sup> channels in rat dorsal vagal neurons in situ.** *Neuroscience* (2002) 110, 541-554.

LEBLOND, J. AND KRNJEVIC, K. **Hypoxic changes in hippocampal neurons.** *J. Neurophysiol* (1989). 62, 1-14.

LEE, C.B.; KOH, H.C. **Modification of the cardiovascular response of posterior hypothalamis adenosine A<sub>2A</sub> receptor stimulation by the adenylate cyclase and K<sub>ATP</sub> channel clocked in anesthetized rats.** *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical* (2009), v. 146, p. 70-75.

LELOUP, C.; ALLARD, C.; CARNEIRO, L.; FIORAMONTI, X.; COLLINS, S.; PÉNICAUD, L. **Glucose and Hypothalamic Astrocytes: More than a Fueling Role?** *Neuroscience* xxx (2015) xxx–xxx

LEVIN, B.E. **Metabolic Sensors: Viewing glucosensing neurons from a broader perspective.** *Physiology & Behavior* (2002) 76. 397-401

LEVIN, B.E., ROUTH, V.H., KANG, L., SANDERS, N.M.; DUNN-MEYNELL, A.A. **Neuronal glucosensing: what do we know after 50 years?** *Diabetes* (2004) 53, 2521–2528.

- LI, D.P.; CHEN, R.; PAN, H.L. **Adenosine inhibits paraventricular pre-sympathetic neurons through ATP-dependent potassium channels.** J Neurochem (2010); 113(2):530-542.
- LIPSKI, J.; KANJHAN, B.; KRUSZEWSKA, T.; SMITH, M. **Barosensitive Neurons in the Rostral Ventrolateral Medulla of the Rat *in vivo*: Morphological Properties and Relationship to C1 Adrenergic Neurons.** Neuroscience Vol. 69, No. 2, pp. 601-618, 1995
- LUHMANN, H.J.; HEINEMANN, U. **Hypoxia-Induced Functional Alterations in Adult Rat Neocortex.** J. Neurophysiol. (1992) 67, 798-811.
- LYNCH, R.M.; TOMPKINS, L.S.; BROOKS, H.L.; DUNN-MEYNELL, A.A.; LEVIN, B.E. **Localization of Glucokinase Gene Expression in the Rat Brain.** Diabetes (2000) 49, 693-700.
- MUBAGWA, K.; FLAMENG, W. **Adenosine, Adenosine Receptors and Myocardial Protection: An Updated Overview.** Cardiovasc. Res. (2001) 52, 25-39.
- MUBAGWA, K.; MULLANE, K.; FLAMENG, W. **Role of Adenosine in the Heart and Circulation.** Cardiovasc. Res. (1996) 32, 797-813.
- MACHADO, B.H.; MAUAD, H.; CHIANCA JR., D.A.; HAIBARA, A.S.; COLOMBARI, E. **Autonomic processing of the cardiovascular reflexes in the *nucleus tractus solitarius*.** Braz J Med Biol Res 30(4) 1997. 533-543.
- MAFFUCCI, J.A.; GORE, A.C. **Hypothalamic neural systems controlling the female reproductive life cycle: Gonadotropin-releasing hormone, glutamate, and GABA.** Int Rev Cell Mol Biol. 2009 ; 274: 69.
- MAGISTRETTI, P.J.; PELLERIN, L.; MARTIN, J.L. **Brain Energy Metabolism: An Integrated Cellular Perspective.** In: Neuropsychopharmacology: The Fourth Generation of Progress (Bloom F, Kupfer Dj, Eds), Pp 657-670 (1995).
- MANNHOLD, R. **K<sub>ATP</sub> Channel Openers: Structure-Activity Relationships and Therapeutic Potential.** Medicinal Research Reviews (2004), Vol. 24, No. 2, 213-266
- MEDEIROS, N.; DAI, L.; FERGUSON, A.V. **Glucose-Responsive Neurons in the Subfornical Organ of the Rat - A Novel Site for Direct CNS Monitoring of Circulating Glucose.** Neuroscience 201 (2012) 157-165
- MELNICK, I.V.; PRICE, C.J.; COLMERS, W.F. **Glucosensing in parvocellular neurons of the rat hypothalamic paraventricular nucleus.** European Journal of Neuroscience (2011), Vol. 34, pp. 272-282.
- MIKI, T.; SEINO, S. **Roles of K<sub>ATP</sub> channels as metabolic sensors in acute metabolic changes.** Journal of Molecular and Cellular Cardiology 38 (2005) 917-925

MIKI, T.; LISS, B.; MINAMI, K.; SHIUCHI, T.; SARAYA, A.; KASHIMA, Y.; HORIUCHI, M.; ASHCROFT, F.; MINOKOSHI, Y.; ROEPER, J.; SEINO, S. **ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in the hypothalamus are essential for the maintenance of glucose homeostasis.** *Nat Neurosci* 2001; 4(5):507-512.

MISGELD, U.; FROTSCHER, M. **Dependence of the viability of neurons in hippocampal slices on oxygen supply.** *Brain Res. Bull.* (1982). 8, 95-100.

MORRIS, M.; ALEXANDER, N. **Baroreflex influences on oxytocin and vasopressin secretion.** *Hypertension* (1980);13:110-114

MOURRE, C.; BEN-ARI, Y.; BERNARDI, H.; FOSSET, M.; LAZDUNSKI, M. **Antidiabetic sulfonylureas, localization of binding sites in the brain and effects on the hyperpolarization induced by anoxia in hippocampal slices.** *Brain Res.* (1989) 486, 159-164.

MOREAU, C.; PROST, A.L.; DÉRAND, R.; VIVAUDOU, M. **SUR, ABC proteins targeted by K<sub>ATP</sub> channel openers.** *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 38 (2005) 951–963

NICHOLS, C.G. **K<sub>ATP</sub> channels as molecular sensors of cellular metabolism.** *Nature.* (2006) v.440, p. 470-475.

NICHOLS, C.G.; LEDERER, W.J. **Adenosine Triphosphate-Sensitive Potassium Channels in the Cardiovascular System.** *Am. J. Physiol.* (1991). 261, H1675–H1686.

NIEBER, K.; ESCHKE, D.; BRAND, A. **Brain Hypoxia: Effects of ATP and Adenosine.** *Prog Brain Res.* 1999;120:287-97.

NISHIMURA, M.; NANBU, A.; SAKAMOTO, M.; NAKANISHI, T.; TAKAHASHI, H.; YOSHIMURA, M. **Role of Cerebral ATP-sensitive K<sup>+</sup> Channels in arterial pressure regulation during acute cerebral ischaemia in SHR and WKY rats.** *Clin Exp Pharmacol Physiol Suppl* (1995b). 22(1): S70-2

NISHIMURA, M.; TAKAHASHI, H.; NANBU, A.; SAKAMOTO, M.; NAKANISHI, T.; YOSHIMURA, M. **Cerebral ATP-Sensitive Potassium Channels During Acute Reduction of Carotid Blood Flow.** *Hypertension* (1995a). 25; 1069-1074

NISHIMURA, M.; TAKAHASHI, H.; NANBU, A.; SAKAMOTO, M.; NAKANISHI, T.; YOSHIMURA, M. **cerebral adenosine triphosphate-sensitive K<sup>+</sup> channels may be impaired during acute cerebral ischemia in spontaneously hypersensitive rats.** *J Auton Nerv Syst* (1996). 58(3): 139-46

NOMA, A. **ATP-Regulated K<sup>+</sup> Channels in Cardiac Muscle.** *Nature* (1983). 305 (5930): 147–148.



NOWICKY, A.V.; DUCHEN, M.R. (1998). **Changes in  $[Ca^{2+}]_i$  and Membrane Currents during impaired mitochondrial metabolism in Dissociated Rat Hippocampal Neurons.** J. Physiol. Lond. 507, 131-145.

OOMURA, Y.; AOU, S.; MATSUMOTO, I.; SAKATA, T. **Physiological significance of 2-buten-4olide (2-B4O), an endogenous satiety substance increased in the fasted state.** Exp Biol Med (Maywood ) 2003; 228(10):1146-1155.

OVERTON, J.M.; VANNESS, J.M.; CASTO, R.M. **Food Restriction Reduces Sympathetic Support of Blood Pressure in Spontaneously Hypertensive Rats.** Neuroscience and Nutrition, 1997. p655-660

PANG, C.Y.; NELIGAN, P.; XU, H.; HE, W.; ZHONG, A.; HOPPER, R.; FORREST, C.R. **Role of ATP-Sensitive  $K^+$  Channels in ischemic preconditioning of skeletal muscle against infarction.** Am. J. Physiol. Light, P.E., Sabir, A.A., Allen, B.G., Walsh, M.P., And French, R.J. 273, H44–H51. 1997

PATEL, A.B.; DE GRAAF, R.A.; MASON, G.F.; ROTHMAN, D.L.; SHULMAN, R.G.; BEHAR, K.L. **Coupling of glutamatergic neurotransmission and neuronal glucose oxidation over the entire range of cerebral cortex activity.** Ann NY Acad Sci (2003); 1003:452-453

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates.** San Diego (2007)

PELLERIN, L.; MAGISTRETTI, P.J. **Neuroenergetics: Calling upon astrocytes to Satisfy Hungry Neurons.** Neuroscientist (2004) 10, 53–62

PELLERIN, L.; MAGISTRETTI, P.J. **Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: A mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization.** Proc Natl Acad Sci USA (1994) 91:10625–10629

PELLERIN, L.; BOUZIER-SORE, A.K.; AUBERT, A.; SERRES, S.; MERLE, M.; COSTALAT, R; MAGISTRETTI, P.J. **Activity-Dependent Regulation of Energy Metabolism by Astrocytes: An update.** Glia (2007) 55:1251–1262.

PETERSON, M. **Cardiovascular effects of Oxytocin.** Prog Brain Res (2002) 139:281-288

PITTMAN, Q.T.; LAWRENCE, D., McLEAN, L. **Central effects of arginine vasopressin on blood pressure in rats.** Endocrinology 1982;110:1058-1060

PROKS, P.; ASHCROFT, F.M. **Modeling KATP channel gating and its regulation.** Prog Biophys Mol Biol. (2009) 99(1):7-19. Epub 2008 Oct 17.

RESHEF, A.; SPERLINGA, O.; ZOREF-SHANIA, E. **Opening of ATP-sensitive potassium channels by cromakalim confers tolerance against chemical ischemia in rat neuronal cultures.** Neuroscience Letters 250 (1998) 111–114

REYES DEL PASO, G.A.; GONZALEZ, I.; HERNANDEZ, J.A. **Baroreceptor sensitivity and effectiveness varies differentially as a function of cognitive-attentional demands.** *Biological Psychology* (2004), 67, 385–395

REZEK, M. **The role of insulin in the glucostatic control of food intake.** *Can J Physiol Pharmacol* (1976); 54(5):650-665.

ROUTH, V.H. **Glucose-sensing neurons: Are they physiologically relevant?** *Physiology & Behavior* 76 (2002) 403– 413.

SANDERS, N.M.; RITTER, S. **Repeated 2-Deoxy-D-Glucose-Induced Glucoprivation Attenuates Fos Expression and Glucoregulatory Responses During Subsequent Glucoprivation.** *Diabetes* 49:1865–1874, 2000

SAPER, C.B.; CHOU, T.C.; ELMQUIST, J.K. **The Need to Feed: Review Homeostatic and Hedonic Control of Eating.** *Neuron* (2002). Vol. 36, 199-211.

SCHREIHOFFER, A.M.; GUYENET, P.G. **The Baroreflex and Beyond: Control of Sympathetic Vasomotor Tone by Gabaergic Neurons in the Ventrolateral Medulla.** *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* (2002) 29, 514–521

SCHWANZEL-FUKUDA, M.; BICK, D.; PFAFF, D.W. **Luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH)-expressing cells do not migrate normally in an inherited hypogonadal (Kallmann) syndrome.** *Brain Res Mol Brain Res* (1989) 6, 311–326

SCHWARTZ, M.W.; WOODS, S.C.; PORTE, D.L.R.; SEELEY, R.J.; BASKIN, D.G. **Central nervous system control of food intake.** *Nature* (2000); 404(6778):661-671.

SCHAPIRO, H.; & LUDEWIG, R.M. **The effects of glucagon on the exocrine pancreas: a Review.** *Am J Gastroenterol* (1978). 70(3): 274-81

SHIRAIASHI, T.; OOMURA, Y.; SASAKI, K.; WAYNER, M. **Effects of Leptin and Orexin-A on food intake and feeding related hypothalamic neurons.** *Physiology & Behavior* 71 (2000) 251-261

SHYROCK, J.C.; BELARDINELLI, L. **Adenosine and Adenosine Receptors in the Cardiovascular System: Biochemistry, Physiology, and Pharmacology.** *Am J Cardiol.* 1997 Jun 19;79(12a):2-10.

SHULMAN, R.G.; HYDER, F.; ROTHMAN, D.L. **Baseline Brain Energy Supports the State of Consciousness.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106(27):11096-11101.

SONG, Z.; LEVIN, B.E.; McARDLE, J.J.; BAKHOS, N.; ROUTH, V.H. **Convergence of Pre- and Postsynaptic Influences on Glucosensing Neurons in the Ventromedial Hypothalamic Nucleus.** *Diabetes* (2001) Vol. 50. 2673-2681.

SPANSWICK, D.; SMITH, M.A.; GROPP, V.E.; LOGAN, S.D.; ASHFORD, M.L.J. **Leptin inhibits hypothalamic neurons by activation of ATP-sensitive potassium channels.** Nature (1997), v. 390. p. 521-525

SPANSWICK, D.; SMITH, M.A.; MIRSHAMSI, S.; ROUTH, V.H.; ASHFORD, M.L.J. **Insulin activates ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in hypothalamic neurons of lean, but not obese rats.** Nature Neuroscience (2000) Vol 3 No 8

SUN, M.K.; GUYENET, P.G. **Excitation of Rostral Medullary Pacemaker Neurons with Putative Sympathoexcitatory Function by Cyclic AMP and  $\beta$ -Adrenoceptor Agonists 'in vitro'.** Brain Research, 511 (1990) 30-40

SWANSON, L.W.; SAWCHENKO, P.E. **Hypothalamic integration: organization of the paraventricular and supraoptic nuclei.** Annu Rev Neurosci 1983; 6:269-324.

TASK FORCE OF THE EUROPEAN SOCIETY OF CARDIOLOGY AND THE NORTH AMERICAN SOCIETY OF PACING AND ELECTROPHYSIOLOGY. **Heart Rate Variability: Standards of Measurement, Physiological interpretation, and clinical use.** European Heart Journal (1996) 17, 354-381

THORENS, B. **Glucose sensing and the pathogenesis of obesity and type 2 diabetes.** Int J Obes (Lond) 2008; 32 Suppl 6:S62-S71.

THRASHER, T.N. **Unloading arterial baroreceptors causes neurogenic hypertension.** Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol 282: R1044-R1053, 2002;

TINKER, A.; AZIZ, Q.; THOMAS, A. **The Role of ATP-Sensitive Potassium Channels in Cellular Function and Protection in the Cardiovascular System.** British Journal of Pharmacology (2014) 171 12-23

UNGER, R.H. **GLUCAGON - Physiology and Pathophysiology in the Light of New Advances.** Deabentologia (1985) 28(8): 574-8

VLCEK, M.; RADIKOVA, Z.; PENESOVA, A.; KVTNANSKY, R.; IMRICH, R. **Heart rate variability and catecholamines during hypoglycemia and orthostasis.** Auton Neurosci 2008;143:53-7.

WANG, R.; LIU, X.; HENTGES, S.T.; DUNN-MEYNELL, A.A.; LEVIN, B.E.; WANG, W.; ROUTH, V.H. **The regulation of Glucose-Excited Neurons in the Hypothalamic Arcuate Nucleus by Glucose and Feeding-Relevant Peptides.** Diabetes (2004); 53(8):1959-1965.

WATTS, A.G.; DONOVAN, C.M. **Sweet talk in the brain: Glucosensing, neural networks, and hypoglycemic counterregulation.** Frontiers in Neuroendocrinology 31 (2010) 32-43

WOODS, S.C.; SEELEY, R.J.; PORTE, D.J.; SCHWARTZ, M.W. **Signals that regulate food intake and energy homeostasis.** *Science* (1998), 280, 1378–1383.

YAMADA, K.; INAGAKI, N. **ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in the brain: sensors of hypoxic conditions.** *News Physiol. Sci.* (2002) 17, 127–130.

YAMADA, K.; INAGAKI, N. **Neuroprotection by K<sub>ATP</sub> channels.** *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 38 (2005) 945–949.

YANG, X.; KOW, L.M.; FUNABASHI, T.; MOBBS, C.V. **Hypothalamic glucose sensor: similarities to and differences from pancreatic beta-cell mechanisms.** *Diabetes* (1999) 48:1763–1772.

## 8. Apêndice

**Tabela 1** Frequência Cardíaca

Controle			Glibenclamida			Diazóxido		
Animal	Basal	Experimental	Animal	Basal	Experimental	Animal	Basal	Experimental
2	302,4	355,3	1	346,9	331,6	4	278,4	284,0
6	334,6	337,6	3	343,0	327,0	7	270,1	274,1
12	245,3	286,5	5	335,0	311,7	10	403,5	405,2
16	260,1	284,2	9	374,1	404,4	11	250,1	263,0
20	294,5	312,8	13	349,7	339,0	16	365,4	315,4
27	227,9	352,4	15	390,9	350,4	17	374,9	317,4
30	372,3	375,8	18	323,7	309,1	19	346,6	337,2
33	279,5	258,7	21	350,9	311,4	23	352,9	318,0
35	264,6	279,0	22	283,1	253,5	26	303,1	335,2
38	387,7	387,9	25	296,1	283,5	28	208,3	303,8
						34	286,9	287,5
						37	289,1	305,1
<b>Média±EPM</b>	<b>296,9±16,84</b>	<b>323±14,2</b>	<b>Média±EPM</b>	<b>339,3±10,26</b>	<b>322,2±12,72</b>	<b>Média±EPM</b>	<b>310,8±16,68</b>	<b>312,2±10,75</b>

**Tabela 2** Dados brutos da análise espectral da frequência cardíaca dos animais do grupo controle

Animal	BASAL					Experimental				
	LF%	HF%	LF (nu)	HF (nu)	LF/HF	LF%	HF%	LF (nu)	HF (nu)	LF/HF
2	37	35	54	46	1,2	38	28	61	39	1,6
6	29	38	50	50	1,0	24	43	43	57	0,8
12	30	8	78	22	3,5	41	22	69	31	2,2
16	34	29	56	44	1,3	19	7	75	25	3,0
20	26	7	78	22	3,5	27	8	73	27	2,7
24	18	5	75	25	3,0	20	27	52	48	1,1
27	22	7	76	24	3,2	22	7	75	25	3,0
30	23	14	68	32	2,1	31	51	38	62	0,6
33	37	41	49	51	1,0	35	34	55	45	1,2
35	34	45	46	54	0,9	27	34	51	49	1,0
38	28	25	60	40	1,5	28	58	33	67	0,5
<b>Média±EPM</b>	<b>28,9±1,9</b>	<b>23,1±4,6</b>	<b>62,7±3,8</b>	<b>37,3±3,8</b>	<b>2,4±0,32</b>	<b>29,4±2,2</b>	<b>29±5,6</b>	<b>56,8±4,5</b>	<b>43,2±4,5</b>	<b>2,04±0,33</b>

**Tabela 3** Dados brutos da análise espectral da frequência cardíaca dos animais do grupo glibenclamida

Animal	BASAL					Experimental				
	LF%	HF%	LF (nu)	HF (nu)	LF/HF	LF%	HF%	LF (nu)	HF (nu)	LF/HF
3	32	37	51	49	1,0	25	17	66	34	1,9
5	22	6	76	24	3,2	10	8	69	31	2,2
8	24	65	27	73	0,4	27	10	75	25	3,0
9	41	19	70	30	2,3	33	41	47	53	0,9
13	27	30	57	43	1,3	26	59	35	65	0,5
15	33	13	70	30	2,3	33	10	77	23	3,3
18	21	56	33	67	0,5	25	29	52	48	1,1
21	24	19	57	43	1,3	32	20	68	32	2,1
22	30	56	35	65	0,5	36	45	45	55	0,8
25	20	20	59	41	1,4	13	6	70	30	2,3
29	29	9	75	25	3,0	23	14	68	32	2,1
32	30	55	36	64	0,6	40	45	48	52	0,9
36	34	49	42	58	0,7	32	40	48	52	0,9
<b>Média±EPM</b>	<b>27,2±1,8</b>	<b>32,5±5,4</b>	<b>52±4,5</b>	<b>48±4,5</b>	<b>1,8±0,31</b>	<b>27±2,2</b>	<b>25,4±4,6</b>	<b>59,8±3,6</b>	<b>40,21±3,6</b>	<b>2,2±0,27</b>

**Tabela 4** Dados brutos da análise espectral da frequência cardíaca dos animais do grupo diazóxido

Animal	BASAL					Experimental				
	LF%	HF%	LF (nu)	HF (nu)	LF/HF	LF%	HF%	LF (nu)	HF (nu)	LF/HF
1	14	21	40	60	0,7	23	12	69	31	2,2
4	30	38	47	53	0,9	31	33	52	48	1,1
7	31	52	38	62	0,6	29	48	41	59	0,7
10	28	17	66	34	1,9	19	17	60	40	1,5
11	35	32	54	46	1,2	34	15	69	31	2,2
14	33	47	41	59	0,7	16	46	27	73	0,4
17	26	30	45	55	0,8	29	28	53	47	1,1
19	37	26	60	40	1,5	32	8	80	20	4,0
23	26	24	57	43	1,3	34	48	43	57	0,8
26	41	17	70	30	2,3	21	14	67	33	2,0
28	38	48	44	56	0,8	36	43	46	54	0,9
34	33	51	40	60	0,7	35	48	43	57	0,8
37	32	28	57	43	1,3	32	43	44	56	0,8
<b>Média±EPM</b>	<b>32,5±1,6</b>	<b>34,2±3,7</b>	<b>51,6±3,1</b>	<b>48,4±3,1</b>	<b>1,55±0,21</b>	<b>29±1,9</b>	<b>32,6±4,5</b>	<b>52,1±4,2</b>	<b>47,9±4,2</b>	<b>1,6±0,33</b>